

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL KARACİĞER İSKEMİ-REPERFÜZYONU
OLUŞTURULAN SIÇANLARDA DOKU OKSİDAN-
ANTIOKSİDANLARININ DURUMU: DOKU HASARINA
E VİTAMİNİ VE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER'İN
(CAPE) ETKİLERİ**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

DOKTORA TEZİ

Dr. Efkan Uz

Biyokimya Anabilim Dalı

T 107673

Tez Danışmanı

Doç.Dr. Ömer Akyol

MALATYA

2001

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer vücut metabolizmasında merkezi role sahip önemli bir organdır. Kendi normal fonksiyonunun yanında, vücudun diğer organ ve dokularına yaptığı destek yaşamsal önemdedir. Vücudun protein, karbohidrat ve lipid metabolizmalarında öncü olmasının yanı sıra, vücutta üretilen toksik ve toksik olmayan bileşikler ve aynı zamanda çoğu zaman ilaç olarak alınan birçok ksenobiyotiğin metabolize edilip atılmasında fonksiyon görmektedir. Bu bakımdan özellikle karaciğere ait cerrahi girişimler sırasında korunması ve uzun süre oksijensiz bırakılmaması gerekmektedir.

Karaciğere ait birçok cerrahi girişimde iskemi ve/veya reperfüzyon hasarı tehlikesi söz konusudur; 1) karaciğer tümörlerinin, damar lezyonlarının ve travmalarının tedavisi sırasında çoğu zaman karaciğerin kan akımının geçici bir süre kesilmesi gerekmektedir. Hepatik kan akımının kesilme süresine bağlı olarak mikro ve makro seviyede mutlaka iskemik belirtiler olmakta, bu da değişen seviyelerde hasar oluşturmaktadır. 2) karaciğer rezeksiyonlarında (bu genel olarak sıcak iskemi-reperfüzyonu olarak bilinir) ve karaciğer transplantasyonlarında (soğuk + sıcak iskemi-reperfüzyonu) her zaman, yine derecesi değişken olmakla birlikte, iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarları oluşmaktadır. 3) Hipotansif acil durumlar değişik şok sendromlarının sonucu olarak hipoksi oluşumu ve ayrıca karaciğer greftlerinin hepatic artere tromboz atması durumlarında azalmış oksijenasyona bağlı iskemi benzeri patolojik değişiklikler olmaktadır.

İskemi-reperfüzyonda hasar oluşumunda en çok üzerinde durulan konu aşırı miktarda oluşan serbest oksijen radikalleridir. Bu anormal koşullarda antioksidan savunma sisteminin durumu büyük önem taşımaktadır. Özellikle enzimatik antioksidan sistemin kesintiye uğraması ve/veya oksidan stresi arttıran ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza (XO) proteolitik dönüşümü gibi faktörler doku hasarını hızlandırmaktadır. Bu bakımdan her iki sisteme yönelik, yani oksidan ara ürünlerin oluşumunu önleyecek ve antioksidan sisteme eksojen olarak katkıda bulunacak tedavi stratejileri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Ticari süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimlerinin yanında C ve E vitamini gibi suda ve yağda eriyen vitaminler de tedavinin bir parçası olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kuvvetli endojen antioksidanlar olan glutatyon (GSH), melatonin; XO inhibitörü olan allopurinol; son yıllarda antioksidan ve antienflamatuvar özellikleri ile ön plana çıkan kafeik asit fenetil ester (CAPE) denenen kimyasal bileşikler arasında yer almıştır.

Bu çalışmada iki ana hedefimiz vardır: i) iyi bir tedavi stratejisi geliştirebilmek için her şeyden önce I/R esnasında oluşan hasarın ilişkili olduğu düşünülen sistemlerde yaptığı değişikliklerin bütün boyutlarıyla ortaya konması gerekir. Bu yüzden enzimatik antioksidan sistemin ana öğeleri olan SOD, CAT ve GSH-Px; I/R hasarındaki rolü tartışmalı olan (hasardan koruyan veya hasarı arttıran) nitrik oksit (NO); I/R hasarında kesin bir tetikleyici mekanizma olarak kabul edilen ve dokuya lökosit invazyonunun bir göstergesi olan myeloperoksidaz (MPO); lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan malondialdehit (MDA); son olarak yine pürin katabolizmasında görev almakla birlikte oluşturduğu serbest radikal yan ürünler ile I/R hasarına katkıda bulunduğu birçok çalışmayla gösterilmiş olan XO enzimi tayinleri yapılacaktır. ii) I/R hasarını kısmen önlediği ispatlanmış E vitamininin kullanımını ile yine bir o kadar antioksidan etkinliği olduğu düşünülen ve aynı zamanda antiinflamatuvar ve immünomodülatör yönü ortaya konmuş olan CAPE'nin doku hücreleri ve lökosit aktivasyonu üzerine etkinliğini göstermek üzere karşılaştırmalı olarak çalışılacaktır. Ayrıca her iki kimyasal ajanın birinci maddede belirtilen parametreler üzerine etkisi araştırılacaktır.

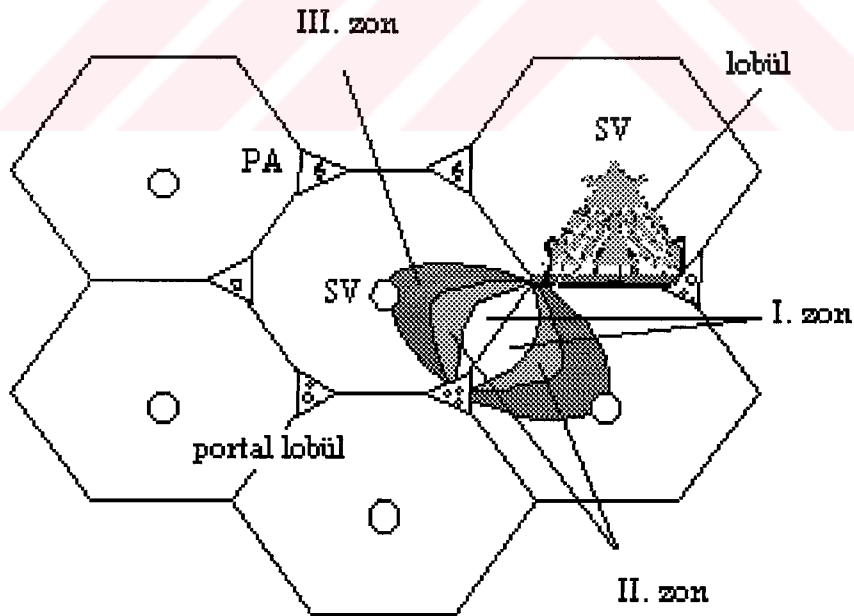
2 GENEL BİLGİLER

2.1 Karaciğerin fonksiyonel özellikleri

2.1.1 Karaciğerin fonksiyonel anatomi ve histolojisi

Karaciğer, diğer organ sistemlerinin aktivitelerini de ilgilendiren, çok önemli metabolik fonksiyonları üstlenmiş bir organdır. Karaciğerin temel fonksiyonları; barsaklardan özel bir damar sistemi ile gelen kandaki elemanların depolanması, vücudun metabolik yollarının büyük bir kısmının koordinasyon ve regülasyonu ve heme metabolizmasının ana ürünü olan bilirubin de dahil olmak üzere yağda eriyen birçok maddenin detoksifikasyonu ve atılımıdır. Kan proteinlerinin birçoğu, ayrıca sindirim ve emilim için gerekli olan safra asitleri de karaciğer tarafından sentezlenip salgılanır.

Karaciğerin kitlesinin yaklaşık %60'ını hepatosit veya parankim hücreleri, %30 kadarını ise retiküloendotelyal ağın bir parçası olan Kupffer hücreleri olacak şekilde iki ana hücre oluşturur. Karaciğerin yapısında portal yollar ve hepatik venin küçük kolları arasında ışınal olarak dağılan hepatosit kümesinden oluşmuş fonksiyonel birimler yer alır. Bu fonksiyonel birimler, eğer merkezleri portal yollar ise asinüsler veya merkezleri hepatik ven ise lobüller olarak adlandırılır (Şekil 1).



Şekil 1: Karaciğerin transfer kesim ile lobül ve hepatik asinüs zonları

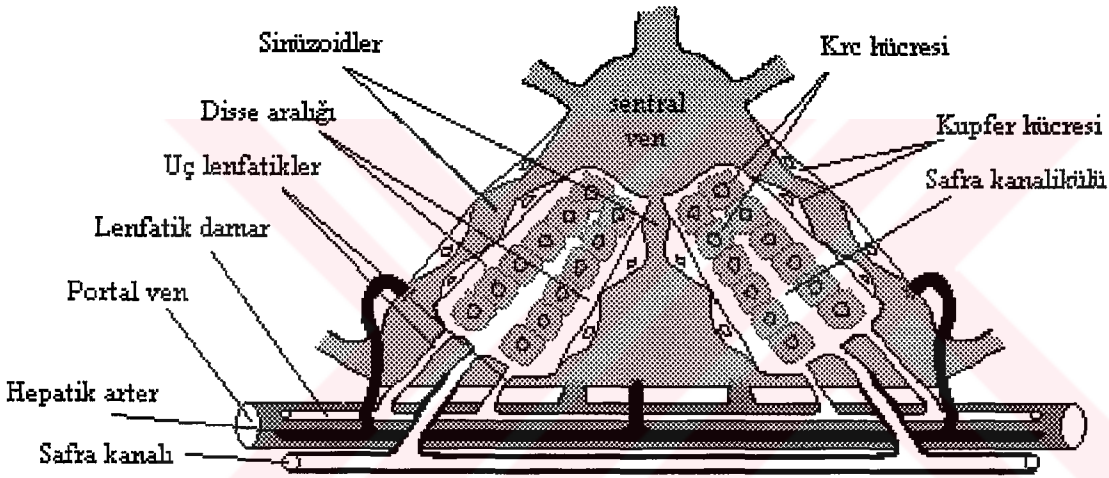
(PA: portal aralık, SV: sentral ven). (Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Temel Histoloji. Barış Kitabevi/Appleton & Lange, 1993. Kitabından uyarlanmıştır.)

Portal yollar; portal ven, hepatik arter ve safra kanaliküllerinden meydana gelir. Basınç farkından dolayı kan portal venlerden ve hepatik arterlerden sinüzoidler yoluyla

hepatik venlere doğru akar. Karaciğer lobülleri fonksiyon bakımından üç bölgede incelenebilir (Şekil 1).

Birinci bölge portal yollara en yakın kısım iken üçüncü bölge hepatik vene en yakın merkezi kısımdır. İkinci bölge ise ara pozisyonda yer alır. Kan sağlayan birinci bölge en yüksek, üçüncü bölge de en düşük oksijen ve besin içeriğine sahiptir. Birinci bölge hepatositlerinde glukoneogenez daha aktiftir ve daha fazla alkalen fosfataz ve transaminaz içerir. Üçüncü bölge ilaç metabolize edici enzimleri yüksek konsantrasyonda içerir; bu bölge viral, toksik ve anoksik karaciğer hasarına en çok maruz kalan bir bölgedir.

Karaciğerin fonksiyonel ünitesi birkaç milimetre uzunluğunda, 0.8-2 mm çapında ve silindirik yapıda olan karaciğer lobülüdür (Şekil 2).



Şekil 2: Karaciğer lobunun temel yapısı - transfer kesit (Tıbbi Fizyoloji [Guyton AC, Nobel Tıp Kitabevi, 1996] kitabından modifiye edilerek alınmıştır).

İnsan karaciğerinde 50000-100000 lobül bulunmaktadır. Karaciğer lobülleri hepatik venlere, oradan da vena kavaya boşalan bir santral ven etrafındaki yapılardan oluşur. Lobül ışınal tarzda santral venden etrafa uzanan hepatik hücresel plaklardan yapıldır. Her bir plak iki sıra hepatosit ile döşelidir. Hepatositler arasında bulunan küçük safra kanalcıkları, komşu karaciğer lobüllerini ayıran fibröz bölmeler içindeki safra kanallarına dökülmektedir (1).

Ayrıca fibröz bölmeler içindeki küçük portal venüller, portal venler yolu ile gastrointestinal kanaldan ayrılan venlerden kanlanmaktadır. Bu venüllerden kan, hepatik plaklar arasında dallanarak uzanan yassı hepatik sinüsoidlere, oradan da santral vene dökülmektedir. Böylece hepatositler devamlı portal ven kan akımına maruz kalırlar.

İnterlobüler septalarda portal venüllerden başka, hepatik arterioller de yer alır. Bu arteriyoller komşu lobüller arasındaki septal dokuların arteriyel kanını temin eder ve çoğu kez de interlobüler septalardan şekilde görüldüğü gibi doğrudan hepatik sinüsoidlere boşaltırlar (Şekil 2).

Hepatik hücrelerin yanı sıra venöz sinüsoidlerde tipik endotel hücreleri ve Kupffer hücreleri (retiküloendotelyal hücre) de bulunmaktadır. Bir makrofaj olan Kupffer hücreleri hepatic sinüs kanındaki bakteri ve diğer yabancı maddeleri fagosite ederler. Venöz sinüsoidleri çevreleyen endotel hücrelerinde yaklaşık 1 mikron çapında çok geniş porlar bulunmaktadır. Bu tabakanın altında, endotel hücreleriyle hepatositler arasında çok dar bir doku aralığı vardır; bu aralığa Disse aralığı adı verilmektedir. İnterlobular septalarda, milyonlarca disse aralığı lenfatik damarlara bağlanır. Bu aralardaki sıvının fazlası lenfatik kan akımı ile uzaklaştırılmaktadır. Endotelin büyük porları nedeniyle plazmadaki maddeler ve proteinler serbestçe disse aralığına geçebilir.

Hepatik vasküler sistemin fonksiyonu:

Karaciğer kan akımı; portal venden karaciğer sinüsoidlerine dakikada 1100 ml kan akışı olmaktadır. Buna hepatic arterden gelen 350 ml kan da ilave olarak karaciğere gelen kan miktarı dakikada ortalama 1450 ml olmaktadır. Bu miktar istirahat halinde kalbin bir dakikada pompaladığı kanın ~%29'una, toplam vücut kanının ise 1/3'üne tekabül gelmektedir.

Karaciğerin depo fonksiyonu; karaciğer genişleyebilen bir organ olduğu için, kendi kan damarlarında büyük miktarlarda kan depolayabilir. Normalde içerdiği kan volümü vücudun yaklaşık % 10'u kadar yani 450 ml civarındadır. Sağ atriyumda basınç yükseldiğinde genişleyerek 0.5 ile 1 litre ekstra kan hepatic venler ve sinüslerde depolanır. Bu fonksiyonundan dolayı kan hacmi azaldığında ekstra kan sağlama ve kan hacmi aşırı arttığında ise kan depolama görevi yapan büyük bir venöz organdır.

Barsak kapillerinde akan kanda barsaktan alınan birçok bakteri de mevcuttur. Portal ven ile karaciğere gelen kan hepatic venöz sinüslerde yer alan, büyük fagositik hücre olan Kupffer hücreleri kanı bakterilerden temizlemektedir (2).

2.1.2 Karaciğerin biyokimya ve fizyolojisi

Karaciğer bütün metabolik yolların aktif olarak çalıştığı bir organdır. Vücudun diğer bölgeleri için gerekli olan birçok madde sentezlenir, işlenir ve pek çok metabolik fonksiyonlar yürütülür.

Temel fonksiyonları (3)

Karbohidrat Metabolizması: 1) glikojenin depolanması: Monosakkaritler barsaktan emilerek karaciğerde depolanır, 2) galaktoz ve fruktozun glukozu veya glikoliz ara ürünlerine çevrilmesi, 3) glukoneogenezis: Sitrik asit siklusu ara ürünlerinden veya aminoasitlerden glukoz üretilmektedir. Vücudun enerji kaynağı olan kan glukoz düzeyinin devamını sağlamakta karaciğer fizyolojik tampon görevi üstlenmiştir.

Yağ Metabolizması: başlıca 1) hücreler için gerekli enerji temininde kullanılmak üzere yağ asitlerinin β -oksidasyonu, 2) lipoproteinlerin sentezlenmesi, 3) kolesterol ve fosfolipid sentezi ve 4) fazla karbohidrat ve proteinlerin yağa dönüşümü.

Vücutta karbohidrat ve proteinlerden yağ sentezi büyük ölçüde karaciğerde gerçekleşir. Karaciğerde sentezi yapıldıktan sonra triaçilgliseroller, lipoproteinler ile yağ dokusuna taşınarak depo edilir (4).

Protein Metabolizması: Başlıca fonksiyonları; 1) amino asitlerin deaminasyonu, 2) üre oluşumu ile amonyağın vücuttan uzaklaştırılması, 3) plazma proteinlerinin sentezi ve 4) ara ve ana metabolik yollarla önemli amino asit ve diğer maddelerin birbirine dönüşümü. Karaciğerde günde yaklaşık 50 gr protein sentezlenmektedir. Amino asitlerin kullanılabilmesi için deaminasyona uğratılmaları gerekmektedir. Vücutta ekstrahepatik deaminasyon işlemi ihmal edilebilecek kadar azdır. Gama globulinlerin bir kısmı dışında hemen bütün plazma proteinleri, karaciğer hücrelerinde yapılır. Bu ise plazma proteinlerinin yaklaşık %90'ını oluşturur.

Karaciğer üre oluşumu ile vücut sıvılarında mevcut amonyağı uzaklaştırır. Deaminasyon sonucu oluşan ve barsaklarda bakterilerce üretilen ve absorbe edilen amonyak kana karışmaktadır. Karaciğer fonksiyon bozukluklarında kan amonyak düzeyinin artması, toksik seviyelere ulaştığında hepatic ensefalopati tablosu ile kendisini gösterir.

Karaciğerin en önemli işlevlerinden biri de, bazı amino asitlerin sentezlenmesi ve amino asitlerden de önemli kimyasal bileşiklerin oluşturulmasıdır. Örneğin; esansiyel olmayan amino asitlerin hepsi karaciğerde sentezlenebilir (5).

Karaciğerin diğer metabolik fonksiyonları özetlenecek olursa:

a) Vitaminlerin depolanması: En fazla A vitamini olmak üzere D ve B12 vitaminleri de büyük oranda depolanmaktadır. Söz konusu depolama ile vücudun 3 ay ile 1 yıl vitamin ihtiyacını karşılaması mümkün olmaktadır.

b) Kan pıhtılaşmasındaki rolü: Koagülasyon işlev maddelerinin çoğu karaciğerde sentezlenir.

c) Demir Depolanması: Kandaki hemoglobin demirinin dışında, karaciğerde ferritin şeklinde depo edilir. Vücut sıvılarında demir miktarı arttığı zaman apoferritin ile birleşerek ferritini oluşturur. Demir düzeyi düşünce ferritin demiri serbestleşir.

d) İlaç, hormon ve diğer toksik maddelerin eliminasyonu: İlaçlar ve kimyasalların safra yolu ile atılımına ilâveten steroid ve aminoasit yapıda hormonlar da uzaklaştırılmaktadır.

e) Vücut kalsiyumunun fazlası da safra yolu ile feçesle atılmaktadır.

2.2 Karaciğerin iskemik patolojileri

Karaciğerin I/R hasarları iki ana başlık altında toplanmaktadır.

Bunlardan birincisi “**sıcak reperfüzyon**” hasarıdır. Bu hasar tipinde karaciğer damarları yani portal ven, hepatik arter ve hepatik venler tıkanmaktadır. Sıcak iskemi-reperfüzyon hasarı insanlarda hemorajik ve kardiojenik şok, endotoksemi, karaciğer cerrahisi, Budd-Chiari Sendromu ve karaciğer transplantasyonu durumlarında klinik öneme sahiptir (6). Sıçanlarda oluşturulan deneysel iskemi reperfüzyon hasar modelinde orta ve sol lateral lobları besleyen portal ven ve hepatik arterin klemplenmesi ile karaciğerin yaklaşık %70’inde iskemi oluşturulur (7). İskemiye takiben kan akımının sağlanması ile oluşan reperfüzyonda geri dönüşümsüz hücre hasarı karaciğer hücrelerinin ölmesi ile sonuçlanır. Bu hücre hasarının derecesini tespit etmek için kullanılan en önemli testler serumda transaminazlar ve laktat dehidrogenazdır (8).

İkinci I/R hasarı “**soğuk reperfüzyon**” hasarı olarak anılmaktadır. Transplantasyon amacıyla kullanılacak karaciğerler, cerrahi işlemden önce yaklaşık 24 saat genellikle Wisconsin Üniversitesi solüsyonu (UW) içinde soğuk iskemik depolama adıyla anılan bir metodla korunmaktadır. Bu solüsyon hücre şişmesini ve reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) üretimini azaltır, kalsiyum ve sodyumun hücreye alınımını önler ve ATP açığını kapatmak üzere substratlar sunar (9-11). Soğuk iskemik depolama işlevinin ve ardından gerçekleşen reperfüzyonun bir sonucu olarak karaciğerin hasara uğraması, transplantasyon yapılan hastanın ameliyat sonrası seyrinde orta veya ileri derecede problemler doğurur. Çoğu zaman primer graft’in fonksiyon görmemesinin en önemli sebebidir (12). İnsanlarda soğuk depolama/reperfüzyon hasarı, transplantasyondan sonraki bir hafta içinde akut immünolojik rejeksiyonu hızlandıran anahtar faktördür (13). İnsan karaciğerinin soğuk şartlarda depolanması durumunda safra kanalcıkları reperfüzyondan hemen sonra önemli değişiklikler gösterir (14).

2.2.1 Karaciğerde iskemi ve/veya reperfüzyon hasarı yapan nedenler

Karaciğer iskemisinin görüldüğü durumların başında günümüzde önemi gittikçe artan karaciğer transplantasyonu gelmektedir. Şimdiye kadar transplantasyon yapılan organlar arasında teknik açıdan en güç olanı şüphesiz karaciğer transplantasyonudur. Teknik özelliklerinin yanında karaciğerin metabolizmasının oldukça kompleks olması önemli sorunlara yol açar. Böbrek hastalıklarında dializin uygulanabilmesi gibi karaciğer için uygun bir koruyucu yöntemin olmaması transplantasyonu daha da güçleştirmektedir.

1963 yılında Starzl ve arkadaşları insanda ilk başarılı karaciğer transplantasyonunu gerçekleştirmişlerdir (15). Karaciğer transplantasyon sonrası 5 yıllık yaşam oranı bugün için % 70'ler civarındadır (%25-90).

Karaciğer prezervasyonunu uzun süre sağlamada Wisconsin Üniversitesinde geliştirilen solüsyon etkin bir yer almıştır. Wisconsin Üniversitesi solüsyonu (UW) ; sıcak ve soğuk iskemi ve reperfüzyon hasarının mekanizması ile ilgili karaciğer ve pankreasın prezervasyonunu olumlu yönde etkileyen, günümüzde en uzun süreli prezervasyonu sağlayan soğuk muhafaza solüsyonudur. Bu solüsyonda; K-laktabionat 100 mmol/L, KH₂PO₄ 25 mmol/L, MgSO₄ 5 mmol/L, Rafinoz 30 mmol/L, GSH 3 mmol/L, Adenozin 5 mmol/L, Allopurinol 1 mmol/L, Pentafraksiyon 50 g/L, Penicilin 200.000 Ü/L, İnsülin 40 U/L, Dekametazon 16 mg/L, Na 25 mmol/L, K 125 mmol/L bulunup, pH'sı 7.4 ve osmolalitesi 320 mOsm'dur (3). Diğer solüsyonların çoğu hipotermiye bağlı gelişen hücre şişmesini engellemek amacıyla yüksek konsantrasyonda membrandan geçmeyen maddeler (glukoz, mannitol, sitrat, fosfat, histidin ve sükroz gibi) ve pH'yı nötralize etmek için tamponlanmış sakkarit içeren solüsyonlardır. Bu solüsyon içinde bulunan laktobionat; okside edilmiş ve negatif yüklü bir laktoz olup, hipotermiye bağlı gelişen hücre şişmesini ayrıca kalsiyumu bağlayıcı etkisi ile de engellediği gösterilmiştir. Antioksidan olarak glutatyon eklenmiştir. Adenozin ise ATP sentezini stimüle etmektedir.

Transplantasyondan başka karaciğerde iskemi reperfüzyon hasarı ile ilgili karşılaşılan ikinci önemli durum; tümörler başta olmak üzere bazı karaciğer hastalıklarının cerrahi tedavisinde gerekli olan kan akımını kesme girişimleridir. Cerrahi girişimin yapıldığı karaciğer lobu, ameliyat esnasında oksijensiz kalmaktadır. Bu yüzden ameliyatın süresine bağlı olarak karaciğerde iskemik, kanlanma sağlandıktan sonra da reperfüzyon hasarı oluşabilmektedir (16). Ayrıca dolaşım yetmezliğine bağlı şok durumlarında anoksiye hayli duyarlı olan karaciğer müdahalenin gecikmesi ile orantılı olarak oksijensiz kalmakta ve iskemik hasar oluşmaktadır (17,18).

2.2.2 Karaciğerde iskemi-reperfüzyon hasar mekanizması

Herhangi bir dokunun kan akımı kesildiğinde birbiri ardı sıra kimyasal bazı reaksiyonlar gelişir. Bu reaksiyonlar sonucu hücrel disfonksiyon, hücrel ve interstisyel ödem, ve sonuç olarak hücrel kaos ve ölüm meydana gelir. Hücrelerin canlılığının ve fonksiyonunun devam edebilmesi için gerekli olan temel yakıtın eldesinde oksijen merkezi bir role sahiptir. Aerobik metabolizmalar normal hücre fonksiyonu için gerekli olan enerjiyi yüksek enerjili fosfat bağları şeklinde depo ederler. Oksijen yokluğunda anaerobik metabolizma devreye girer ve lokal olarak ilgili dokuda laktik asit konsantrasyonu artar

(19). Sonuçta ortaya çıkan asidoz, hücrelerdeki normal enzim kinetiklerini değiştirir, daha az miktarda yüksek enerjili bağlar oluşturulur. Homeostazın korunması için gerekli enerji sağlanamaz (20). Karaciğer dokusunun iskemiye olan duyarlılığı baz kabul edilirse iskelet kası daha az duyarlıdır ve saatler içerisinde iskeminin etkilerinden kurtulabilir. Oysa beyin ve sinir sistemi ise aşırı duyarlılığa sahiptir, dakikalar içerisinde irreversible nöron hasarı gelişmektedir.

İskemik dokunun tekrar kan akımı ile oksijenlenmesi bu doku için faydalı sonuçlar doğurmaktadır. Örneğin enerji kaynağı tekrar sağlanmakta ve toksik metabolitler uzaklaştırılmaktadır. Bu yüzden iskemik hasarın iyileştirilmesinde reperfüzyon mutlaka gereklidir. Bununla beraber iskemik dokuda oluşan toksik metabolitlerin sistemik dolaşıma geçmesi ciddi metabolik bozukluklar doğurabilir. Ayrıca oksijenin iskemik doku tabanında oluşan bazı metabolitlerle reaksiyona girmesi sonucu dokuda daha ileri hasarlar meydana gelebilmektedir. Buna reperfüzyon hasarı adı verilmektedir (21). Kısa bir iskemik periyottan sonra sağlanan reperfüzyondan sonraki hasar çok zararlı olmasa da uzun süreli iskemilerden sonra oluşturulan reperfüzyonda hasar oldukça büyüktür.

Reperfüzyon hasarı aslında iskemi sırasında oluşan hasarın ve hücre aktivasyonunun amplifikasyonu sonucu meydana gelmektedir. Son araştırmalar göstermiştir ki karaciğer reperfüzyon hasarı karaciğer ve karaciğer dışı mekanizmalar sonucu oluşturulan kompleks bir olaydır (22). *In vivo* olarak hem sıcak hem de soğuk iskemiden sonra oluşan erken reperfüzyon hasarının patolojik mekanizmasında Kupffer hücrelerinin aktivasyonu önemli bir yer tutmaktadır (23,24). Kupffer hücreleri hipoksiden sonra oluşan reoksijenasyonda kolaylıkla aktive olabilmektedirler. Ayrıca bu hücrelerin *in vivo* şartlarda aktivasyonu kompleman sisteminin uyarılması ile hızlandırılmaktadır (25).

2.3 Serbest Oksijen Radikalleri

2.3.1 Serbest oksijen radikal kaynakları

Serbest oksijen radikallerinin iki önemli kaynağı vardır :

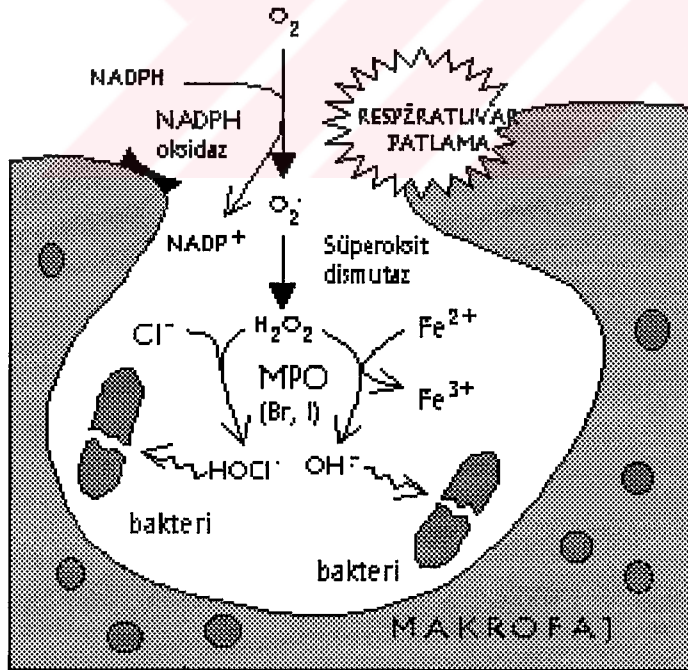
A) Eksojen kaynaklar

- Radyasyon etkisi
- Bağışıklık yapan maddeler: alkol, uyuşturucu vs
- Ksenobiyotikler: hava kirliliği, hiperoksi, pestisitler, solventler, anestezi maddeler, aromatik hidrokarbonlar, sigara dumanı vs
- Antineoplastik ajanlar

- Stres; streste katekolamin düzeyi artıp, artan katekolamin oksidasyonu ise radikal üretimi artmaktadır.

B) Endojen kaynaklar

- Mitokondrial elektron transportu
- Peroksizomlar
- Enzimler ve proteinler; XO, triptofan dioksijenaz, hemoglobin vs
- Küçük moleküllerin otooksidasyonu; tioller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidroproteinler, antibiotikler vs
- Endoplazmik retikulum ve nükleus membran elektron transport sistemleri (sitokrom p-450)
- Plazma membranı enzimleri; NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz, lipid peroksidasyonu vs
- Oksidatif stres durumları (iskemi, travma, intoksikasyon gibi durumlara bağlı olarak)
- Fagositik aktivasyonu (respiratory burst= solunumsal patlama) (Şekil 3).

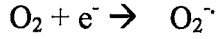


Şekil 3: Nötrofil fagositozu ve fagozom içindeki bakterinin parçalanması için esansiyel olan Myeloperoksidaz sistemi. (MPO; myeloperoksidaz, HOCl; hipoklorat, OH⁻: hidroksil radikali) . [Biyokimya-Lippincott's Illustrated Review Serisinden (Nobel Tıp Kitabevi; 1997) modifiye edilmiştir. (MPO; myeloperoksidaz, HOCl; hipoklorat, OH⁻: hidroksil radikali)]

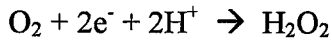
2.3.2 Serbest oksijen radikal türleri

Serbest radikaller ortaklanmamış elektron taşıyan kimyasal bir yapı olarak tarif edilmektedir. Serbest radikaller, bir molekülün bir parçası olarak da kabul edilebilir.

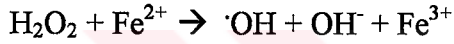
Biyolojik ortamlardaki en önemli serbest radikaller şüphesiz oksijen radikalleridir. Tek bir elektronun transfer yoluyla oksijene verilip redüklenmesi süperoksit serbest radikal anyonunu (süperoksit, O_2^-) oluşturmaktadır.



Oksijenin 2 elektronla redüklenmesi ise hidrojen peroksiti (H_2O_2) oluşturur.



Hidrojen peroksit, serbest radikal biyokimyasında önemli bir bileşiktir. Çünkü geçiş metal iyonlarının varlığında kolaylıkla parçalanıp oksijen radikallerinin daha reaktif ve biyolojik sistemlerde daha fazla hasar oluşturan hidroksil radikalini ($\cdot OH$) oluşturur.



Bu ifade edilen reaksiyon demir katalizli Haber-Weiss (Fenton) reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır.

2.3.2.1 Süperoksit radikali (O_2^-):

Serbest radikal olmasına rağmen hasar oluşturucu bir tür değildir. Asıl önemi; hidrojen peroksitin kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının redükleyicisi olmasıdır. $NO\cdot$ ile reaksiyona girerek peroksinitriti ($ONOO^-$) oluşturur. Süperoksit, düşük pH'da daha reaktif olan perhidroksil radikaline (HO_2^-) protonlanır, fakat fizyolojik pH'da bu form %1'in altındadır.

2.3.2.2 Hidrojen peroksit (H_2O_2):

Okside edici bir ajan olup reaktif değildir. Asıl önemi; geçiş metal iyonlarının varlığında hidroksil radikallerini oluşturmasıdır. Metal katalizörlerin yokluğunda süperoksit ve hidrojen peroksit kolaylıkla uzaklaştırılır ve zararsız hale getirilir.

2.3.2.3 Hidroksil radikali ($\cdot OH$):

Hemen hemen bütün biyomoleküllerle reaksiyona girebilen yüksek reaktivitesi olan bir ajandır. Reaksiyona girmeden önce hücrede difüze olması güçtür çünkü çok kısa ömürlüdür. Fakat küçük miktarları bile üretildiği yerde aşırı hasar yapabilecek kapasitededir.

2.3.2.4 Singlet oksijen (1O_2):

Bir radikal olmayıp, sıklıkla serbest oksijen radikalleriyle birlikte anılan reaktif oksijen türüdür. Serbest radikal reaksiyonlarıyla üretilebilir.

2.3.2.5 Karbon merkezli radikaller (R \cdot):

Lipid, nükleik asit, karbohidrat veya protein gibi biyolojik bir molekülü okside edici bir radikalin etkilemesiyle oluşur (örneğin OH \cdot). Bunlar oksijen molekülü ile birlikte çok hızlı bir şekilde ilgili peroksil radikallerini (ROO \cdot) oluşturmak üzere birleşirler. Diğer taraftan bu peroksil radikalleri, alkoksil radikalleri (RO \cdot) üreten reaksiyonlara karışabilir. Sülfür atomları, yeni bir serbest radikal üretimi [thiyl (tiyo) radikaller, RS \cdot] için kaynak olabilir.

2.3.3 Serbest radikallerin hücresel yapılara etkileri

2.3.3.1 Lipidlerde meydana gelen yapısal değişiklikler:

Hücre membranları, okside edici radikallerle kolaylıkla etkilenebilen poliansatüre yağ asitlerince (PUFA) zengindir. Lipid peroksidasyonu olarak da bilinen PUFA'nın oksidatif hasarı, sonuçta kendi kendine zincir reaksiyonları başlatarak işin kendiliğinden devam etmesine yol açar. Sonuçta oluşan peroksil radikalleri (LOO \cdot) zincir reaksiyonunun bir aracı olup bir sonraki PUFA'yı okside ederek yeni zincir reaksiyonları başlatırlar (26). Bu işlemlerin sonunda oluşan ürün hidroperoksitlerdir (LOOH) ve bunlar da daha şiddetli radikal özelliği olan türlere, özellikle aldehitlere çevrilirler. Aldehitler daima lipid hidroperoksitler parçalandığı zaman oluşurlar ve çoğu biyolojik olarak aktiftirler. Bunlardan en çok bilineni 'hidroksialkenoller'dir ve bunun da 4-hidroksinonenal üyesidir (27,28). Bu bileşikler normal olarak oluştukları yerden diffüze olarak hücrenin diğer kısımlarına gidip hasar oluşturabilirler.

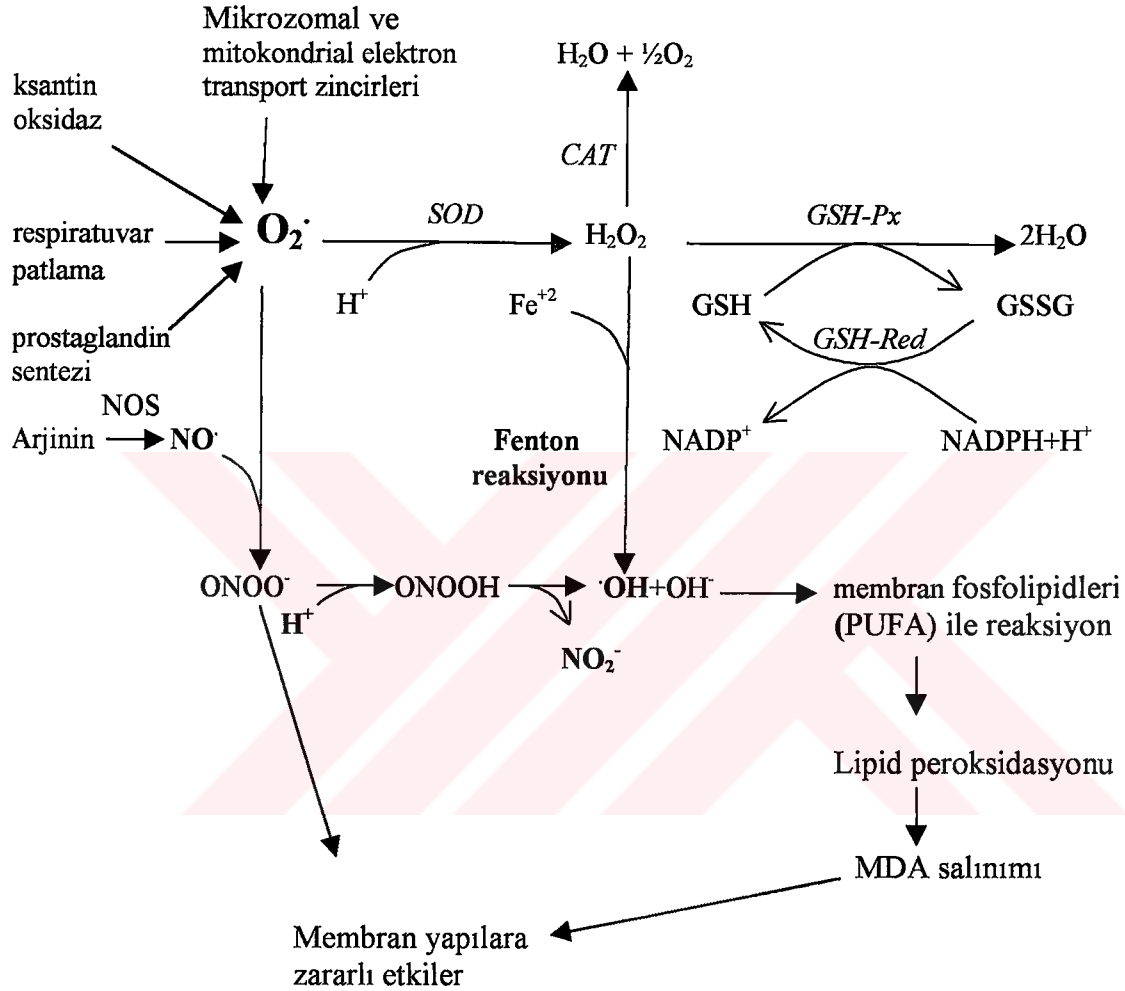
2.3.3.2 Proteinlerde ve Nükleik Asitlerde meydana gelen yapısal değişiklikler:

Protein ve nükleik asitler serbest radikal saldırılarına PUFA'lerden daha az duyarlıdır. Çünkü bunlarda hasar oluşturucu zincir reaksiyonlarının oluşma ihtimali çok zayıftır. DNA, okside edici radikaller tarafından kolaylıkla hasara uğratılabilmektedir. Bunun şartı radyasyon biyologlarınca da açıkça gösterildiği üzere radikallerin DNA'ya yakın bölgelerde meydana gelmeleridir. Proteinlerde olduğu gibi hızlı zincir reaksiyonlarının olma ihtimali çok azdır (29).

2.3.4 Enzimatik ve nonenzimatik antioksidan sistemler

2.3.4.1 Enzimatik antioksidanlar

Belli başlı tanınmış antioksidan enzimler, SOD, CAT ve GSH-Px'dir (30,31) (Şekil 4).



$O_2^{\bullet-}$: süperoksit anyon radikali, O_2 : moleküler oksijen, H^+ :hidrojen iyonu, proton, H_2O : su, SOD: süperoksit dismutaz, CAT: katalaz, H_2O_2 : hidrojen peroksit, GSH-Px: glutatyon peroksidaz, GSH: redükte glutatyon, GSSG: okside glutatyon, GSH-Red: glutatyon redüktaz, $NADPH+H^+$: redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, $NADP^+$: okside nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, Fe^{+2} : ferro demir, $\bullet OH$: hidroksil iyonu, $\bullet OH$: hidroksil radikali (en fazla potent serbest oksijen radikali), NOS: nitrik oksit sentaz, NO^{\bullet} : nitrik oksit radikali, $ONOO^{\bullet}$: peroxinitrit, MDA: malondialdehit (membran fosfolipitlerinin lipid peroksidasyonunun son ürünü), NO_2^- : nitrit, PUFA: poliansatüre yağ asidi.

Şekil 4: Hüresel antioksidan enzim sistemi ve lipid peroksidasyon zincirini gösteren şema (Herken et al., Mol Psychiatry (2001) dergisinden modifiye edilerek alınmıştır.)

Süperoksit Dismutaz: Süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit'e dismutasyonunu katalizleyen enzim grubudur. Katalizlediği reaksiyon şu şekildedir;



Metal ihtiva ettiği için metalloenzim grubundandır. İnsanda Cu, Zn-SOD ve Mn-SOD ilk defa 1969 yılında McCord ve Fridovic tarafından tanımlanmıştır (32). Ökaryotlarda en son 3 SOD izoformu tanımlanmaktadır. Bunlar ekstrasellüler SOD (ec-SOD), sitoplazmik SOD (Cu, Zn-SOD) ve mitokondrial SOD (Mn-SOD)'dur (33). Cu,Zn-SOD; hücrenin sitoplazmasında bulunur. Molekül kütlesi 32.000 daltondur. İki alt ünitesi vardır ve bunların her birinde bir Cu ve bir Zn atomu bulunmaktadır. Mn-SOD ise mitokondrial bir enzimdir. Prokaryotların sitozolünden elde edilebilmektedir. İlk kez 1970 yılında Keele ve ark. tarafından izole edilmiştir (34). 23.000 dalton ağırlığındadır. Buradaki Mangan +3 değerlidir. İki alt birimden yapılmış olup her alt birimde bir Mn atomu vardır.

Glutasyon peroksidaz: İlk kez memeli eritrositlerinde Siddons ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (35). Prostetik grup olarak Selenyum (Se) taşımaktadır. Bu yüzden metalloenzim grubunda değerlendirilir. Hidrojen peroksidin *in vitro* detoksifikasyonunu yüksek spesifite ile katalizlemektedir. Katalizleme sırasında redükte glutasyon okside glutasyona çevrilmektedir. Reaksiyon şu şekildedir;

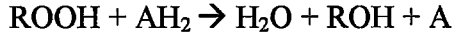
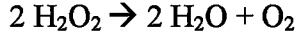


Lipid peroksidlerinin indirgenmesini de katalizlerler (36).

Katalaz: 1901 yılında tabiatı yaygın bir şekilde yer aldığını Leew ve arkadaşları belirlemiştir (37). İlk defa 1937'de Sumner ve Dounce (38) tarafından karaciğerden kristal formda elde edilmiştir. Molekül kütlesi 240.000 daltondur. CAT, glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Dört alt üniteden oluşmuştur. Bu alt üniteler ferriprotoporfirin grubu şeklindedir. Yani prostetik grubunda Fe⁺³ bulunan protoporfirin IX bulunmaktadır. Doku katalaz aktiviteleri büyük farklılıklar gösterir. En yüksek aktivite karaciğer ve böbrekte saptanmıştır. En az aktivite ise destek dokusunda gözlenir. Dokularda esas olarak mitokondri ve peroksizom partiküllerine bağlı olarak bulunur. Ayrıca sitoplazma ve endoplazmik retikulumda da aktivitesi vardır. Oksidazların aktivitesi ile oluşan H₂O₂'i direkt olarak suya çevirir. H₂O₂'in konsantrasyonunun aşırı arttığı ortamlarda aktivite gösterir. Düşük H₂O₂ konsantrasyonlarında diğer enzimler (glutasyon peroksidaz gibi) devreye girer (39).

GSH-Px ile aynı etkiyi gösterir. Fakat hücre içi dağılımı açısından farklılık söz konusu olup, GSH-Px esas olarak mitokondri ve sitozolde aktif iken katalaz peroksizomlarda aktiftir.

Katalizlediği reaksiyon şu şekildedir;

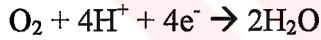


(ROOH: metanol, etanol, formik asit, fenoller gibi bir elektron vericisidir.)

Glutasyon Redüktaz: Okside glutasyonun, redükte glutatyona dönüşümünü sağlayarak dolaylı antioksidan etki göstermektedirler.

Glutasyon-S-transferaz: Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynarlar. Lipid peroksitlerine karşı (Se bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek) bir savunma mekanizması oluştururlar (26).

Mitokondrial Sitokrom Oksidaz: Süperoksit radikalının *in vivo* olarak oluştuğu major yollar mitokondri ve mikrozomal elektron transport sistemleridir. Mitokondrial elektron transportunda normal şartlar altında bir moleküler oksijene 4 elektron aktarılarak 2 molekül su oluşturulur:



Sitokrom oksidaz, kısmen elektronlanmış oksijenleri aktif merkezinde sıkıca tutar, böylece elektron sızıntısını minime indirmiş olur. Dolayısıyla buradaki konumu bir antioksidan özellik arz etmektedir. Eğer kısmî olarak elektronlanmış oksijen atomlarını (serbest radikal) yapısında tutmamış olsa, ortamda oksidatif stres artacaktır.

2.3.4.2 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar:

E Vitamini: Membranların lipid kısmında ve ekstrasellüler sıvılarda bulunur. Lipid peroksitleri inaktive eder ve lipid peroksit zincirini kırarak lipid peroksidasyonu tepkimelerini engeller.

C vitamini: Hücre dışı sıvılarda bulunur. Süperoksit ve hidroksil radikalının doğrudan temizleyicisidir.

β-Karoten: Vitamin A öncülü olup, membranlarda bulunur. Temizleyicidir ve peroksitlere direkt etkisi söz konusudur.

Seruloplazmin: SOD benzeri bir etki gösterdiği düşünülmektedir. Ferro demiri yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece serbest radikal oluşumunu inhibe eder.

Transferrin: Dolaşımdaki serbest demiri bağlar.

Ürik asit: Normal plazma konsantrasyonlarında süperoksit, hidroksil ve peroksil radikallerini temizler.

Albümin: Geçiş metallerini bağlar, lipid hidroperoksit (LOOH) ve hipoklorit (HOCl) toplayıcısıdır.

Bilirubin: Serbest radikal tutucusudur, süperoksit ve hidroksil radikal toplayıcısıdır.

Glutasyon: Karaciğerde, genetik bilgiye gerek olmadan glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptiddir. Çok önemli bir antioksidan olan glutasyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Ayrıca proteinlerdeki, -SH gruplarını da redükte halde tutarak oksidasyondan korur.

Sistein: Serbest radikal ve hipoklorit toplayıcısıdır.

Taurin: Ksenobiotiklere bağlanır. Hipoklorit ile reaksiyona girer.

Glukoz: Hidroksil radikal tutucusudur.

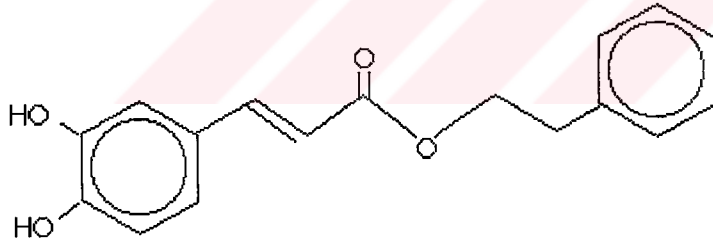
Piruvat: H_2O_2 tutucusudur.

Hemoglobin oksidanları, haptoglobin hemoglobini, hemopeksin de serbest hemi bağlayarak antioksidan özellik göstermektedir.

Melatonin: Pineal bezden salınan indolamin yapısında bir hormon olup OH⁻ radikalini ortadan kaldıran etkin bir antioksidandır (26).

2.3.5 Kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in yapısı ve özellikleri

Son yıllarda doğal bazı maddelerin tıbbi özelliklerine yönelik artan bir ilgi vardır. Özellikle bitki, bal ve propolis gibi arı ürünleri bu ilginin merkezi konumundadır. CAPE yapıca flavonoidlere benzeyen bal arısı propolisinin aktif bir bileşenidir (Şekil 5).



Şekil 5: Kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in kimyasal yapısı.

Antiviral, antienflamatuvar ve immünomodülatör özelliklerinin yanı sıra transforme olmuş farklı tipte hücrelerin büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur. CAPE, propolis bileşenleri içinde araşidonik asit kaskadını en potent şekilde modüle eden bir ajandır (40). Bhimani ve arkadaşları HeLa hücrelerinde 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) ile indüklenmiş oksidatif stres üzerine CAPE'nin etkisini araştırmışlar ve kültür ortamında 25 mikromol konsantrasyonda okside baz ürünlerinde ve hidrojen peroksit üretiminde azalma tespit etmişlerdir (41). Böylece kanserden önleyici bir ajan olarak kabul edilebileceğini belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada deriden TPA uygulanması ile meydana gelecek tümör oluşum ve ilerlemesi ile farenin derisindeki DNA'da meydana gelecek okside baz ürünleri potent bir şekilde inhibe edilmiştir (42). Bunların yanında hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak yapılan çalışmalarda CAPE'nin transforme olmuş hücrelerde sitostatik, dolayısıyla

karsinostatik özellikleri olduğu (43,44) fakat normal hücrelerin büyümesini değiştirmedeği gösterilmiştir. Son olarak tavşanlarda CAPE'nin lens epitel hücrelerinin transformasyonunu baskılayarak posterior kapsül opasifikasyonunu (PCO) önlediği, böylece ekstrakapsüler katarakt ekstraksiyonu ve intraoküler lens implantasyonu sonucu ortaya çıkabilecek bu önemli komplikasyonun normal hücrelere hiçbir zararı olmayacak şekilde CAPE tarafından önlenebileceği ileri sürülmüştür (45).

2.3.6 Karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarında ileri sürülen stratejiler

2.3.6.1 İskemi-reperfüzyon hasarında serbest radikaller

Serbest radikal bir veya birden fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden stabil olmayan bir molekül olarak tarif edilmektedir (46). Moleküler oksijenin indirgenmesi veya uyarılması sonucu birkaç serbest oksijen radikali oluşmaktadır. Bunlardan süperoksit; mitokondrial, endoplazmik retikulum, membran elektron transport işlemleri, hemoglobin, aldehid oksidaz ve XO tarafından üretilen bir yan üründür. *In vivo* olarak süperoksit oluşumu hemen hemen tamamen hidrojen peroksit üretiminde artmayla birliktedir. Hidroksil radikali demirin rol aldığı Haber-Weiss (Fenton) reaksiyonu yoluyla üretilmektedir. Bu radikal biyolojik sistemlerdeki en reaktif serbest radikaldir ve lipid peroksidasyonu, sitokrom enzimlerin inaktivasyonu, membran transport proteinlerindeki değişiklikler ve sülfidril gruplarının oksidasyonu gibi yıkıcı olaylardan sorumludur (47). Daha önce bahsedildiği gibi biyolojik sistemlerde serbest radikal üreten birkaç mekanizma tanımlanmıştır. Mitokondrial elektron transport zincirinde fizyolojik olarak sızma tarzında küçük miktarlarda serbest radikaller oluşturulmaktadır. Patolojik süreçlerde ise serbest radikaller XO metabolizmasından, aktive olmuş nötrofillerden, katekolamin oksidasyonundan (48), endotel hücrelerinden (49) ve prostaglandinlerden üretilmektedir (50). İskemi reperfüzyon esnasında süperoksit üretiminin mekanizması en detaylı olarak Welbourn ve ark. tarafından ortaya konmuştur (51). Postiskemik dokudaki serbest radikallerin esas kaynağı XO enzimidir. İskemi esnasında ilgili dokuya demir iyonu girişi olur. Reperfüzyon gerçekleştiği takdirde süperoksit ve hidrojen peroksit üretilir. Süperoksit serbest ferröz demirin (Fe^{+2}) ferritinden salınımını arttırır (52). Böylece fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksitten bol miktarda hidroksil radikali oluşur.

Karaciğer iskemisini takip eden hem akut hem de subakut reperfüzyon fazında ROS üretilebilir. Reperfüzyonun akut fazında ROS; protein oksidasyonu ve yıkılımı, lipid peroksidasyonu ve DNA hasarı üzerinden direkt hücresel hasar oluşturur (53). Bütün bu akut redoks hasar çeşitleri daha sonra sinyal iletim yollarına aktive ederek subakut hasarın

başlamasına yol açabilir (54). Hasarın subakut fazı esnasında proenflamatuvar sinyal iletim kaskad'ının akut-faz aktivasyonu ile üretilen sitokinler nötrofillerin alıkonmasına ve hasarlı dokunun hasarının daha da artmasına sebep olur. Ayrıca subakut faz esnasında nötrofillerden sekrete edilen proenflamatuvar sitokinler reseptör aracılı yollar ile hasarlı dokuda hücre içi ROS üretimini arttırarak organ hasarını derinleştirirler (55).

2.3.6.2 İskemi-reperfüzyon hasarında sitokinler

Aktive Kupffer hücreleri (KH) damar lümenine ROS salarak sitokinleri uyarır. Bunlar da beraber sinüzoidlerde granüosit toplanmasına ve mikrosirkülasyonda bozulmaya yol açarlar (56,57). KH aktivasyonu ve sonradan gelişen vasküler enflamasyon ekstrahepatik mekanizmalar tarafından hızlandırılabilir. En önemli faktör KH'nin endotoksinler tarafından uyarılmasıdır (58,59). KH'nin potent aktivatörü olan endotoksinler portal damarın klempleme zamanına bağlı olarak oluşan intestinal konjesyon neticesinde barsaklardan geçmektedir (60). Bu olay aynı zamanda transplantasyon sonrasındaki greft rejeksiyonuna neden olmaktadır (61,62). Hatta son bilgiler dalağın hepatik reperfüzyon hasarına katkısı olan bir organ olduğunu ortaya koymaktadır. Çünkü splenektomi TNF- α oluşumunu arttırmakta ve reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olmaktadır (63). Bu bulgular karaciğer dışı TNF- α üreten kaynakların olduğunu veya dalaktan gelen uyarıların reperfüzyon süresince aktive KH tarafından TNF- α üretiminde rol alabileceğini göstermektedir. ROS'un KH'lerini kendiliğinden uyarabileceği ve KH üzerinden hasar oluşturabileceği ileri sürülmektedir. Deneysel veriler ROS'un, endotel hücrelerinden ve monositlerden platelet aktivasyon faktör (PAF) (64), interlökinler ve TNF- α (65) salınımını uyardığını göstermiştir. Hatta ROS hücre dışı faktörlerle regüle edilen kinazları (ERK) uyararak mitojenle uyarılan protein kinazları modüle etmektedir (66). Rat karaciğer transplantasyonlarında reperfüzyon anında ERK aktivitesi geçici olarak artmakta, bu artış aktivatör protein 1'in (AP-1) komponenti olan c-jun N-terminal kinaz (JNK)'ın uzun süren indüksiyonunu sağlamaktadır (67,68). Ayrıca ROS, soğukta saklanmış fare karaciğerlerinde reperfüzyondan sonra nükleer faktör NF-(kappa) B aktivasyonu üzerinden TNF- α 'nın ve IL-10'un salınımını uyarmaktadır (65). Yine, karaciğerden kaynaklanan ROS, endotel hücre ve hepatositlerde yükseltgenme ve indirgenmeye duyarlı transkripsiyon faktörleri AP-1 ve NF-(kappa) B'yi aktive etmektedir (69,70). Ayrıca proenflamatuvar genleri de (71) regüle ettiğinden her iki transkripsiyon faktörü koruyucu ve rejenera edici fonksiyonlarıyla (72,73) bu faktörlerin aktivasyonunun I/R hasarı üzerine etkisi henüz aydınlatılmamıştır.

2.3.6.3 İskemi-reperfüzyon hasarında lökosit invazyonu ve myeloperoksidaz

Nötrofiller ihtiva ettikleri granülleri içinde kırkdan fazla hidrolitik enzim ve bazı toksik moleküller içerirler. Süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hipoklorid asit ve kloramin gibi birçok oksidan ajan üretebilirler (74). Çok sayıdaki bu toksik moleküllerin bu hücrelerde bulunmasının önemi muhtemelen bu hücrelerin antimikrobial aktivitelerinden kaynaklanmaktadır. Bu ajanlar eksojen mikroorganizmaları ve doku yapılarını birbirinden ayırt edemedikleri için potansiyel histotoksik aktiviteleri aynı zamanda vücut yapılarına karşı da kullanılır. Nötrofillerdeki oksidan ajan üreten NADPH oksidaz enzimi hedef ile irtibat kurmuş nötrofillerin membran bölgesinde bulunmaktadır. Aynı membran bölgesi ayrıca azirofil granüllerinin ekzositozunda da görev almaktadır. Böylece hedef opsonize olmuş mikroorganizmalar gibi fagosite edilebilen partiküller tarafından sunulursa hedefin bağlanması intrastoplazmik bir fagozomun oluşumu ile sonuçlanır. Bu durumda nötrofilin hedefi fagozom içinde hapsedilmiş olur. Fagositoz olduktan sonra, nötrofil hücre membranında yerleşmiş olan NADPH oksidaz sistemi çevreden sağlanan moleküler oksijeni süperoksite dönüştürür. Süperoksit oluşumuna kaynak olan moleküler oksijenin hızlı tüketimi “respiratuvar patlama” olarak adlandırılır. Daha sonra süperoksit, SOD etkisi ile H₂O₂'ye dönüştürülür. Fagolizozomda bulunan lizozomal enzimlerden MPO varlığında peroksit ve klorür iyonları bakteriyi lize eden hipokloröz (HOCl)'e dönüştürülür. Fazla peroksit ise daha önce bahsedildiği gibi CAT veya GSH-Px ile nötralize edilir. Böylece fagosite edilmiş olan mikroorganizmalar civar dokulara minimal risk teşkil edecek şekilde elimine edilir (75) (Şekil 3).

Eğer nötrofil sindirebileceğinden daha fazla sayıda hedef ile karşılaşırsa fagozom oluşumu esnasında yıkıcı granül içerikleri ve oksijen metabolitleri ekstrasellüler kısma taşar. Bu durum “sindirim esnasında kusma” olarak adlandırılır ve genellikle fagositoz esnasında görülen nötrofil kaynaklı doku hasarından sorumludur. Dokular inflamasyonla karşılaştıklarında nötrofiller tam aktive olarak süperoksit anyonu üretirler. Bu durumda süperoksit makrofajlar, fibroblastlar ve endotel hücreleri gibi doku hücreleri ve damar dışına çıkmış nötrofiller tarafından üretilen nitrik oksit ile reaksiyona girer (76). Bu reaksiyonun sonunda çok kuvvetli bir mikrobisidal ve sitotoksik bileşik olan peroksinitrit üretilir. Ayrıca süperoksit hızla hidrojen peroksite dismute edilebilir. Bu bileşik yükü olmaması ve düşük reaktivitesi nedeni ile kolaylıkla enflamasyonlu dokuya difüze olabilir. Oluşan hidrojen peroksit havuzu nötrofil ve makrofajların lokal sayısına ve aktivasyon derecelerine bağlıdır. Nötrofillerde bulunan mieloperoksidaz substrat olarak hidrojen peroksiti kullanarak hipoklorik asiti oluşturur. Diğer bir ifade ile nötrofiller zayıf bir okside edici ajan olan

hidrojen peroksiti daha kuvvetli bir oksidan olan hipoklarata çevirir. Bu bileşik nötrofilik enflamasyon esnasında üretilen en toksik ajandır (77) (Şekil 3).

Karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisinde nötrofillerin rolü olduğu ilk defa nütropenin faydalı etkisi görüldüğünde anlaşılabilmiştir (78). Son dönemlerde bulunan delillerle nötrofil kaynaklı hasarın Kupffer hücreleri kaynaklı hasardan saatler sonra başladığı gözlenmiştir. Örneğin nütropeni (nötrofil sayısını %60 azaltılması) reperfüzyondan sonraki ilk 5-6 saat esnasında hasardan korumamaktadır (78). Bu sonuçlar en son yapılan bir çalışmada karaciğerde endotoksemi esnasında nötrofillerin yalnızca %30'unun migrasyona uğradığı ve hasara katkı yaptığı bulgusu ile desteklenmiştir (79). Bütün bu bulgular nötrofillerin iskemik dokuya yeniden akımın sağlandığı andan itibaren birkaç saat sonra hasara katkı yaptığı hipotezini kuvvetle desteklemektedir. Bir hepatosite bir nötrofilin hasar verebilmesi için nötrofilleri karaciğere hapseden mediatörlerin üretilmesi, adhezyon moleküllerinin arttırılması ve nötrofil migrasyonunun ve parankim hücrelerine geçişin arttırılması gerekmektedir (80).

2.3.6.4 İskemi-reperfüzyon hasarında ksantin dehidrojenaz → ksantin oksidaz dönüşümünün rolü

XO sistemi memelilerde iskemi reperfüzyon hasarını takiben ROS üretiminin en önemli kaynaklarından biri olarak kabul edilir. Bu sistemin vücutta en yoğun olduğu organlardan biri de karaciğerdir (81). Ksantin dehidrojenaz (XDH) ve XO, ksantin oksidoredüktazın iki ayrı formudur. Hem XDH hem de XO hipoksantin ksantine, ksantin de ürik aside dönüşümünü katalize eder. Bunlardan XDH elektronları tercihen NAD'ye transfer ederken XO akseptör olarak oksijeni tercih eder ve süperoksit oluşturur. XDH sülfidril oksidasyonu ile veya proteolitik parçalanma ile XO'ya çevrilir. İskemi reperfüzyonun hipoksik aşaması esnasında ATP'nin hızla tüketilmesine bağlı olarak hipoksantin birikir, total enerji seviyesi azalır. Buna paralel bir mekanizma ile hipoksik şartlar XDH'nin XO'ya çevrimini katalizleyen proteolitik enzimleri aktive eder (82). XO seviyesinin artması ve reperfüzyon fazında oksijenin gelmesi ile birikmiş olan hipoksantin ürata okside edilir. İşte bu reaksiyonda moleküler oksijen süperoksit radikallerine çevrilir. XO'nun çoğu endotel hücrelerinde bulunmakla birlikte sekrete edilen XO'nun sirkülasyonla vücudun her tarafına dağıldığı ve iskemi reperfüzyon hasarı oluşan bölgenin distal kısımlarında ROS üretimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (83). Bu durum birçok organda simültane olarak XO kaynaklı ROS atağına yol açar. XO artışının görülmediği bölgelerle karşılaştırıldığında yıkıcı etkilerinin daha ileri seviyede olduğu tespit edilmiştir.

Sirkülasyonda bulunan XO'nun ve bunun ROS üretme kapasitesinin hasar yapıcı rolü süperoksit dismutaz gibi serbest radikal süpürücülerin eksojen olarak verilmesi sonucu daha net bir şekilde gösterilmiştir. Bu enzim endotel hücreleri tarafından alınmadığı halde reperfüzyon injürileri için koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (84).

2.3.6.5 İskemi-reperfüzyon hasarında mitokondrilerin rolü

Mitokondriler oksijen tüketip enerji üreten en önemli hücresel organel oldukları için ROS üretiminin en baskın olarak yapıldığı yer olduğuna inanılmaktadır. Burada elektron transport sistemi olarak da bilinen solunum zincirinde moleküler oksijenin suya indirgenmesi gerçekleşmektedir. Mitokondrideki elektron transport zincirinin I/R hasarı ile bozulmaya uğraması hücrenin sitoplazmasına aşırı miktarda üretilen ROS'un geçişine sebep olmaktadır. Bu hipotez respirasyon sisteminden yoksun ML-1a hücrelerinde serbest radikal üretiminin azaldığının ve TNF ile indüklenen apoptozisin önlendiğinin bulunması ile desteklenmiştir. Bu bulgular mitokondrial ROS üretiminin programlı hücre ölümünde de önemli bir tetikleyici mekanizma olduğunu göstermektedir (85, 86).

2.3.6.6 İskemi-reperfüzyon hasarında zincirleme lipid peroksidasyonu, ürün ve ara ürünlerinin rolü

Plazma membranı, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi biyolojik membranlara serbest radikallerin etki etmesi lipid peroksidasyonu üzerinden membranların poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımına yol açabilir. Hücre membranlarının lipid kısmının büyük çoğunluğu fosfolipid ve bunların yapısındaki poliansatüre yağ asitlerinden oluşmuştur. Bu hasar sonucunda membranın yapısı ve fonksiyonları büyük ölçüde bozular. Lipid peroksidasyonu, bir lipid molekülünde iki doymamış bağ arasında yerleşmiş olan bir metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkarılması ile başlayan kompleks bir fenomendir. Sonuçta karbon merkezli bir lipid serbest radikali oluşur. Eğer ortamda oksijen mevcut ise lipid peroksitler veya lipid hidroperoksitler oluşur. Bu son ürünlerin daha ileri parçalanmaya uğraması ile rölatif olarak daha stabil olan son ürün malondialdehid oluşur (87). Dolayısıyla bir dokuda MDA düzeyinin artması serbest oksijen radikallerinin arttığını gösterir (88). MDA'nın kendisi de üretildiği yerde iki yönlü hareket edebilir; hem dış ortama hem de hücrenin iç kısmına yönelebilir. Hücre içinde bir çok yapıya zararlı etkileri vardır. Dolayısıyla serbest oksijenlerin lipidlere etkisi sonucu açığa çıkan patolojik ürün olan MDA da daha ileri yıkımlara sebep olabilir. Bu bileşiğin oksidasyon yoluyla yıkımı ise karaciğer

mitokondrilerinde yer alan spesifik aldehit dehidrogenaz sınıfına dahil olan bir enzim tarafından gerçekleştirilir (89).

2.4 Endojen ve eksojen antioksidanların karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarındaki yeri

2.4.1 SOD ve CAT

SOD ve CAT karaciğer kan akımının kesilmesinden sonra ve tekrar oksijenlenme sağlandıktan sonra oluşan hasarı önlemek üzere tedavi amaçlı olarak uygulanmıştır (90-92). Bu tip uygulamaların en önemli engeli enzimlerin instabil olması ve ROS'un asıl etki gösterdiği hücre içi bölgelere bu enzimlerin yeteri miktarda ulaşmamasıdır. Örneğin ratlarda Cu, Zn-SOD'un yarı ömrünün 6-10 dakika, Mn-SOD'un yarı ömrünün ise 5-6 saat olduğu gösterilmiştir (93). Bu rekombinant antioksidan proteinlerin spesifik bir hedefe yönlendirilmesi ve yarı ömrünün uzatılması için birçok metod geliştirilmiştir. CAT ve SOD proteinlerinin sürfaktan lipozomlarının içinde vücuda sunulmasının yarı ömürlerini arttırdığı gösterilmiştir (94, 95). Bunun dışında polietilen glikol SOD (peg-SOD), galaktozillenmiş SOD (gal-SOD) ve mannozillenmiş SOD (man-SOD) tedavi amaçlı olarak kullanılmıştır. Kimyasal olarak modifiye edilmiş SOD proteinleri karaciğer I/R'un önlenmesinde doğal SOD'dan daha başarılı bulunmuştur (96). Sığır CAT'ı, rekombinant CAT ve katalazın diğer modifiye edilmiş türleri I/R hasarının önlenmesi için tedavi amaçlı olarak kullanılmıştır (97). İntravenöz olarak enjekte edilen sığır karaciğer CAT'ı farelerde hepatik I/R hasarından koruyucu etkiler göstermiştir (98).

İn vivo şartlarda karaciğerin iskemi reperfüzyon hasarı sonrasında endojen antioksidan enzimlerin durumunu konu edinen sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (99,100). Bu açıdan çalışmamızın henüz aydınlatılmamış bir konuya ışık tutabileceği görüşündeyiz.

2.4.2 GSH

Bir tripeptid olan glutatyon bütün hücrelerde milimolar konsantrasyonlarda bulunan önemli bir endojen antioksidandır. Hücre içinde üretilen peroksitlerin glutatyon peroksidaz tarafından indirgenmesi amacıyla kosubstrat olarak kullanılır. Karaciğer hücreleri hayli yüksek konsantrasyonda GSH (10mmol/L) ve diğer antioksidanları bulundurduğu için ROS hasarına nispeten daha dayanıklıdır. Ekstrasellüler GSH konsantrasyonu çok düşüktür: insanlarda 5 mikromol/L, ratlarda 15 mikromol/L (101,102). Hepatositlerden dışarıya salınan GSH ekstrasellüler bölgede üretilen ROS'u süpürücü bir ajan olarak görev yapmaktadır. GSH spontan olarak süperoksit, hidrojen peroksit ve granüositler tarafından üretilen hipoklorik asit ile monokloraminlerle reaksiyona girebilmektedir (103-105).

Dolayısıyla GSH karaciğerin reperfüzyon hasarından korunmasını sağlamaktadır. Sinüzoidal GSH salınımının koruyucu etkisinin yanında intravenöz olarak uygulanan GSH'ın da karaciğeri endotoksin ile aktive olmuş Kupffer hücrelerinin hasarından korumaktadır (104). GSH ayrıca E vit, C vit gibi antioksidanların ve diğer nonenzimatik serbest radikal süpürücülerin indirgenmiş durumda tutulmaları için de merkezi bir role sahiptir (106,107).

2.4.3 E, C ve A vitaminleri

E vitamininin karaciğer I/R hasarı üzerine muhtemel koruyucu etkisi izole sıçan hepatositlerinde çalışılmıştır. Hepatositleri izole edilmeden 2 saat önce kuyruk veninden 10 mg/kg E vit enjekte edilmesi süperoksit anyonu üretimini ve hücre hasarını önlememiştir. Ama lipid peroksidasyonunu azaltmıştır (108). Vitamin karakterli serbest radikal süpürücülerinin etkinliği total hepatik iskemi ve reperfüzyon modeli oluşturulan ratlarda geniş olarak çalışılmıştır (109). E vitamininin özellikle intraperitoneal yoldan uygulanması, karaciğerin serbest radikal hasarından korunmasında ve mitokondri fonksiyonlarının yeniden kazanılmasında önemlidir. İskemiden 3 gün önce intraperitoneal olarak 10 mg/kg alfa-tokoferol uygulanması sıçanların hayatta kalma oranını %46 arttırmıştır (110). Bu uygulama aynı zamanda reperfüzyondan sonra görülen lipid peroksit artışını tamamen baskılamıştır. Ayrıca ATP'nin yeniden sentezini hızlandırmıştır. Bunun sebebi muhtemelen mitokondri membranlarını serbest radikal hasarından korumasıdır (111).

Askorbik asit suda eriyebilen ana antioksidan vitamin olarak dokuları oksidatif hasardan korumaktadır. Hem direkt serbest radikal süpürücüsü, hem de enzimatik reaksiyonlarda indirek indirgeyici olarak fonksiyon görebilir. Askorbik asit singlet oksijen, süperoksit ve hidroksil radikallerini yok edici etkiye sahiptir. Askorbik asitin enzimatik reaksiyonlar üzerine etkisi prostetik metal iyonlarını indirgenmiş halde tutmasından kaynaklanmaktadır (112). İskemi ve reperfüzyon süreçleri serumda askorbik asitin azalması ile sonuçlanmaktadır. A vitamini; singlet oksijenin ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu çok erken safhalarda önleyici etkiye sahiptir (113).

3 MATERYAL VE METOD

3.1 Deneylerde kullanılan alet ve kimyasallar

Çalışmada şu aletler kullanılmıştır: Rotina 48 RC (Germany) Santrifüjü, Shimadzu UV-1601 (Japan) Spektrofotometre, F-4010 Fluorescence Spectrophotometer (HITACHI 1987 Tokyo, Japan), Ultra Turrax T25 basic (Germany) homojenizatör, Mettler PM 100

(İsviçre) hassas terazi, Nuair -85°C Ultralow Freezer (Japan) marka derin dondurucu, Mettler Toledo MP 220 (İngiltere) model pH metre.

Çalışmada kullanılan maddeler şunlardır: Kloroform, etil alkol, EDTA (Na tuzu), Na₂CO₃, (NH₄)₂SO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, %30 H₂O₂, NaN₃, KH₂PO₄, 4-aminoantipyrine, fenol kristali, hexadecyltrimethyl ammonium bromid, HCl, n-butanol, kadmiyum granülleri, NaOH, CuSO₄, H₂SO₄, NaNO₂, Na₂B₄O₇, ZnSO₄, KNO₃, triklor asetik asit (TCA), Na₃Sitrat, %85 fosforik asit, lityum sülfat ve brom MERCK firmasının, ksantin, Nitroblue tetrazolium (NBT), bovine serum albumin (BSA), ksantin oksidaz (XO), glutatyon-redükte formu (GSH), NADPH-redükte formu, glycine (amino asetic acid), sulphonil amide (p-aminobenzen sulphonamide), N-(1-Naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride, sodyum tungstat, di-sodium molybdic acid ve CuCl₂ SIGMA firmasının üretimleri olup Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarından ve Araştırma Fon Saymanlığının "proje destek fonu" katkılarıyla temin edilmiştir.

3.2 Sıçanların temini ve deneylere hazırlanması

T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Fırat Üniv. Tıp Fak. Anatomi AD ve Süleyman Demirel Üniv. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD'dan temin edilen Wistar albino erkek sıçanlara özel kafeslerde, havalandırması olan, mevsimsel gün ışığı ritminde, standart sıçan pellet yem ve çeşme suyu verildi. Gün aşırı suları değiştirildi ve kafes temizliği yapıldı. 250 gr.'ı geçen sıçanlar rasgele alınarak cerrahi işlem sırasında gruplandırıldı.

3.3 Deney gruplarının oluşturulması

1. grup: Sham grubu (Sham) (n=10); Bu grupta batın medline insizyonla açıldı, karaciğer lobları aralanıp vena porta ve arteria hepatica görüldü. Batın sütüre edilip I/R süresi kadar bekletilen sıçanların kanı ve karaciğer lobları alınarak öldürüldü.

2. grup: Salin-iskemi grubu (n=10); Batın medline insizyonla açıldı, aşağıda detaylı olarak anlatıldığı şekilde iskemi ile birlikte batından salin uygulandı ve 1 saat iskemi süresi sonunda dokuları alınarak sıçanlar öldürüldü.

3. grup: Salin + iskemi-reperfüzyon grubu (Salin+I/R) (n=10); 1 saat iskemi uygulanmasının ardından klemp açılıp 1dakika sonunda kuyruktan 1,5 mL kan alınıp serumu ayrıldı. Bu sıçanların karaciğeri iskemiye takiben 2 saat reperfüze edildi. Reperfüzyon süresinin sonunda kan ve karaciğer dokuları alınarak sıçanlar öldürüldü.

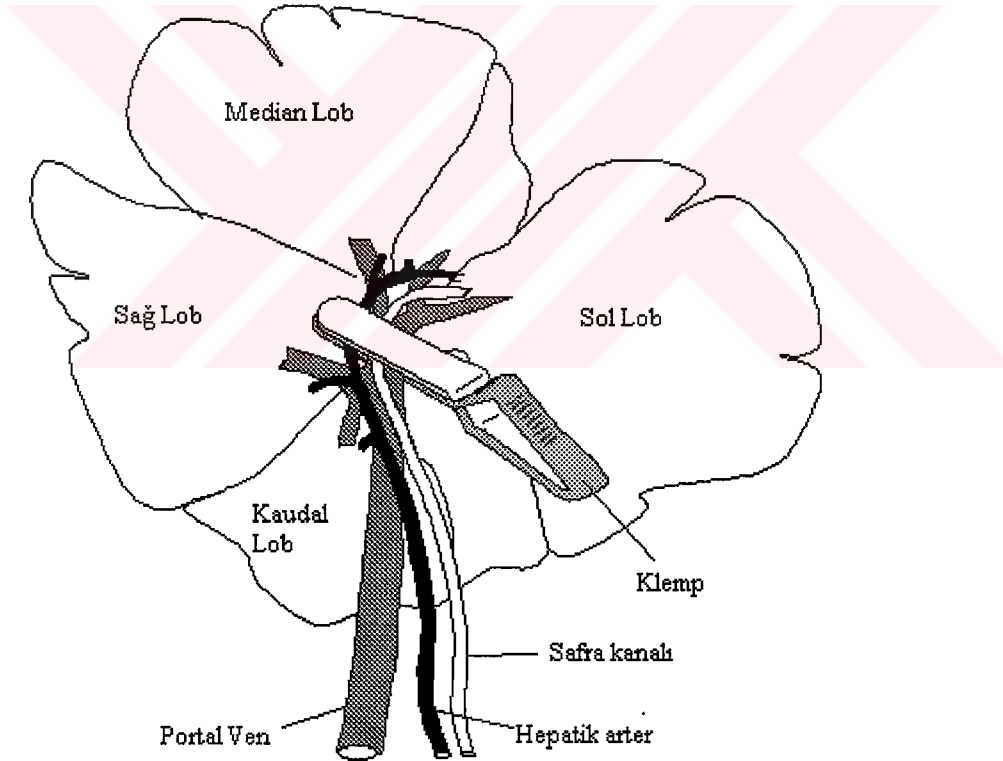
4. grup: E vitamini + iskemi/reperfüzyon grubu (Evit+I/R) (n=10); Aşağıda anlatılan şekilde E vitamini uygulanıp 1 saat iskemi yapıldı. Bu sıçanların karaciğerlerine

daha sonra 2 saat reperfüzyon uygulandı, takiben kan ve karaciğer dokuları alınarak sıçanlar öldürüldü.

5. grup: CAPE + iskemi/reperfüzyon grubu (CAPE+I/R) (n=10); 4. Gruptaki uygulamanın aynısı E vitamini yerine CAPE verilerek yapıldı.

3.4 Karaciğer iskemi-reperfüzyonun oluşturulması ve E vitamini ile CAPE'nin uygulanması

Albino-Wistar türü erkek sıçanların bir gün önceden standart yemleri kesildi. Sıçanlar tartılarak 1mg/kg Xylazine ile 0.5 ml/kg ketamin intraperitoneal uygulama ile genel anestezi yapıldı. Anestezi edilen sıçanlar vücut sıcaklığı korunarak medline insizyonla batınları açıldı. Karaciğer lobları zedelenmeden aralanarak vena porta ve arteria hepatikanın dalları görüldü. Sol ve median loba giden dalları tespit edilip bulldog klemp ile kleplendi (Şekil 6).



Şekil 6: Karaciğer dorsal yüzden iskemi modelinin gösterimi.

Yaklaşık 1-2 dakika sonra renkleri soluklaşan median ve sol lobların, iskemik olduğuna karar verildi. İskeminin başlamasından 5 dakika sonra E vitamini grublarına 10 mg/kg olacak şekilde açık batından peritona ROCHE ilaç firmasının ürettiği Epyanal ampulden E-vitamini uygulandı. İzotonik gruplarına yine iskemi başlangıcından 5 dakika sonra 0.1 ml/kg % 0.9 NaCl çözeltisi periton boşluğuna uygulandı. Aynı şekilde CAPE

gruplarına da iskemi başlangıcından 5 dakika sonra 10 µmol/kg olacak şekilde açık batından peritona CAPE uygulandı.

Batın kapatıldı ve vücut ısısı ~37°C'de muhafaza edilmeye çalışıldı. İskemi/reperfüzyon grublarında yukarıda bahsedilen bir saatlik iskemiye takiben batın tekrar açılarak klemp dikkatlice çıkarıldı, lobların tekrar kanlanması gözlenen sıçanların tekrar batınları kapatıldı ve vücut ısıları korunarak iskemi oluşturulan karaciğer iki saat reperfüze edildi.

3.5 Karaciğer dokularının çıkarılarak biyokimyasal analizlere hazırlanması:

İskemi süreleri dolan sıçanların batınları tekrar açıldı ve vena cava inferiora enjektör ile girilerek yaklaşık 5-7 ml kan alındı. Kalp atışı devam eden sıçanların kan alımından sonra vena cava inferior kesilerek karaciğerin kanının boşalması sağlandı ve sıçanlar öldürüldü.

İskemik grupların klemlenen vena porta, arteria hepatica ve bilier duktus açıldıktan 1 dakika sonra kanları alındı, karaciğerin sol ve median lobları dikkatlice eksize edildi.

Karaciğer median lob, sağ ve sol loblar hemen soğuk izotonik su ile yıkandı ve alüminyum folyeye sarılıp -85°C derin dondurucuda biyokimyasal testlerin yapılacağı zamana kadar saklandı. Alınan kanlar 1500xg'de 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve ependorf tüplerine aktarıldı. Serumun bir kısmı ile hemen AST ve ALT çalışıldı, diğer kısmı ise -85°C derin dondurucuya konuldu.

3.6 Numunelerin korunması, homojenizasyonu ve deney için hazırlanması

3.6.1 Numunelerin muhafazası:

Biyokimyasal analizler için elde edilen karaciğer dokuları soğuk izotonik su ile yıkandı ve alüminyum folye içine sarılarak numaralandı ve -85 °C'de muhafaza edildi. Derin dondurucudan çıkarılan dokuların buzunu çözüldükten sonra buzla soğutulmuş distile su ile yıkandı. Bu işlem 3 defa tekrarlandı.

3.6.2 Homojenizasyonda kullanılan reaktifler:

PH 7.5, 0.2 mM Tris-HCl tamponu; 0.2 mM olarak hazırlanan Tris solüsyonu ve HCl solüsyonu 50/39.9 (v/v) oranında karıştırılarak hazırlandı (114). Tüm çalışmalarda bu tampon kullanıldı. Myeloperoksidaz enzim tayininde kullanılacak süpernatanın elde edilmesi için ise % 0.5'lik hexadecyltrimethyl ammonium bromid, doku ağırlığının 5 katı olacak şekilde ilave edilerek 16000 devir/dakika hızda 2 dakika homojenize edildi.

3.6.3 Homojenizasyonda yapılan işlemler ve numunelerin hazırlanması:

Yaş ağırlıkları 1 gr olarak ayarlanan karaciğer dokuları soğukluğu muhafaza edilerek temiz cerrahi makasla küçük parçalara ayrıldı. Cam tüpe aktarılan doku üzerine 2 ml Tris-HCl tamponu eklendi. Buz doldurulmuş plastik kap içerisine yerleştirilen cam tüpteki doku 16.000 devir/dakika hızda homojenize edildi. Son hacim doku ağırlığının 10 katı olacak şekilde tampon ilave edildi. Tekrar homojenize edilerek süre 3 dakikaya tamamlandı. Homojenatın ısısı artırılmadan ependorf tüplerine aktarıldı ve tüplerin üzeri numaralandı. Yaş doku ağırlığı ve ilave edilen tampon miktarları kaydedildi. Elde edilen homojenatlardan NO ve MDA tayinleri yapıldı.

Homojenatlar 3220 rpm/30 dakika + 6 °C soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlardan CAT, GSH-Px, XO ve protein tayinleri yapıldı. Süpernatant 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) ile (115) vortexlenip cam tüpte 3220 rpm/40 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından protein ve SOD enzim aktivite tayini yapıldı.

3.7 Karaciğer dokusunda biyokimyasal analizler

3.7.1 SOD enziminin (total SOD) aktivite tayini:

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metoduna (115) ve Durak ve arkadaşlarının tariflediği modifikasyona (116) göre tayin edildi. Bu metodda SOD aktivitesi, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır. Oluşan süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgeme meydana gelip mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi olmayıp mavi-mor renk meydana gelmemekte ve enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır.

$$\text{Enzimin \% inhibisyonu} = (\text{Abs}_{\text{kör}} - \text{Abs}_{\text{num}}) / \text{Abs}_{\text{kör}} \times 100$$

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

Kullanılan Reaktifler

SOD reaktifi [0.3 mmol/L ksantin, 0.6 mmol/L EDTA (2 Na tuzu), 150 µmol/L NBT, 400 mmol/L Na₂CO₃, 1g/L bovine serum albumin (BSA)], 167 Ü/L ksantin oksidaz (XO), 0.8 mmol/L CuCl₂

Deneyin yapılışı:

	Kör (mL)	Numune (mL)
SOD reaktifi	2.85	2.85
Ekstrakt	-	0.10
Bidistile su	0.10	-
XO	0.05	0.05

25 °C'de 20 dakika inkübasyon

CuCl ₂	1	1
-------------------	---	---

Distile suya karşı körden başlanarak numuneler 560 nm.'de okunur.

Süperoksit dismutaz aktivitesinin hesaplanması:

$$\% \text{ İnhibisyon} = ([\text{Absorbans kör (K)} - \text{Absorbans numune (N)}]) / K \times 100$$

% 50'lik inhibisyona 1 Ü denildiği için

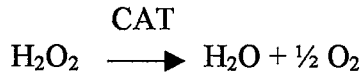
$$\text{Aktivite (Ü/ml)} = [(\% \text{ inhibisyon}/50) \times (1 / 0.1)] \text{ ml.}$$

$$\text{Ü/ml} = [(K-N) / K] \times 20 \times 5 \text{ (sulandırma faktörü)}$$

$$\text{Spesifik aktivite (U/mg protein)} = [U/\text{mL}/\text{mg/ml protein}]$$

3.7.2 CAT enziminin aktivite tayini

Metodun prensibi: Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) aktivitesi Aebi'nin metoduna göre çalışıldı (37). Hidrojen peroksit (H₂O₂) 240 nm'de maksimum absorbans verir. Deney ortamına ilave edilen H₂O₂ katalaz tarafından su ve oksijene parçalanmakta, bu ise kendini ultraviyole spektrumunda absorbans azalması şeklinde göstermektedir. Absorbanstaki bu azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır. Reaksiyon şu şekildedir



Kullanılan reaktifler:

Fosfat tamponu (pH 7, 50 mM), absorbansı 0.500 nm'ye tampon ile ayarlanmış olan H₂O₂'li fosfat tamponu (H₂O₂ çözeltisi).

Deneyin yapılışı:

Fosfat tamponuna göre 240 nm dalga boyunda sıfırlanan köre karşı H₂O₂ çözeltisinin absorbansı 0.500'e ayarlandı.

	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat Tamponu	2.99	-
H ₂ O ₂ çözeltisi	0.01	2.99
Süpernatant	-	0.01

Numune ilâvesi ile absorbans azalması her 15 sn'de bir defa olmak üzere 5 dakika süre ile kaydedildi. Hesaplama 1 dakikalık lineer absorbans azalmasının değerleri esas alındı.

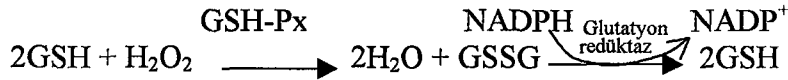
Hesaplama

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

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

3.7.3 GSH-Px enziminin aktivite tayini

Prensip: GSH-Px (EC 1.11.1.9) aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (117). GSH-Px hidrojen peroksit varlığında redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG)'a yükseltgenmesini katalizler. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutatyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'ya indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'ın NADP⁺'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplanır.



Enzim Ünitesi: Birim zamanda okside olan NADPH'ın mikromol miktarıdır.

Reaktifler

150 mM redükte GSH, 8 mM NADPH, 1 M NaN₃, enzim [1.5 mL 3.2 M (NH₄)₂SO₄ + 50 µL GSH redüktaz], 2 mM H₂O₂, fosfat tamponu (pH = 7.50 mM).

Deneyin yapılışı:

Fosfat tamponu 5 mM EDTA'lı	2.65 mL
Redükte GSH	0.10 mL
NADPH	0.10 mL
Enzim	0.01 mL
NaN ₃	0.01 mL
Numune	0.02 mL

30 dakika oda ısısında inkübasyon

H ₂ O ₂	0,100 ml
-------------------------------	----------

Dalga boyu 340 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede numunelerin absorbans değerleri 5 dakika boyunca kaydedildi. Lineer aktivite azalışının olduğu absorbans aralığının 1 dakikalık süresi esas alınarak hesap yapıldı.

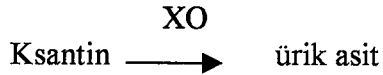
GSH-Px aktivitesinin hesaplanması:

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

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

3.7.4 XO enziminin aktivite tayini

Deneyin prensibi: XO (EC 1.1.3.22) aktivitesi Prajda ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (118). Bu metotta XO aktivitesi; numunede bulunduğu farzedilen XO'ın ortamdaki ksantinden ürik asit oluşturması esasına dayanır. Oluşan ürik asit miktarı, %100'lük TCA solüsyonunun eklenmesi ile sabitlenir. Spektrofotometrede 293 nm dalga boyunda absorbanans değeri ölçülür. Böylece 30 dakika içerisinde üretilen ürik asit miktarı belirlenir ve aktivite IU/mg protein cinsinden ifade edilir.



Kullanılan reaktifler:

Fosfat tamponu (50 mM, pH 7.5): 0,5mM Na₂EDTA'lı, 4mM ksantin, TCA(%100, w/v).

Deneyin yapılışı:

	Kör	Numune
Tampon (mL)	2.8	2.8
Ksantin (µL)	50	50
Numune (µL)		50

37°C'de 30 dakika inkübasyon

Numune (µL)	50	-
TCA (µL)	100	100

Santrifüj ile süpernatantlar 293 nm dalga boyunda okunur. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

3.7.5 MPO enziminin aktivite tayini

Prensibi: Myeloperoksidase (Myeloperoksidaz, MPO; EC 1.11.1.7) enziminin aktivitesi MPO aracılı H₂O₂ ile yapılan oksidasyon için substrat olarak 4-aminoantipyrine/phenol solüsyonu kullanılarak yapıldı (119).

Reaktifler

25mM 4-aminoantipyrine (4-AAP), %2 phenol, %0.5'lik hexadecyltrimethyl ammonium bromid (HDTMAB), 1.7 mM H₂O₂

Deneyin yapılışı

%0.5'lik HDTMAB ile homojenize edilen dokular 3220 rpm/45 dakika +4°C'de santrifüj edildi (ekstrakt süpernatanı).

	Numune
4-AAP-%2 phenol	1.3 mL
H ₂ O ₂	1.5 mL
Ekstrakt süpernatanı	0.2 mL

510 nm'de 5 dakika boyunca absorbans artışı kaydedildi. Lineer aktivite artışının gözlemlendiği absorbans değerleri hesaba katıldı.

Hesaplama

$$\dot{U}/L = [\Delta OD / \Delta t (\text{dakika})] \times (3/0.2)] \times F$$

1 enzim Ünitesi; 25 °C'de 1 dakikada 1µmol H₂O₂'yi harcayan enzim olarak ifade edildi.

3.7.6 MDA miktarının tayini

Deneyin prensibi: Wasowicz ve arkadaşlarının (120) metodu ile çalışıldı. Bu metotta, asidik ortamdaki tiobarbitürik asit ile 95 °C'de reaksiyona giren malondialdehit (MDA), pembe renkli bir kromojen oluşturur. Bu kromojenin n-butanol ekstraktı floresans spektrofotometrede ekstinksiyon 525 nm, emisyon 547 nm dalga boylarında ölçülür. Hazırlanan (standart olarak 1,1,3,3-tetramethoxypropane kullanıldı) MDA standart grafiği eğimi kullanılarak numune MDA miktarları tayin edilir (Grafik 1). Bu rengin şiddeti ortamdaki MDA ile orantılıdır.

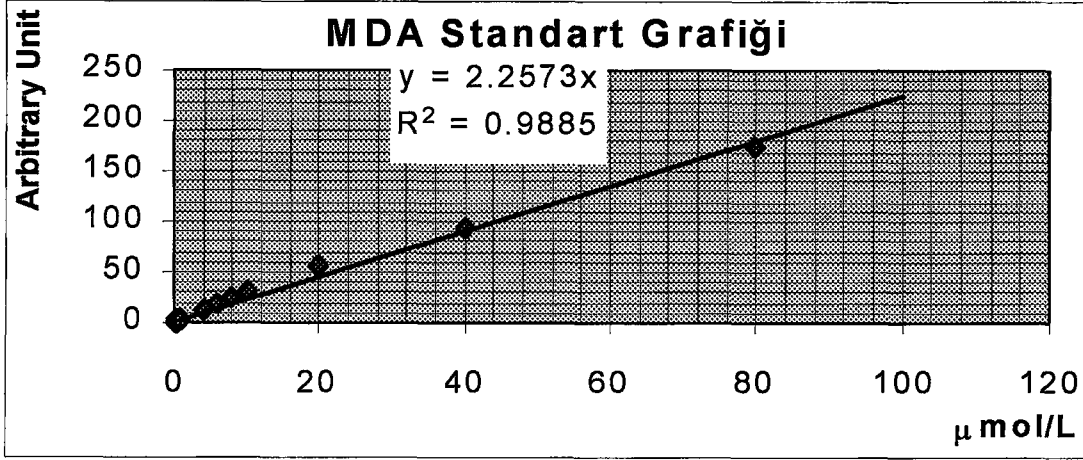
Kullanılan reaktifler:

29 mmol/L tiobarbitüric asit (TBA) çözeltisi (pH'sı 2.8), 6 M HCl ve n-Butanol kullanıldı.

Deneyin yapılışı:

	Numune	Numune Körü	Standart	Standart Körü
Deiyonize su	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Homojenat	50 µL	50 µL	-	-
Standart	-	-	50 µL	50 µL
TBA çözeltisi	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
1 saat inkübasyon	96 °C	25 °C	96 °C	25 °C
HCl	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
n-Butanol	3.5 mL	3.5 mL	3.5 mL	3.5 mL

Vortekslenip 1500 x g'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Üstteki butanol fazı alınarak spektrofotometre ile okundu. (Excitation: 525 nm, emission: 547nm).



Grafik 1: MDA standart grafiği. (Deneyin standart grafiği, 2 adet MDA molekülünün birleşmesinden oluşan 1,1,3,3-tetramethoxypropane ile hazırlandı. Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar numuneler ile aynı şartlarda çalışıldı ve spektrofloreometre'de okunmalarından elde edilen birimler (arbitrary unit) ile standart grafiği çizildi. Bu grafikten elde edilen eğim sabiti numunelere uygulanarak MDA miktarı yaş gram doku başına nanomol olarak hesaplandı.)

3.7.7 NO miktarının tayini

Vücutta endojen olarak üretilen nitrik oksit doku ve vücut sıvılarındaki konsantrasyonu, pek çok çalışmada nitrit ve nitrat olarak ifade edilmiştir (121). Çünkü nitrik oksit, üretildiği bölgede saniyeler içinde okside olarak önce nitrite (NO_2^-) daha sonra da nitrata (NO_3^-) dönüşür. Bununla beraber proteinden zengin homojenat, serum ve plazma gibi solüsyonlarda spesifik olmayan reaksiyonlar meydana gelebileceğinden, Griess reaksiyonu ile ölçümlerde belli bazı sıkıntılar yaşanmaktadır. Bu açıdan biz nonspesifik reaksiyonların önüne geçebilmek için homojenatları önce deproteinize edip daha sonra nitrit ve nitrat konsantrasyonlarını ölçtük. Zor olmakla birlikte *in vivo* olarak direkt NO ölçümü de mümkündür. Bu amaçla NO propları geliştirilmiştir ama bunların *in vitro/ex vivo* şartlarda çalışılması mümkün değildir (122).

Dokuda nitrit ve nitrat miktarı deproteinizasyondan sonra Griess reaksiyonu ile belirlendi (123). Total nitrit (nitrit + nitrat) konsantrasyonu modifiye kadmiyum redüksiyon metodu ile değerlendirildi. pH 9.7 glisin tamponunda bakır (Cu) kaplı kadmiyum granülleri deproteinize numune süpernatantı ile 90 dakikalık inkübasyon sonunda nitrat redüksiyonu sağlandı. Üretilen nitrit; sülfanilamid ve buna bağlı N-naphthylethylene diamin (NNDA) diazotizasyonu ile reaksiyon sonucu oluşan pembe rengin 545 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunması ile belirlendi. Sonuçta elde edilen nitrit konsantrasyonu ilk konsantrasyondan çıkarılarak nitrat miktarı belirlendi.

Kullanılan reaktifler:

Kadmiyum granülleri (Cd), pH 9.7 Glisin-NaOH tamponu, sülfanilamid, N-Naphthylethylene diamine (NNDA), 5 mmol/L CuSO₄, 0.1 mol/L H₂SO₄, standart solüsyonu (0.1 mol/L NaNO₂, 10 mmol/L Na₂B₄O₇), 75 mmol/L ZnSO₄, 55 mmol/L NaOH

Kadmiyumların aktifleştirilmesi:

Kadmiyumlar 2.5-3 gr olarak 20 cc kapaklı plastik tüplere dağıtılır. Granüller deiyonize su ile yıkanır. 1-2 dakika CuSO₄ solüsyonu içinde bekletilir ve solüsyon dökülür. Granüller glisin tamponu ile yıkanarak deneyde kullanılır.

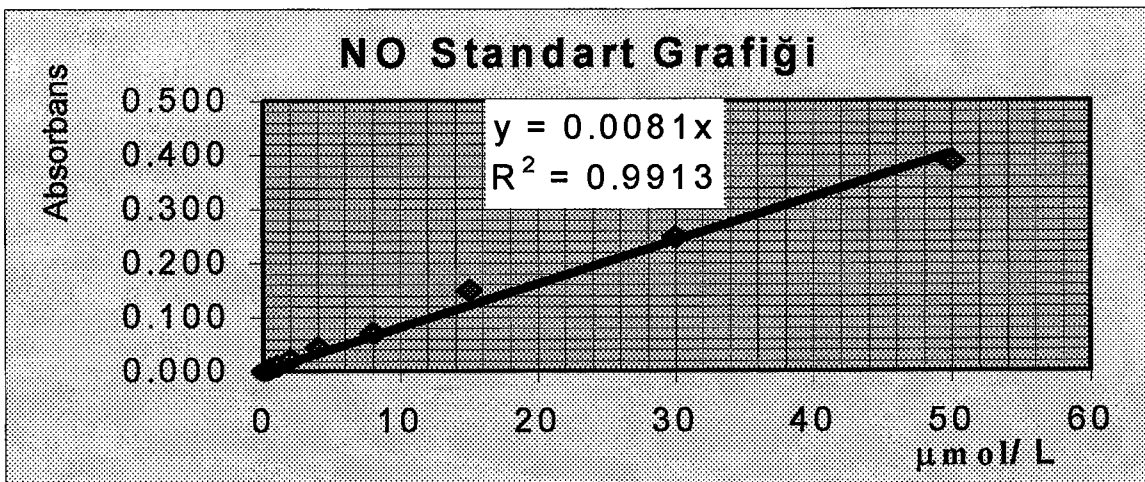
Deneyin Çalışılması:

Deproteinizasyon işlemi: 500 µL numune + 2mL ZnSO₄ vortekslenir. 1.250 mL NaOH ilâve edilip tekrar vortekslenir ve 3500xg'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant numune olarak kullanılır.

En son glisin tamponu ile yıkanmış aktif kadmiyum granüllü tüplerinin üzerine 1 mL glisin tamponu ilave edilir. 1 mL deproteinize numune konur. Üzerine 2 mL deiyonize su ilâve edilir. 90 dakika oda ısısında inkübe edilir. İnkübasyon sonunda 2 ml alınıp üzerine 2.5 mL deiyonize su, 1 mL sülfanilamid, 1 mL NNDA ilâve edilip 1 saat inkübe edilir. 545 nm'de köre karşı okunur.

Nitrit Standartlarının hazırlanması:

Stok solüsyon: 0.1 mol/L NaNO₂ hazırlanır. Hazırlanan standart solüsyonundan elde edilen "Optik Dansite (OD) – µmol/L" grafiği ile numune sonuçları hesaplandı (Grafik 2).



Grafik 2: NO standart grafiği.

3.7.8 Ekstraksiyonlu ve Ekstraksiyonsuz numunelerde protein tayini:

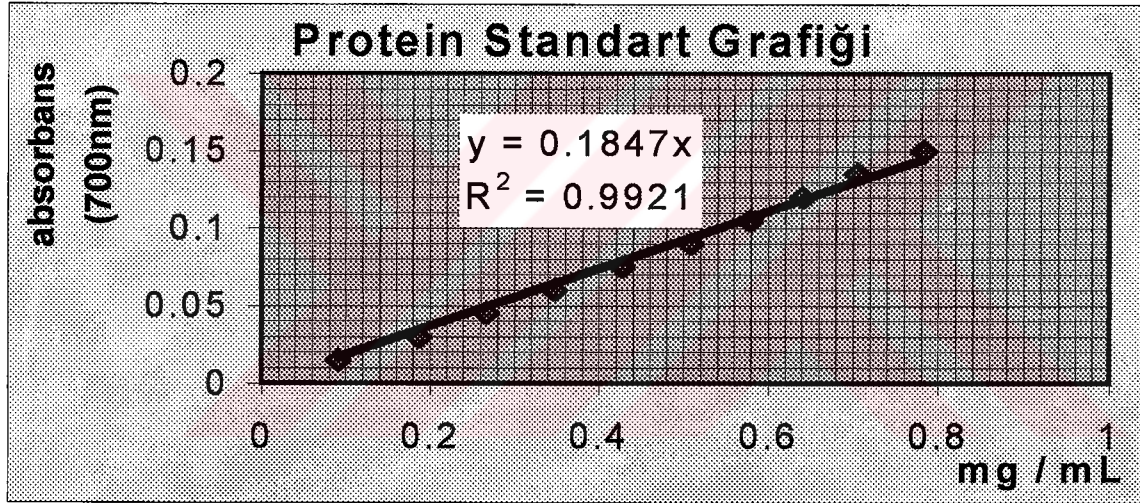
Deneyin prensibi (Lowry Metodu): (124) Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşarak fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifi) redükler ve

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 (folin) reaktifi parçalanmadan önce redüklenme olayı gerçekleşir.

Kullanılan reaktifler:

CuSO₄, Na₃Sitrat, Na₂CO₃, NaOH, Phenol-Folin-Ciocalteu reaktifi.

Deneyin yapılışı: Standart grafiği çizmek için konsantrasyonunu bildiğimiz Bovin serum albuminden hazırlanmış çözeltiler kullanıldı. “Optik dansite (OD) – mg/mL protein konsantrasyonu” grafiği çizilerek protein değerleri bu grafikten okundu (Grafik 3).



Grafik 3: Protein standart grafiği.

Standart ve numuneler köre karşı 700 nm’de okundu.

Hesabı:

Protein (mg/mL) = grafikten okunan değer x faktör

F (faktör) = standart hacmi (0.5 mL)/numune hacmi (0.010mL) = 50

Not: Faktör, kullanılan numunenin miktarına göre değişir. Kullanılan numunenin miktar değişikliği distile su hacmi ile ters orantılı olarak pipetlenir.

3.7.9 Diğer Biyokimyasal Analizler

Serum glutamat oksalat transaminaz (SGOT, AST) ve glutamat piruvat transaminaz (SGPT, ALT) aktiviteleri, ticari Olympus kitleri kullanılarak Olympus AU-600 otoanalizörü ile ölçüldü.

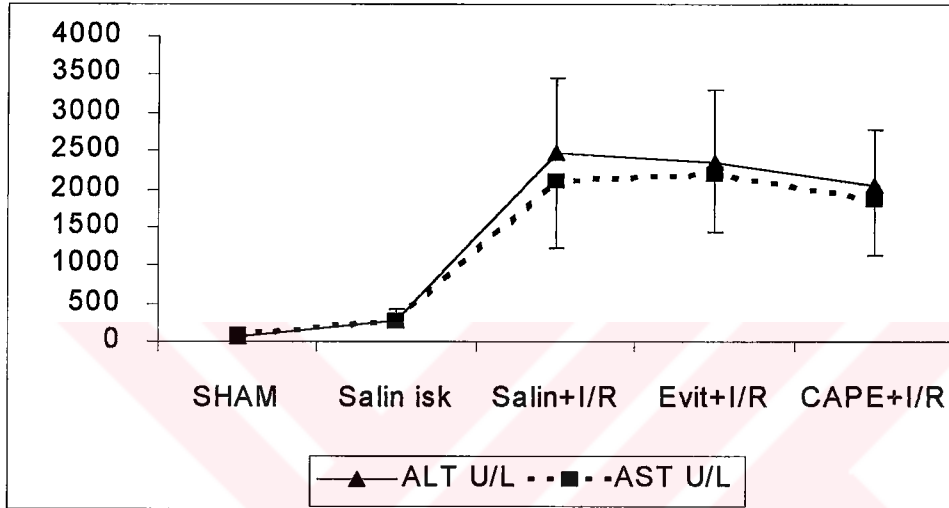
3.8 İstatistiksel Analizler

İstatistikler Windows 95-98 uyumlu SPSS® 7.5 ile yapıldı. Grupların dağılımları Non-parametrik testlerden one-sample Kolmogorov-Smirnov Test ile değerlendirildi. Grupların normal dağılım göstermesinden dolayı grupların karşılaştırılmasında Parametrik testlerden one-way ANOVA testi ve Post Hoc testlerden LSD kullanıldı. Gruplar içi korelasyon analizi için Pearson Korelasyon testi kullanıldı. Değerler ortalama \pm standart deviasyon olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.



4 SONUÇLAR

Rat karaciğerinde iskemi/reperfüzyon (I/R) oluşturarak yaptığımız bu çalışmada, diğer birçok araştırmada olduğu gibi, başarılı bir I/R yaptığımızdan emin olmak için ölçüt olarak serum AST ve ALT düzeylerini aldık. Serumda AST ve ALT aktiviteleri kan serum ayrılıp ayrılmaz oda ısısında bekletilmeden ölçüldü. Elde edilen aktivite değerlerinden gruplara göre “ünite-çalışma grubu” grafiği elde edildi (Grafik 4).



Grafik 4: Sham, iskemi ve I/R gruplarında ALT ve AST aktiviteleri. (ALT ve AST aktiviteleri sham ve salin iskemi gruplarında diğer gruplardan anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar bizim sıçanlarda karaciğer iskemi reperfüzyonunu başarılı bir şekilde yaptığımızı kanıtlamaktadır. Ancak CAPE ve E vitamini grubunda salin I/R grubuna göre anlamlı bir farkı gözlenmemektedir.)

Aslında her bir grupta farklı 10 adet sıçan kullanıldığından ve belli bir parametrenin zamana göre değişimi gibi bir amaç ifade edilmediğinden böyle bir grafiğin kullanılması uygun değildir. Ancak biz 5 çalışma grubunda AST ve ALT düzeylerinin nasıl değiştiğini daha rahat görebilmek için gruplar arasındaki mesafeyi düz ve kesikli çizgi ile birleştirdik. Grafikte de görüleceği gibi sıçanlarda hem iskemi hem de reperfüzyon aşamaları başarı ile gerçekleştirilmiştir. Aktivitelerin dağılım aralıkları (sırasıyla minimum ve maksimum sınır) Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1: Gruplar arasında AST ve ALT aktivite dağılım aralıkları.

Gruplar	AST (U/L)		ALT (U/L)	
	Min	Mak	Min	Mak
CAPE+I/R	924	2882	996	3532
Evit+I/R	1366	3472	1172	4536
Salin+I/R	1024	3608	1436	4054
Salin iskemi	164	448	120	540
Sham	42	170	26	124

Min: minimum , Mak: maksimum

Tablo 2 ve 3’de sham grubunda ve I/R gruplarında enzim aktiviteleri ve MDA ve NO değerleri toplu halde istatistiksel anlamlılık testleri ile birlikte verilmiştir.

Tablo 2: Gruplarda karaciğer dokusunda enzim sonuçları

	Gruplar	SOD U/mg protein	CAT k/gr protein	GSH-Px U/mg protein	MPO U/gr protein	XO U/gr protein
I	Sham	0,255 ± 0,031	141,724 ± 11,140	0,852 ± 0,342	1,065 ± 0,088	3,441 ± 0,896
II	Salin isk.	0,251 ± 0,041	159,408 ± 24,440	1,050 ± 0,145	0,587 ± 0,044	3,249 ± 0,445
III	Salin I/R	0,269 ± 0,040	161,074 ± 30,164	0,999 ± 0,257	1,809 ± 0,192	3,813 ± 0,837
IV	Evit+I/R	0,275 ± 0,051	135,632 ± 20,226	0,860 ± 0,368	1,316 ± 0,125	3,703 ± 0,742
V	CAPE+I/R	0,367 ± 0,162	186,107 ± 73,673	1,179 ± 0,380	1,029 ± 0,114	3,700 ± 0,478

p değeri

I-II	AD	AD	AD	0,0001	AD
I-III	AD	AD	AD	0,0001	AD
I-IV	AD	AD	AD	0,001	AD
I-V	0,003	0,014	0,023	AD	AD
II-III	AD	AD	AD	0,0001	AD
II-IV	AD	AD	AD	0,0001	AD
II-V	0,003	AD	AD	0,0001	AD
III-IV	AD	AD	AD	0,0001	AD
III-V	0,010	AD	AD	0,0001	AD
IV-V	0,015	0,005	0,026	0,0001	AD

AD: anlamlı değil, isk: iskemi, I/R: iskemi reperfüzyon, CAPE: kafeik asit fenetil ester, CAT: katalaz, GSH-Px: glutatyon Peroksidaz, MPO: myeloperoksidaz, SOD: süperoksit dismutaz

Tablo 3: Karaciğer dokusunda gruplar arası MDA ve NO miktarları

	Gruplar	MDA nmol/gr yaş doku	NO nmol/gr yaş doku
I	SHAM	109,805 ± 25,611	361,504 ± 48,657
II	Salin isk	146,681 ± 44,350	223,792 ± 41,488
III	Salin I/R	205,999 ± 43,259	309,080 ± 48,597
IV	E VIT	149,386 ± 40,993	217,856 ± 69,849
V	CAPE	122,791 ± 24,587	243,948 ± 42,067

P değeri

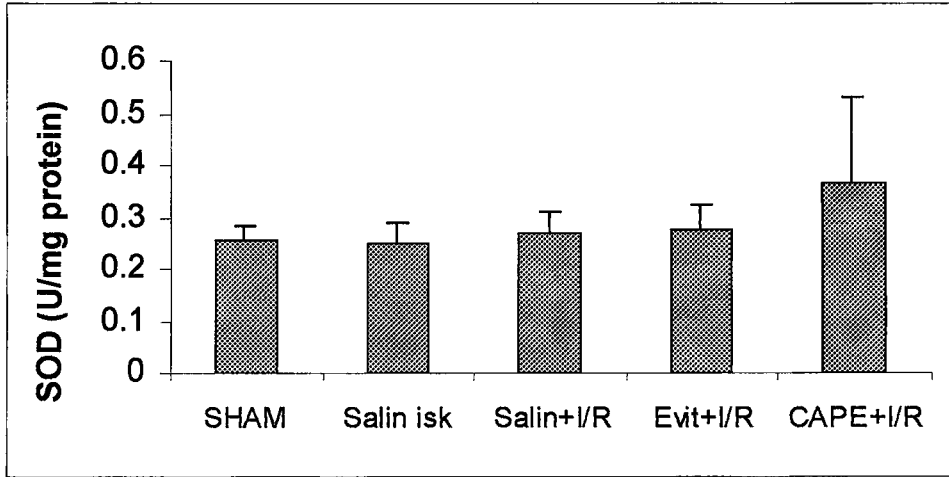
I-II	0,030	0,0001
I-III	0,0001	0,027
I-IV	0,020	0,0001
I-V	AD	0,0001
II-III	0,001	0,001
II-IV	AD	AD
II-V	AD	AD
III-IV	0,001	0,0001
III-V	0,0001	0,007
IV-V	AD	AD

AD: anlamlı değil, MDA: malondialdehit, NO: nitrik oksit,

Yukarıdaki sonuçlar, görsel değerlendirmeyi kolaylaştırmak amacıyla çalışılan her bir parametreyi ayrı bir grafik şeklinde değerlendirilerek aşağıdaki gibi ifade edildi (isk: iskemi, I/R: iskemi-reperfüzyon, E vit: E vitamini, CAPE: Kafeik asit fenetil ester olarak ifade edilmiştir).

4.1 Gruplarda SOD aktivitesi:

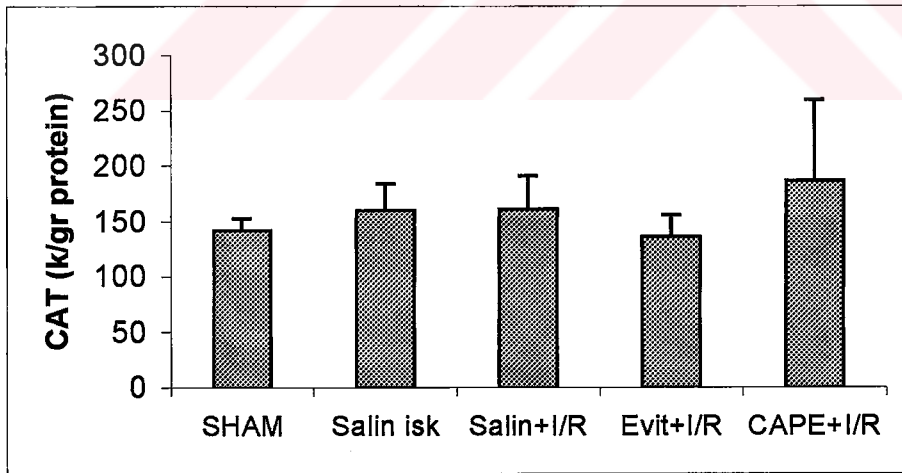
Grafik 5'de ifade edilmiştir. Bu grafiğe göre; SOD aktivitesi CAPE grubunda; sham grubuna göre ($p<0.003$), salin iskemi grubuna göre ($p<0.003$), salin I/R grubuna göre ($p<0.010$) ve E vitamini grubuna göre ($p<0.015$) anlamlı yüksek bulunmuştur. E vitamini verilen sıçanlarda SOD aktivitesi sham, iskemi ve I/R grupları ile karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık göstermezken CAPE verilen sıçanlarda standart deviasyon yüksek olmakla birlikte bütün diğer gruplara göre yüksek çıkmıştır.



Grafik 5: Sham, iskemi ve I/R gruplarında SOD aktiviteleri.

4.2 Gruplarda CAT aktivitesi:

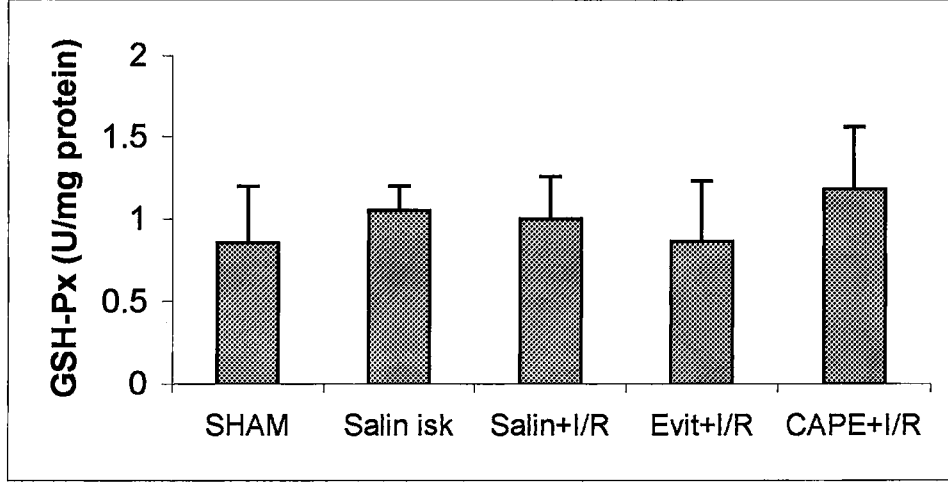
Grafik 6'de ifade edildiği gibi; salin iskemi ve I/R gruplarında CAT aktivitesi minimal artış göstermiştir. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. E vitamini grubunda ise ilginç olarak aktivitede bir azalma söz konusudur, fakat bu azalmanın ilk üç gruba göre herhangi bir anlamı yoktur. CAPE'nin verildiği sıçanlarda ise CAT aktivitesi hem sham grubuna ($p<0.014$) hem de E vitamini grubuna ($p<0.005$) göre anlamlı şekilde artmıştır.



Grafik 6: Sham, iskemi ve I/R gruplarında CAT aktiviteleri.

4.3 Gruplarda GSH-Px aktivitesi:

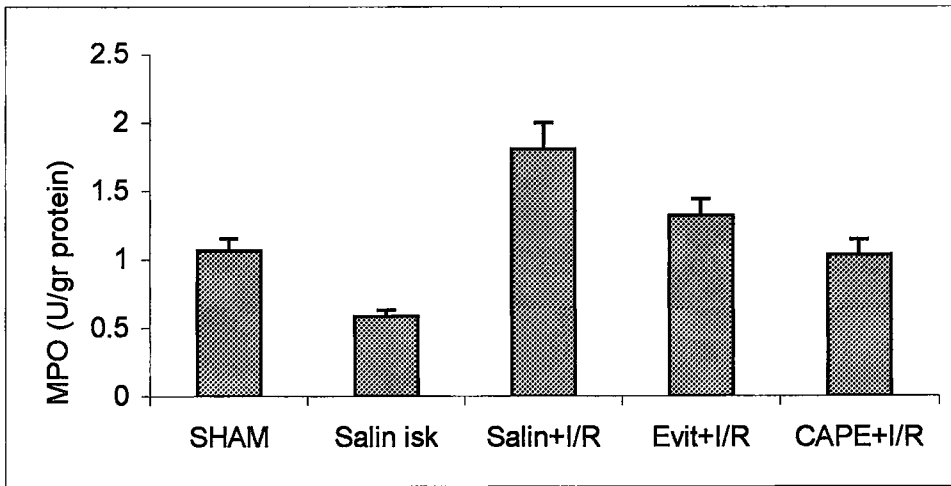
GSH-Px aktivitelerini gruplara göre durumu grafik 7'de ifade edilmiştir. Bu grafiğe göre; salin iskemi ve I/R gruplarında GSH-Px, istatistiksel olarak anlamlı olmayan minimal bir artış göstermiştir. E vitamini uygulanan sıçanlarda enzim aktivitesi hemen hemen sham grubu ile aynı düzeye çekilmiştir. CAPE uygulanması ile GSH-Px aktivitesi hem sham hem de E vitamini grubu ile karşılaştırıldığında önemli oranda artmıştır ($p<0.023$, $p<0.026$). Bu artış salin iskemi ve I/R grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı değildir.



Grafik 7: Sham, iskemi ve I/R gruplarında GSH-Px aktiviteleri.

4.4 Gruplarda MPO aktiviteleri:

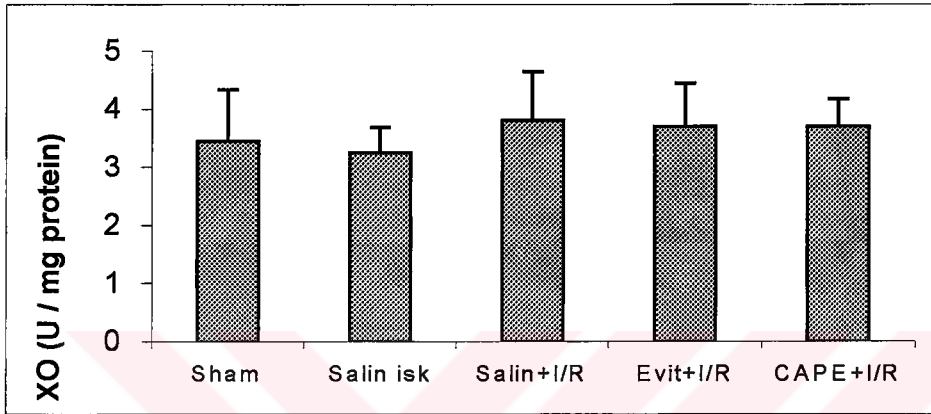
Grafik 8’de görüleceği gibi iskemi grubunda MPO aktivitesi yarı yarıya azalmıştır ($p < 0.0001$). Reperfüzyon ile birlikte doku MPO aktivitesi birdenbire yüksekmiştir (sham ve iskemi ile karşılaştırıldığında $p < 0.0001$). Bu, dokuya nötrofil infiltrasyonunun iyi bir göstergesidir. E vitamini uygulanması MPO aktivitesini azaltmış (I/R grubuna göre $p < 0.0001$) ancak en belirgin azalma CAPE uygulanması ile görülmüştür. Çünkü E vitamini uygulanan grupta MPO aktivitesi halen sham grubundan yüksek iken ($p < 0.001$) CAPE grubu ile sham grubu arasında MPO aktiviteleri arasında herhangi bir fark tespit edilememiştir. Buradan CAPE’nin daha önceki yayınların bazılarında da ifade edildiği gibi antiinflamatuvar etkisinin baskın olduğunu söyleyebiliriz.



Grafik 8: Sham, iskemi ve I/R gruplarında MPO aktiviteleri

4.5 Gruplarda XO aktivitesi:

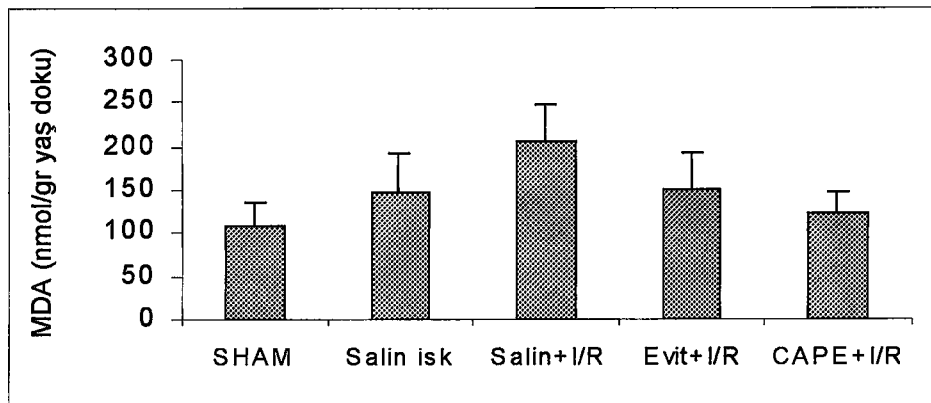
Grafik 9'de görüleceği gibi iskemi ve I/R olaylarında XO aktivitesi değişim göstermemiştir. İskemide minimal bir azalma, I/R'da ise sham ve iskemi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir artış söz konusudur ($p>0.05$). E vitamini ve CAPE gruplarında tespit edilen aktivite değerleri I/R grubuna çok yakın değerlerdir, dolayısıyla bunlarda da sham ve iskemi grubuna göre minimal bir aktivite artışı söz konusudur.



Grafik 9: Sham, iskemi ve I/R gruplarında XO aktivitesi

4.6 Gruplarda karaciğer dokusu MDA miktarları:

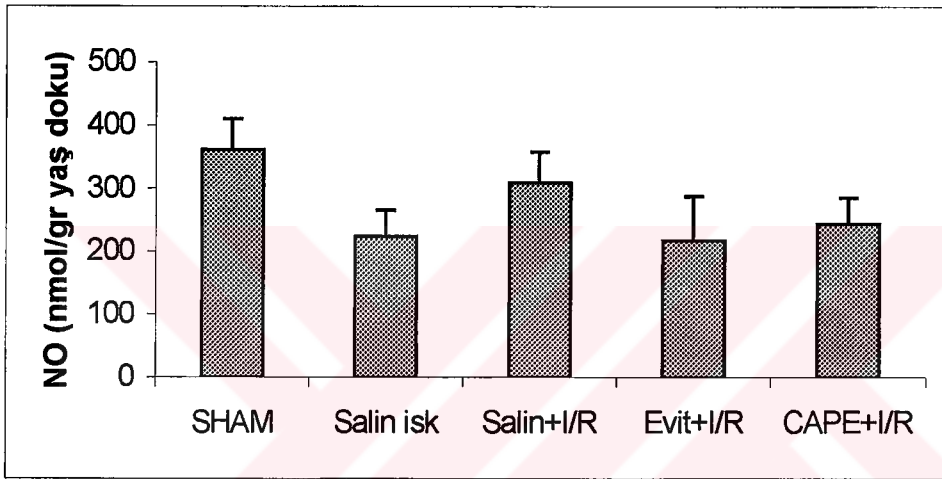
Sonuçlar grafik 10'de gösterilmiştir. Bu grafiğe göre iskemi ve I/R yönüne doğru MDA miktarları gittikçe artan bir değişim izlemiştir. Reperfüzyon ile birlikte artış en üst seviyeye ulaşmıştır. Gruplar arasında elde edilen istatistiksel p değerleri şöyle bulunmuştur: Sham-iskemi arasında $p<0.030$, sham-I/R arasında $p<0.0001$, iskemi-I/R arasında $p<0.001$. E vitamini uygulanması ile MDA düzeyi I/R'da olduğundan daha düşük düzeylere inmiştir ($p<0.001$). Bu düzey hemen hemen iskemi grubu ile aynı olmakla beraber sham grubu ile karşılaştırılınca yine yüksek olduğu fark edilmektedir ($p<0.020$). CAPE lipid peroksidasyonunu en başarılı şekilde azaltarak MDA düzeyini sham grubunda olana çok yakın bir düzeye indirmiştir.



Grafik 10: Sham, iskemi ve I/R gruplarında MDA miktarları

4.7 Gruplarda karaciğer dokusu NO miktarları:

Sonuçlar grafik 11’de özetlenmiştir. İskemi ile birlikte doku NO düzeyi sham grubuna göre oldukça azalmıştır ($p<0.0001$). Reperfüzyon ile NO miktarı tekrar yükselmiş ($p<0.0001$) ancak yeni düzey sham grubuna göre yine de düşük kalmıştır ($p<0.027$). E vitamini ve CAPE uygulanması ile NO düzeyleri tekrar salin-iskemi grubuna yakın bir düzeye inmiştir. Sham ve I/R grupları ile karşılaştırıldığında NO düzeyleri CAPE ve E vitamininden veya başka faktörlerden etkilenerek düşük bulunmuştur (E vitamininde her iki gruba göre $p<0.0001$, CAPE’de ise sırasıyla $p<0.0001$, $p<0.007$)



Grafik 11: Sham, iskemi ve I/R gruplarında NO miktarları

5 TARTIŞMA

Karaciğerin iskemik nekrozu uzun yıllardır çalışılmakta olup hemen hemen bütün yönleriyle aydınlatılmaya çalışılmıştır. İskemiye takiben hepatositlerin plazma membranlarındaki değişiklikler Na^{+2} ve Ca^{+2} iyon dengesinin bozulmasına, takiben de asidoza, ozmotik şoka, kromatin yığılmasına ve nükleer membranın bütünlüğünün bozulmasına sebep olur (125). Na^{+2} iyonları hücreye girerken önemli miktarda suyu da yanına çekerek interstisyel boşluk ile hücre içi arasındaki ozmotik dengeyi korumaya çalışır. Bu arada potasyum hücre içinden interstisyuma çıkar. Bu olayların sonunda mitokondrial fosfolipaz aktive olur. Oksidatif fosforilasyon hızı düşer ve dolayısı ile ATP sentezi azalır. Hücreye aşırı Ca^{++} girmesi sonucunda mitokondri membranı fonksiyon bozukluğu ile beraber irreversibl bir hasar oluşur (126). Sekonder otoliz sonucu olarak (lizozomların şişmesi, dilatasyonu, endoplazmik retikulumun vezikülleşmesi, enzim ve proteinlerin dışarıya sızması ve son olarak hücresel organellerin bütünlüğünün bozulması) membran bütünlüğü kaybolur ve hücre ölür (46).

Son yıllarda karaciğer transplantasyonu tekniklerinin ileri ölçüde gelişmesiyle transplantın kişide problemsiz olarak fonksiyon görme ihtimali de artmıştır. Bütün gelişmelere rağmen henüz aşılammış bazı problemler vardır. Bunların en önemlisi transplantasyon yapıldıktan sonraki ilk bir hafta içerisinde karaciğerin immunolojik olarak reddedilmesinde de rol oynadığı iddia edilen “soğuk reperfüzyon hasarı”dır. Donörden alınan karaciğer, alıcıya implante edilinceye kadar maksimum 24 saat olmak üzere Wiskonsin Üniversitesi (UW) solüsyonunda soğuk ortamda bekletilmektedir. Karaciğerin belli bir süre kanlanma olmadan bekletilmesi, sonra da alıcıya takıldıktan sonra dolaşımın sağlanmasıyla aniden perfüzyonun başlaması, her ne kadar UW solüsyonu içerisinde koruyucu bazı maddeler bulunsa da bir çeşit reperfüzyon hasarı oluşturmaktadır. Transplantasyon dışında, vücudun metabolik merkezi konumunda olan bu organın *in vivo* koşullarda kan akımının zorunlu olarak bir süre kesildiği durumlar da söz konusudur. Bütün karaciğer ameliyatlarında (tümör, travma vs) kanamanın kontrolü ancak bütün afferent damarların okluze edilmesi ile mümkün olabilmektedir. Bütün bu operatif işlemlerin sonunda ise yukarıda bahsedilenden daha farklı bir problem ortaya çıkmaktadır: “sıcak reperfüzyon hasarı”. Toplumda ileri yaşlarda sık görüldüğü için ilk akla gelebilecek miyokard I/R hasarı dışında bütün organların değişik sebeplerle oluşabilecek iskemi reperfüzyon hasarı söz konusudur. Olayın altında yatan sebep ne olursa olsun (ameliyat, tümör, damar tıkanıklığı, travma vs) sonuçta organlarda mekanizması birbirine çok

benzeyen olaylar zinciri meydana gelmektedir. Hücrede enerjinin elde edildiği esas yol elektron transport zinciri, dolayısıyla mitokondrieldir. Burada motor güç moleküler oksijendir, çünkü sonuçta elektronlar oksijene aktarılarak su oluşturulmaktadır. Oksijenin sağlanamadığı durumlarda hücrenin ATP deposu hızla tükenmektedir. Hücrede üretilen enerjinin yaklaşık olarak %70'i hücre membranının bütünlüğünün korunması, ihtiyaç maddelerinin dışarıdan transportu, artık maddelerin aktif ve aktif olmayan yollarla dışarıya atılması, sentez edilen yeni moleküllerin dışarıya salgılanması, Na/K ATPaz başta olmak üzere birçok pompanın çalışması olaylarına harcanmaktadır. Karaciğer merkezi bir organ olduğundan, kan proteinlerinin en büyük kısmı burada sentezlenip salgılandığından ve depo fonksiyonu gördüğünden bu işlemler için daha fazla enerjiye ihtiyaç duyulmaktadır. Depo enerjinin tükenmesi ile birlikte membrandan transport işlemleri yapılamaz, statik değil dinamik bir organel olduğundan yeni moleküller kontrollü olarak yapısına girip çıkamaz, hücre içi ve dışı ortamlar arasında mevcut olan kimyasal ve elektriksel farklılıklar korunamaz ve membran yavaş yavaş bütünlüğünü kaybetmeye başlar. Bu arada reperfüzyonla birlikte başta XO yolu olmak üzere üretilen serbest radikaller membranda lipid peroksidasyon olayını başlatarak hücre lizisine kadar varabilen olaylar zincirini başlatır. Hücre içinde üretilen ROS aynı zamanda organel membranlarında da hücre membranda olana benzer peroksidasyon işlemi başlatır. Nötrofillerin de iskemik dokuda devreye girmesiyle birlikte hücre ölümü hızlanır.

Karaciğerde, mekanizması kısaca yukarıda bahsedilen I/R hasarının önüne geçebilmek için çalışmalarda birçok madde denenmiştir. Bunlardan bazıları glisin (127), kalsiyum kanal blokerleri (128), trimetazidin [1-(2,3,4-trimethoxybenzyl)-piperazine dihydrochloride; vastarel] (129), aktive olmuş protein C (APC) (130), Caspas'lar (131), koenzim Q 10 (CoQ₁₀) ve GSH (132)'dir.

Birçok farmakolojik etkisinin yanında antioksidan özelliği ile de dikkat çeken ve yapısında selenyum içeren Ebselen'in *in vitro* koşullarda karaciğer mikrozomları veya hepatositlerde lipid peroksidasyon ürünlerini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (133). Karaciğer I/R modelinde Ebselen'in hem GSH-Px benzeri aktivitesi hem de dokuya lökosit infiltrasyonunu önleyerek reperfüzyon hasarını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (134).

Yukarıda bahsedilen ajanların yıllar süren çalışmalar sonucunda I/R hasarında etkili olduğu bulunmuştur. Sayılanların dışında da denenilen ve denenmekte olan onlarca madde mevcuttur. Biz bu çalışmada iki antioksidan karakterli maddenin reperfüzyon hasarına olan etkisini araştırmayı amaçladık: E vitamini ve CAPE. Önceki yıllarda E vitamininin değişik analoglarının I/R hasarına etkisi araştırılmış ve önemli bulgular elde edilmiştir. E vitamini

veya alfa-tokoferolün suda çözünebilen formu olan ve *in vitro* koşullarda mükemmel bir antioksidan olan (135) trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid), peroksil radikallerini daha kuvvetli şekilde yok etmektedir (136). Wu ve arkadaşları Trolox'un *in vitro* etkilerini göstermek için kültürü yapılmış sıçan hepatositlerini hipoksantin-ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikaline maruz bırakmışlar ve 1-2 mmol/L konsantrasyondaki trolox'un hücre ömrünü uzattığını bulmuşlardır (137). Aynı çalışmada sıçanlarda parsiyel ve global karaciğer I/R'u oluşturulmuş, reperfüzyonun hemen öncesinde infüzyon şeklinde verilen trolox'un karaciğer nekrozunu %80'den daha fazla bir oranda azalttığını bulmuşlardır. Bu bulgu ayrıca karaciğer dokusundaki konjuge dienlerin %50 oranında azalması ile desteklenmiştir (137). Lee ve arkadaşları hepatik I/R esnasında mikrozomal lipid peroksidasyonu ve sitokrom P-450 bağımlı ilaç metabolizması arasındaki ilişkiyi araştırmış ve bir rat grubuna deneylerden 3 gün önce 10 mg/mL intraperitoneal E vitamini uygulamışlardır (138). Deneylerin sonucunda *in vivo* I/R işlemlerinin mikrozomal ilaç metabolizma yeteneğini bozduğunu, alfa-tokoferolün ise I/R'un oluşturduğu hepatosellüler hasarı önlediğini, mikrozomal ilaç metabolize etme yeteneğini kısmen koruduğunu göstermişlerdir.

E vitamini, yapısında taşıdığı kroman halkası ile antioksidan özellik kazanır. Tokoferol lipid peroksidasyonunu inhibe ederken lipid pertil radikalleri ile reaksiyona girer ve reaktif olmayan tokoferoksil radikallerini oluşturur. Kanda lipoproteinlerle taşınır, hücre membranlarının lipid tabakasında zincir kırıcı antioksidan olarak görev alır. Bu çalışmada E vitamininin tek doz halinde intraperitoneal uygulanmasının yaklaşık 3 saatlik periyod içerisinde karaciğer I/R hasarını önlemedeki etkinliği araştırıldı. Malondialdehit düzeyleri göz önüne alındığında E vitamininin kısmen reperfüzyonun lipid peroksidasyonu üzerinden yaptığı hasarı engellediği söylenebilir (139). E vitamini sham grubunda tespit edilen MDA değerine kadar düşürmese de salin + I/R grubunda tespit edilen doku MDA düzeyini uygulandığı grupta oldukça düşürmüştür ($p < 0.001$).

Kafeik asit fenetil ester, bal arılarının ürettiği propolisin aktif bir komponentidir. Mikromolar konsantrasyon aralığında linoleik asit ve araşidonik asitin 5-lipooksijenaz tarafından oluşturulan oksijenasyonunu inhibe eder. Yaklaşık olarak 10 μ mol/L konsantrasyonda *in vitro* koşullarda nötrofiller veya ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerini tamamen bloke eder (140). Yapılan çalışmalarda CAPE'nin antiinflamatuvar, sitostatik, antiviral, antibakteriyel, antifungal ve antioksidan özellikleri olduğu gösterilmiştir (141,142). CAPE ile ilgili yukarıda belirtilen konularda bir hayli çalışma bulunmakla birlikte iskemi/reperfüzyon sistemlerinde

yararlılığının araştırıldığı sınırlı sayıda araştırma mevcuttur. İlhan ve arkadaşları CAPE'nin spinal I/R injurisine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, tavşanlara aort oklüzyonundan 30 dakika önce intraperitoneal olarak verilen CAPE'nin hem histolojik hem de biyokimyasal açılardan reperfüzyon hasarını azalttığını bulmuşlardır (143). Bu çalışmada salin uygulanan reperfüzyon grubunda spinal kord dokusu MDA düzeyi 124.2 nmol/gr yaş doku bulunurken, CAPE uygulanan grupta 56.8 nmol/gr yaş doku bulunmuştur. SOD ve CAT enzimleri üzerine de normalize edici bir etkisi olduğu görülmüştür. Ayrıca histolojik kesitlerde nöronlarda Nissle cisimciklerinin degranülasyonu, kapiller proliferasyon, aşırı vakuolizasyon ve sitoplazmik sınırın kaybolması ile karakterize hücre ölümünü CAPE'nin azalttığı veya tamamen önlediği tespit edilmiştir. Ayrıca metil prednizolon ile karşılaştırıldığında I/R hasarına rağmen daha iyi bir nörolojik skor bulunmuştur. CAPE'nin rat ince barsak I/R hasarı üzerine etkisi ise Koltuksuz ve arkadaşları tarafından araştırılmıştır (144). Bu çalışmada özellikle histolojik kesitlerde skorlama yapıldığında CAPE'nin barsakları reperfüzyon hasarından koruduğu gösterilmiştir. CAPE grubunda MDA düzeylerinde salin-reperfüzyon grubuna göre bir düşüş bulunmakla birlikte bu istatistiksel açıdan anlamlı değildir. Araştırmacılar sonuç olarak CAPE'nin muhtemelen hem antioksidan hem de nötrofil infiltrasyonunu azaltıcı etkisi ile reperfüzyon hasarından barsakları koruduğunu iddia etmişlerdir. Yaptığımız literatür taramalarında CAPE'nin karaciğer I/R modellerinde çalışıldığına dair herhangi bir bulguya rastlamadık. Dolayısıyla bu çalışma sahasında ilk çalışma olmuştur.

Karaciğer de dahil olmak üzere vücudun diğer dokularında I/R modellerinde endojen antioksidanlar yeterince çalışmamıştır. Antioksidan enzimlerin etkileri Şekil 4'de özetlenmiştir. Antioksidan enzimlerin çalışıldığı araştırmalar daha çok kalp ve intestinal sistem ile ilgilidir. Loeper ve arkadaşları miyokard infarktüs ve anjina pektorisli kişilerde eritrosit içi SOD ve GSH-Px aktivitelerini araştırmışlar, infarktüsteki sonraki günlerde zamana bağımlı olarak aktivitelerin irregüler bir tarzda değiştiğini fakat genel olarak enzim aktivitesinin azaldığını bulmuşlardır (145). İntestinal iskemide erken ve geç dönemlerde serum antioksidan kapasitesinin araştırıldığı bir diğer çalışmada erken dönemde serum antioksidan kapasitenin arttığı bulunmuştur (146). Bu sonuçlar direkt olmasa da indirekt olarak I/R hasarından sonra serumda antioksidan enzimlerin artmış olabileceği hakkında fikir verebilir. Genel olarak bakıldığında bizim çalışmamızda iskemi ve reperfüzyon süreçlerinde anlamlı olmasa da doku CAT ve GSH-Px aktiviteleri artmıştır. SOD enziminde ise herhangi bir değişiklik olmamıştır. E vit + I/R grubunda enzim aktiviteleri Sham

grubuna çok yakın iken CAPE + I/R grubunda her üç enzimin aktivitesi de artmıştır. CAPE'nin hangi mekanizma ile karaciğer antioksidan enzimlerinin aktivitesini arttırdığı en azından şu anda bilinmemektedir. Jaiswal ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada hepatoma hücrelerinin (Hep G2) CAPE ile muamele edilmesi NAD NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) geninin ekspresyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir. Fenolik bir antioksidan olan CAPE'nin insan antioksidan cevap elemanı (hARE) olarak adlandırılan reporter genin bulunmasına veya eksik olmasına göre veya rodent hepatoma (Hepa-1) transfektanlarında bu elemanın mutant bir versiyonunun bulunmasına göre NQO1 genini stimüle edebileceğini belirtmişlerdir (147). Bu bulgudan hareketle, CAPE'nin antioksidan enzimler olan SOD, CAT ve GSH-Px'in aktivitesini, bu enzimlerin genlerinin ekspresyonunu muhtemel bir etki ile arttırabileceği delilsiz olmakla birlikte bir ihtimal olarak söylenebilir. Reperfüzyon şartlarında CAPE'nin bu etkiyi göstermesi ise ayrıca irdelenmesi gereken bir konudur. Çünkü bu patolojik koşullarda CAPE'nin oksijen ve lipid radikalleri ile etkileşimi bu süreci etkilemiş olabilir. Bu konunun daha iyi anlaşılabilmesi için yine I/R modeli oluşturulmuş ratlarda ve hiçbir şey yapılmayan fakat peritonu açılan ratlarda intraperitoneal olarak uygulanan CAPE'nin adı geçen enzimlerin aktivitesinin ve eğer mümkün ise Northern Blot tekniği ile mRNA'larının karşılaştırmalı olarak tespit edilmesi gerekir. Enzim aktivitesi tek başına gen ekspresyonunun arttığı anlamına gelmeyebilir, çünkü fizyolojik ve patolojik koşullarda aktiviteyi etkileyen bir hayli sebep vardır.

Nitrik oksit (NO) karaciğerin hem soğuk hem de sıcak reperfüzyon hasarlarında detaylı olarak çalışılmıştır. Nitrik oksitin oksidatif hasardaki yeri şekil 4'de özetlenmiştir. Suda ve lipidde çözünebilir bir serbest radikal olan nitrik oksit L-arginin'den nitrik oksit sentazların (NOS) katalizi ile endojen olarak üretilmektedir. Normal ve birçok patolojik süreçte NO dokuya kan akımı ve doku hasarının modüle edilmesinde önemli rol oynamaktadır. İskemi, vasküler endotelde ve ardından dokuya infiltre olan nötrofiller ve makrofajlarda NOS aktivitesinde artışa sebep olur (148). İskemi esnasında doku NO düzeyi artarken reperfüzyon ile değişik mekanizmalarla süperoksit radikali üretimi artar. Bu iki bileşimin reaksiyonu ile peroksinitrit (ONOO⁻) oluşur. Nitrik oksidin O₂⁻ ile ortamdan uzaklaştırılması reperfüzyon esnasında oluşan NO azalmasının sebebi olabilir (149). Sıçan karaciğerlerinin çıkarılarak soğuk koşullarda UW solüsyonu içerisinde farklı sürelerde bekletilerek donöre transplante edildiği bir çalışmada, transplantasyondan sonra 24 ve 48 saatlerde karaciğer biyopsileri alınarak doku NO düzeyleri ve iNOS ekspresyonu Western blotting tekniğiyle araştırılmıştır (150). Sonuçta uzun süreli bekletilmenin NOS aktivitesini

ve miktarını arttırdığı bulunmuş ve NO'nun I/R aracılı hasarda rol oynadığı ve NOS inhibitörlerinin faydalı olabileceği yorumu yapılmıştır. Nitrik oksit sentazın inhibe edilerek sıçanlarda karaciğer I/R hasarının incelendiği bir çalışmada (151) hasarın şiddeti ile iskemik loblara polimorfonükleer lökositlerin göçü ve iNOS aktivitesindeki 8 katlık artış arasında önemli bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür. Bununla birlikte NO düzeyi I/R işleminden sonra muhtemelen peroksinitrit oluşumu sebebiyle azalmıştır. NOS inhibitörünün (N^ω-nitro-L-arginine methyl ester) verildiği sıçanlarda ise hem iskemik hem de iskemik olmayan karaciğer loblarında iNOS aktivitesi azalmış, plazma ve karaciğer NO seviyesi düşmüştür, bununla birlikte NOS inhibisyonu kan ALT düzeyini artırmış, karaciğerin iskemik ve iskemik olmayan loblarına nötrofil geçişini artırmış, dolayısıyla karaciğer hasarını hızlandırmıştır. Bu sonuç yukarıda adı geçen yayında bahsedilen NOS inhibitörlerinin soğuk reperfüzyon hasarını azaltabileceği teorisini desteklememektedir. NOS inhibitörü L-NAME verilen bir diğer çalışmada sıçan karaciğerinde I/R işleminden sonra karaciğerde lipid peroksidasyon ürünlerinden olan malondialdehit ve konjuge dien seviyesi artmış, dolayısıyla hasar ilerlemiştir (152). Portal yolla eksojen L-arginin verilmesi ise hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde reperfüzyondan hemen sonra önemli miktarda NO üreterek hem portal hipertansiyonu hem de reperfüzyon hasarını önlemektedir (153). Low-flow, reflow modeli ile yapılan başka bir karaciğer perfüzyon modelinde de L-argininin reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir (154). Çalışmamızda karaciğer dokusu NO düzeyi iskemide daha belirgin olmak üzere I/R'dan sonra azalmıştır. CAPE ve E vitamini gruplarında da bu azalma belirgin bir şekilde devam etmiştir. Bu bulguya zıt olarak farklı bir doku olan testislerde CAPE'nin doku NO düzeyini arttırarak koruyucu etki yaptığı bulunmuştur (148). Yukarıda da bahsedildiği gibi (151) karaciğer I/R'undan sonra NO artışı iNOS artışına paralellik arz etmeyebilir. Çünkü XO sistemi başta olmak üzere değişik yollarla üretilen süperoksit NO ile hızla birleşerek peroksinitrit oluşturmaktadır. Dolayısıyla bizim I/R'dan sonra NO düzeylerini düşük bulmamız, gerçekten NO miktarının azaldığı veya artıp sonradan azaldığı anlamına gelebilir. Bunun açığa kavuşturulması iNOS aktivitesinin tayini veya miktarının tayin edilmesiyle mümkün olur. Bir diğer ihtimal ise, I/R'dan sonra iskemik karaciğerden önemli miktarda arginaz'ın açığa çıkması ve arginin'i, NO üretilmeyen bir yol ile tüketmesidir. Bu durumda da L-arginin/NO yolağı fonksiyon görmeyebilir (155). L-arginin verilerek hepatik I/R oluşturulan diğer çalışmalarda da nitrik oksitin reperfüzyon hasarını azalttığı histolojik ve biyokimyasal olarak gösterilmiştir (156,157). Bu çalışmalarda reperfüzyon hasarının belirteci olarak biyokimyasal

parametrelerden kan AST, ALT, LDH, NO, total safra asitleri ve hyaluronik asit düzeyleri ile doku adenin nükleotidleri çalışılmıştır. Farklı bir bakış açısı olarak Jaeschke ve arkadaşları karaciğer I/R hasarına reperfüzyon esnasında lokal veya sistemik olarak üretilen NO veya peroksinitritin hiçbir etkisinin olmadığını iddia etmişlerdir (158). 24 saatlik reperfüzyon periyodu esnasında sıçanların idrarında nitrit seviyesinde değişme olmaması, karaciğer dokusunda guanilat siklaz aktivitesi ve cGMP düzeyinde bir değişiklik olmaması bulgularından hareketle bu sonuca varılmıştır. Araştırmacılar karaciğer cGMP içeriğinin NO üretimi ile bire bir ilişkili olduğunu bu yüzden hassas bir parametre olabileceğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak elde edilen veriler NO'nun karaciğer I/R hasarında hem hasarı önleyici, hem artırıcı olabileceği anlaşılmaktadır. Bazı araştırmacılar ise hiçbir etkisinin olmadığını savunmaktadırlar. L-arginin veya herhangi bir NOS inhibitörü vermeden yaptığımız çalışmamızda NO düzeylerinin antioksidan ajanların ortamda bulunmasının etkilemediği bir süreçle azaldığını tespit ettik. İskemi grubunda karaciğer NO düzeyinin önemli derecede düşmesi ve reperfüzyon periyodunda tekrar yükselmesi kompleks bir mekanizma ile NO'nun I/R sürecinde etkin rol oynadığı hakkında fikir verebilir.

Reperfüze karaciğer dokularında XO aktivitesi sham grubuna göre minimal bir artış göstermiştir. Bu bulgu, teorik olarak olması beklenen, ksantin dehidrogenazın iskemik ortamda proteolitik olarak parçalanıp XO oluşması olayı ile uyumludur. CAPE ve E vitamini uygulanan sıçanlarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. İnsan (159,160) çalışmalarında ve deney hayvanı çalışmalarında (161) adenin nükleotid metabolizması ile karaciğer transplantının normal fonksiyon görebilmesi arasında korelasyon tespit edilmiştir. Ayrıca deneysel iskemi oluşturulmuş karaciğerin perfüze edildikten sonra içerdiği pürin seviyeleri ile hepatik fonksiyon arasında direkt bir bağlantı vardır (162). Bu açılarından hipoksantin, ksantin ve XO'nun büyük önemi vardır. Pesonen ve arkadaşları insan karaciğer transplantasyonu esnasında oluşan reperfüzyonun ardından dolaşımdaki ksantin, XO ve hipoksantin arttığını bulmuşlardır (163). Bir başka çalışmada iki saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon yapılan sıçan karaciğerinde hem XDH hem de XO aktivitesi kontrol grubuna göre azalmıştır (164). Bunlardan sadece XDH aktivitesindeki azalma anlamlı bulunmuştur. Sonuçlarımız bu çalışma ile ters olsa da değişmelerin anlamsız olması yönüyle birbirine benzemektedir. Adı geçen çalışmada ayrıca serum XO aktiviteleri ölçülmüş, 1 dakika ve 30 dakika reperfüzyondan sonra serum XO aktivitelerinin kontrole göre anlamlı şekilde arttığı, 60, 90 ve 120. dakikalardaki artışın ise anlamsız olduğu tespit edilmiştir. Total XO + XDH aktiviteleri incelendiğinde de aynı artışla karşılaşılmıştır. Değişik deney hayvanlarında XO inhibitörleri verilerek deneysel I/R hasarı oluşturulmuş ve hasar derecesi birçok çalışmada

araştırılmıştır. Matsumura ve arkadaşları yeni ve potent bir XO inhibitörü olan BOF-4272'nin sıçan karaciğerinde reperfüzyon hasarını takiben sitokinle uyarılan nötrofil kemoatraktan (CINC) üretimine etkisini araştırmışlar ve kupffer hücrelerinin oksijen radikallerine cevaben CINC üretimini azalttığını bulmuşlardır (165). Dolayısıyla nötrofillerin iskemik bölgeye invazyonunu arttıran ve kupffer hücrelerince üretilen CINC'in XO inhibitörlerinin uygulanmasıyla azalması, bölgeye nötrofil göçünü azaltmıştır. Metilen mavisinin hem iskemiden önce hem de reperfüzyondan hemen sonra verilmesinin I/R hasarını önlediği bulunmuştur (166). Bunu XO'dan elektron alarak dolayısıyla moleküler oksijenin indirgenmesini önleyerek yapmaktadır. Böylece ksantin ve hipoksantin anaerobik yolla yıkılmaya zorlanmaktadır.

Teorik olarak reperfüze dokuya ksantin infüzyonu I/R hasarını arttıracaktır. Fakat bu beklentiye zıt olarak low flow-reflow modeli ile I/R yapılan sıçanlarda ksantin infüzyonu reperfüzyon hasarını azaltmıştır (167). Bunu araştırmacılar, XO'ın sadece süperoksit üretmediğini aynı zamanda antioksidan özelliği olan ürik asit ürettiğini, hasar çapının ürik asit/süperoksit anyonu oranı ile belirlenebileceği iddia etmişlerdir. Bu çalışmadan hareketle, karaciğer I/R'u esnasında olaya sadece O_2^- açısından bakılmamalı, ürik asitin *in vitro* olarak singlet oksijen, hidroperoksit ve hidroksil radikalini süpürücü etkisi (168) ile reperfüzyon hasarını orana bağımlı olarak önleyebileceği göz önüne alınmalıdır. Bununla beraber çalışmamızda karaciğer MDA düzeylerinin sham → iskemi → reperfüzyon yönünde yükselmesi ürik asitin iddia edilen serbest radikalleri süpürücü etkisinin I/R şartlarında pek etkili olmadığını göstermektedir.

Reperfüzyondan sonra nötrofillerin karaciğer dokusuna infiltrasyonu, karaciğer dokusu ve damarsal yapılarda meydana gelen iskemi ile indüklenen bir seri kompleks reaksiyonlar sonucu gerçekleşmektedir. Nötrofillerin dokuya geçişi ve burada I/R hasarı oluşturmaları konusunda rol alan bir çok hipotez ileri sürülmüştür: a) iskemik olarak hasara uğrayan endotel veya hepatositlerden serbest oksijen radikalleri gibi bazı kimyasal nötrofil çekicilerin (kemoatraktanlar) salgılanması (169,170), b) TNF (171,172), interlökin IL1 (173,174) ve platelet aktive edici faktör (175) gibi bazı enflamasyon araçlarının Kupffer hücreleri ve/veya hepatositlerde üretilmesi; c) hücre içi adezyon molekülü (ICAM) ve MHC class II gibi yüzey antijenlerinin mikrovasküler ekspresyonunda hücrel değişiklikler (176), d) enflamasyon hücre tiplerini ilgili alana sürekli olarak kimyasal yolla çekimini sağlayacak olan süperoksitlerin aktive olmuş nötrofiller tarafından salgılanması (169,170). Birçok çalışma karaciğerin reperfüzyonundan sonra aşırı serbest oksijen radikali üretimi sonucu hepatosellüler hasar, nekroz ve sonuç olarak inflamatuvar infiltrasyon olduğunu

göstermiştir (177,178). Olayı tetikleyen bu serbest radikallerin kaynağının mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte reperfüzyonun akut fazında kupffer hücreleri, hepatositler, ekstrasellüler XO ve inflamatuvar safhada nötrofiller olduğu çalışmalardan anlaşılmaktadır (179-181). Doku myeloperoksidaz aktivitesi dokuya nötrofil göçünü gösterebilecek iyi bir parametredir (182). Bu çalışmanın en önemli bulgularından biri de şüphesiz karaciğer dokusunda yapılan myeloperoksidaz aktivite tayinlerinin sham, iskemi ve reperfüzyon gruplarında oldukça anlamlı çıkmasıdır. İskemik fazda karaciğer dokusunda MPO aktivitesi düşük çıkmıştır. Bunun muhtemel açıklaması, kan akımının durmasıyla birlikte mevcut hapsedilmiş kanda bulunan nötrofillerin dışında kan hücrelerinin bu sahaya ulaşamamış olmasıdır. Ardından gerçekleşen reperfüzyon ile kan akımı sağlanınca 120 dakika boyunca, daha önceden belirtilen mekanizmalarla kimyasal çekimin de etkisiyle nötrofiller iskemik dokuya infiltre olmuş ve doku MPO aktivitesi sham grubuna oranla yaklaşık olarak %75 artmıştır. MDA düzeyinin de reperfüzyondan sonra sham grubuna göre yaklaşık %120, iskemi grubuna göre de yaklaşık %80 artması, nötrofillerin lipid peroksidasyonunda önemli bir katkılarının olduğunu göstermektedir. Bunlardan daha da önemli bir bulgu da CAPE grubunda doku MPO aktivitesinin hemen hemen sham grubu ile eşit olmasıdır. Buradan CAPE'in etkin bir şekilde reperfüzyon esnasında nötrofillerin iskemik dokuya infiltrasyonunu engellediği yorumunu yapabiliriz. E vitamini aynı derecede başarılı olamamakla birlikte nötrofil geçişini azaltmıştır. CAPE ve E vitamini bu etkiyi nasıl göstermiştir? CAPE ile ilgili yapılan daha önceki çalışmalarda iskemik dokuya nötrofil göçünün azalabileceği ifade edilmiştir (143,144). Muhtemelen CAPE antioksidan etkisiyle serbest radikalleri yok etmekte, dolayısıyla kimyasal çekici olarak görev yapan faktörler uzaklaşınca nötrofil göçü azalmaktadır. E vitamininin de benzer bir etki ile nötrofil invazyonunu azaltabileceği söylenebilir.

Sonuç olarak;

1) Karaciğerde iskemi ve reperfüzyon süreçleri antioksidan enzim aktivitelerinde herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır. CAPE, E vitamininden farklı olarak direkt veya indirekt bir mekanizma ile patolojik dokuda enzim aktivitelerinde anlamlı bir artışa neden olmuştur.

2) Daha önce yapılan birçok çalışmada da gösterildiği gibi reperfüze dokuda istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da XO aktivite artışı tespit edilmiştir. Bu değişimin I/R hasarında rolü olduğu söylenebilir. Ayrıca MPO aktivitesinin I/R grubunda sham ve iskemi gruplarına göre oldukça yüksek bulunması, iskemik dokuya nötrofil infiltrasyonu olduğunu göstermektedir. Doku hasarında en büyük fonksiyonu nötrofillerin gördüğü söylenebilir.

Doku MDA düzeylerinin iskemi ve I/R gruplarında artması serbest radikallere bağlı lipid peroksidasyonunun olduğunu göstermektedir. E vitamini ve CAPE anlamlı bir şekilde MDA düzeylerini azaltmıştır.

3) CAPE iskemik dokuya muhtemelen daha önceden gösterilmiş olan antienflamatuar etkisi ile nötrofil invazyonunu engelleyerek I/R doku hasarını azaltmaktadır.

4) Karaciğerin soğuk ve sıcak reperfüzyon hasarlarında E vitamini ve CAPE'nin ayrı ayrı veya kombine olarak kullanılmasının karaciğer dokusunun korunmasında tam veya kısmi faydası olabileceği görüşündeyiz.



6 ÖZET

Bu çalışmada, deneysel olarak sıçan karaciğerlerinde iskemi-reperfüzyon (I/R) oluşturulup antioksidan enzimlerin durumları incelenmiş, doku hasarına E vitamini ve kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla her bir grupta 10 sıçan olmak üzere; sham, iskemi, I/R grupları oluşturulmuş, I/R gruplarına da E vitamini ile CAPE intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

Salin-iskemi grubunda sham grubuna göre MDA miktarında anlamlı artış ($p<0.039$), MPO aktivitesinde ve NO miktarında ise anlamlı düşüş gözlenmiştir (her ikisinde de $p<0.0001$). Salin-I/R grubunda sham grubuna göre MDA miktarında ve MPO aktivitesinde anlamlı artış (her ikisinde de $p<0.0001$), NO miktarında ise anlamlı düşüş gözlenmiştir ($p<0.027$). E vitamini uygulanan sıçanlarda sham grubuna göre MDA miktarında ve MPO aktivitesinde artış (sırasıyla $p<0.020$, $p<0.001$), NO miktarında ise anlamlı düşüş olmuştur ($p<0.0001$). Salin I/R grubuna göre ise MDA miktarı, MPO aktivitesi ve NO miktarında anlamlı düşüş gözlenmiştir (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.0001$, $p<0.0001$).

CAPE uygulanan sıçanlarda sham grubuna göre SOD aktivitesi, CAT aktivitesi, GSH-Px aktivitesi anlamlı şekilde artmış (sırasıyla $p<0.014$, $p<0.003$, $p<0.023$), MDA miktarı ve MPO aktivitesi değişmemiş, NO miktarı ise anlamlı şekilde düşmüştür ($p<0.0001$). Salin-I/R oluşturulan sıçan grubuna göre ise CAT aktivitesinde anlamlı artış ($p<0.010$), MDA miktarı, MPO aktivitesi ve NO miktarında anlamlı düşüş gözlenmiştir (sırasıyla $p<0.0001$, $p<0.0001$ ve $p<0.007$). E vitamini uygulanmış sıçan gruplarına göre ise SOD aktivitesi, CAT aktivitesi ve GSH-Px aktivitesi ile kıyaslandığında anlamlı artış olmuştur (sırasıyla $p<0.005$, $p<0.015$ ve $p<0.026$). MDA ve NO miktarlarında bir değişiklik gözlenmemiştir.

CAPE uygulanan sıçanlarda E vitamini uygulanan sıçanlara göre SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde artış gözlenmesi antioksidan savunmayı güçlendirmesine delil olabilir. Lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA'nın CAPE grubu ile sham grubunda hemen hemen aynı olması ve salin-I/R grubu ile karşılaştırıldığında E vitaminine göre MDA'yı daha fazla düşürmesi hasarın derecesini önemli ölçüde azalttığı anlamına gelebilir. Bu çalışmanın en önemli bulgularından biri CAPE'nin reperfüzyon esnasında iskemik dokuya nötrofil invazyonunu engellediğinin delili olan MPO aktivitesinin düşük bulunmasıdır. Sonuçta CAPE'nin I/R hasarında antioksidan savunma mekanizmasını desteklediği, nötrofil göçünü engelleyerek respiratuvar patlama olaylarının önüne geçtiği ve E vitaminine göre daha kuvvetli etkisinin olduğu görülmüştür. CAPE'nin karaciğer sıcak reperfüzyon hasarında tedavi amaçlı olarak kullanılması önerilebilir.

7 SUMMARY

THE OXIDANT/ANTIOXIDANT STATUS OF RAT LIVER AFTER EXPERIMENTAL ISCHEMIA-REPERFUSION: THE EFFECTS OF VITAMIN E AND CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER (CAPE) ON TISSUE INJURY

In this experimental study, antioxidant enzyme activities and some parameters involved in the pathological process of the tissue damage were investigated in rat liver after ischemia-reperfusion (I/R). The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and vitamin E on tissue damage were also investigated. For this purpose, Wistar albino rats were divided into 5 equal groups each consisting of 10 rats. CAPE and vitamin E were applied intraperitoneally in the I/R groups.

While tissue malondialdehyde (MDA) level was significantly increased ($p < 0.039$), myeloperoxidase (MPO) activity and nitric oxide (NO) levels were significantly decreased ($p < 0.0001$) in saline-ischemia group compared to sham operation group. In saline-I/R group, MDA level and MPO activity were found to be elevated and NO level was found to be decreased ($p < 0.027$) compared to both sham operation and ischemia groups. Tissue MPO activity and MDA level were increased ($p < 0.020$ and $p < 0.001$, respectively) and NO level decreased ($p < 0.0001$) in Vit E + I/R group compared to sham operation group. When compared to I/R group, all these three parameters were found to be decreased after Vit E treatment. Vitamin E did not change the antioxidant enzyme activities. Increase in superoxide dismutase (SOD) ($p < 0.014$), catalase (CAT) ($p < 0.003$) and glutathione peroxidase (GSH-Px) ($p < 0.023$) activities and decrease in tissue NO level ($p < 0.0001$) were found in CAPE + I/R group when compared to sham operation group. MDA and NO levels, and MPO activity were found to be significantly decreased ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$ and $p < 0.007$, respectively) in CAPE + I/R group compared to I/R group. When compared to Vit E + I/R group, the antioxidant enzyme activities were significantly increased but MPO activity was decreased in CAPE + I/R group. There was no difference in MDA and NO levels between Vit E and CAPE groups.

Overall our result demonstrates that CAPE may be a potent and a specific inhibitor of neutrophil invasion to damaged tissue after reperfusion injury (CAPE suppressed the oxidative burst of rat polymorphonuclear leukocyte infiltration into rat liver as quantified by MPO activity). These reports provide further evidence that CAPE may increase the activities of antioxidant enzymes in I/R model. CAPE may be more useful for the treatment of warm reperfusion injury in the liver, than Vit E.

8 KAYNAKLAR

- 1) Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Temel Histoloji. Barış Kitabevi/Appleton & Lange. İstanbul 1993:380-394.
- 2) Guyton AC, Hall JE. (Çavuşoğlu H Ed) Tıbbi Fizyoloji. 9. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi / W.B. Saunder Com. İstanbul 1996; 883-888.
- 3) Sayek İ. Temel Cerrahi. 2. Baskı. Güneş Kitabevi. Ankara 1996:1205-1210.
- 4) Champe PC, Harvey RA. Lippincott's Illustrated reviews serisinden: Biyokimya. 2. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul 1997:171-190.
- 5) Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's Biochemistry. 24th edition. Appleton & Lange. London 1996:343-357.
- 6) Lichtman SN, Lemasters JJ. Role of cytokines and cytokine-producing cells in reperfusion injury to the liver [Cytokines in liver injury and repair] Seminars in Liver Disease 1999; 19:171-187.
- 7) Kawano K, Kim YI, Kaketani K, Kobayashi M. The beneficial effect of cyclosporine on liver ischemia in rats. Transplantation 1989; 48:759-764.
- 8) Nieminen AL, Gores GJ, Wray BE, Tanaka Y, Herman B, Lemasters JJ. Calcium dependence of bleb formation and cell death in hepatocytes. Cell Calcium 1988; 9:237-246.
- 9) Clavien PA. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. Hepatology 1998; 28:281-285. [Review]
- 10) Lemasters JJ, Thurman RG. Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1997; 37:327-338. [Review]
- 11) Southard JH, Belzer FO. Organ preservation. Annu Rev Med 1995; 46:235-247. [Review]
- 12) Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. Transplantation 1992; 53:957-978. [Review]
- 13) Kiuchi T, Schlitt HJ, Oldhafer KJ, Nashan B, Ringe B, Kitai T, Tanaka A, Wonigeit K, Yamaoka Y, Pichlmayr R. Backgrounds of early intragraft immune activation and rejection in liver transplant recipients. Impact of graft reperfusion quality. Transplantation 1995; 15:49-55.
- 14) Cutrin JC, Cantino D, Biasi F, Chiarpotto E, Salizzoni M, Andorno E, Massano G, Lanfranco G, Rizzetto M, Boveris A, Poli G. Reperfusion damage to the bile canaliculi in transplanted human liver. Hepatology 1996; 24:1053-1057.
- 15) Starzl TE. Liver transplantation. Johns Hopkins Med J 1978; 143:73-83.
- 16) Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, Sugiyama S, Ozawa T, Takagi H. Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats. J Surg Res 1991; 51:240-244.
- 17) Gonzalez-Flecha B, Reides C, Cutrin JC, Llesuy SF, Boveris A. Oxidative stress produced by suprahepatic occlusion and reperfusion. Hepatology 1993; 18:881-889.

- 18) Hasselgren PO. Prevention and treatment of ischemia of the liver. *Surg Gynecol Obstet* 1987; 164:187-196. [Review]
- 19) Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British J Surg* 1994; 81:637-647. [Review]
- 20) Rhodes RS, DePalma RG. Mitochondrial dysfunction of the liver and hypoglycemia in hemorrhagic shock. *Surg Gynecol Obstet* 1980; 150:347-352.
- 21) Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986; 250:G749-753.
- 22) Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatology* 2000; 32:508-515. [Review]
- 23) Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Rad Res Comm* 1991; 15:277-284.
- 24) Urata K, Brault A, Rocheleau B, Huet P-M. Role of Kupffer cells in the survival after rat liver transplantation with long portal vein clamping times. *Transpl Int* 2000; 13:420-427.
- 25) Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol* 1993; 264:G801-809.
- 26) Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkiler. *Mimoza Yayınları, Konya* 1995:1-132.
- 27) Esterbauer H, Cheeseman K. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde on related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11:81-128.
- 28) Esterbauer H, Zollner H, Schaur RJ. Hydroxyalkenals: cytotoxic products of lipid peroxidation. *ISI Atlas Sci* 1988; 1:311-317.
- 29) Akyol Ö. Beyin tümörlerinde doku superoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri. *Uzmanlık tezi. Ankara Üniv. Tıp Fak. Biyokimya A.D., 1994.*
- 30) Onat T, Emerk K. *Temel Biyokimya. Saray Medikal Yayıncılık 2. Baskı: Radikal kavramı ve oksijen radikalleri. İzmir* 1997:520-528.
- 31) Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals and metal ions in human disease. An overview. *Methods Enzymology* 1990; 186:1-85.
- 32) McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein. *J Biol Chem* 1969; 224:6049-6055.
- 33) Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *J Mol Med* 1999; 77:577-592. [Review]
- 34) Keele BB, McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B. A new manganese-containing enzyme. *J Biol Chem* 1970; 245:6176-6181.
- 35) Siddons RC, Mills CF. Glutathione peroxidase activity and erythrocyte stability in calves differing in selenium and vitamin E status. *Br J Nutr* 1981; 46:345-355.
- 36) Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease; curiosity, cause or consequence?. *Lancet* 1994; 344:721-724.
- 37) Aebi H. Catalase In: Bergmeyer U, ed. *Methods of enzymatic analysis. New York and London: Academic Press, 1974; pp.673-677.*

- 38) Deisseroth A, Dounce AL. The purification and crystallization of beef erythrocyte catalase. *Arch Biochem Biophys* 1969; 131:18-29.
- 39) Agar NS, Sadrzadeh SM, Hallaway PE, Eaton JW. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? *J Clin Invest* 1986; 77:319-321.
- 40) Mirzoena OK, Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996; 55:441-449.
- 41) Bhimani RS, Troll W, Grunberger D, Frenkel K. Inhibition of oxidative stress in HeLa cells by chemopreventive agents. *Cancer Res* 1993; 53:4528-4533.
- 42) Huang M, Ma W, Yen P, Xie J, Han J, Frenkel K, Grunberger D, Conney AH. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in mouse skin and the synthesis of DNA, RNA and protein in HeLa cells. *Carcinogenesis* 1996; 17:761-765.
- 43) Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Olts EM, Efros L, Caldwell M, Estevez V, Nakanishi K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 1988; 44:230-232.
- 44) Su ZZ, Lin J, Grunberger D, Fisher PB. Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in type 5 adenovirus-transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression. *Cancer Res* 1994; 54:1865-1870.
- 45) Hepsen IF, Bayramlar H, Gultek A, Ozen S, Tilgen F, Evereklioglu C. Caffeic acid phenethyl ester to inhibit posterior capsule opacification in rabbits. *J Cataract Refract Surg* 1997; 23:1572-1576.
- 46) Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 1989; 70:737-757. [Review]
- 47) Weiss SJ. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986; 548:9-37.
- 48) Singal PK, Kapur N, Dhillon KS, Beamish RE, Dhalla NS. Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy. *Can J Physiol Pharmacol* 1982; 60:1390-1397.
- 49) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:1620-1624.
- 50) Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986; 59:612-619.
- 51) Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. Central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991; 78:651-655.
- 52) Thomas CE, Morehouse LA, Aust SD. Ferritin and superoxide-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1985; 260:3275-3280.
- 53) Pardini RS. Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants. *Arch Insect Biochem Physiol* 1995; 29:101-118. [Review]
- 54) Losser MR, Payen D. Mechanisms of liver damage. *Semin Liver Dis* 1996; 16:357-367. [Review]

- 55) Kurokawa T, Nonami T, Harada A, Nakao A, Takagi H. Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion injury of the liver. *Semin Surg Oncol* 1996; 12:179-182. [Review]
- 56) Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990; 192:245-261.
- 57) Wanner GA, Ertel W, Müller P, Höfer Y, Leiderer R, Menger MD, Messmer K. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through kupffer cell activation. *Shock* 1996; 5:34-40.
- 58) Jaeschke H, Smith CW, Clemens MG, Ganey PE, Roth RA. Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 139:213-226.
- 59) McCuskey RS, Urbaschek R, Urbaschek B. The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovasc Res* 1996; 752-763.
- 60) Urata K, Nguyen B, Brault A, Lavoie J, Rocheleau B, Huet PM. Decreased survival in rat liver transplantation with extended cold preservation: role of portal vein clamping time. *Hepatology* 1998; 28:366-373.
- 61) Pen XX, Currin RT, Musshafen TL, Thurman RG, Lemasters JJ. Lipopolysaccharide treatment of donor rats causes graft failure after orthotopic rat liver transplantation. In: Wisse E., Knook DL, Wake K, editors. *Cells of the Hepatic Sinusoid*, vol. 5. Leiden, Netherlands: The Kupffer Cell Foundation; 1995; p.234-235.
- 62) van Goor H, Rosman C, Grond J, Kooi K, Wubbels GH, Bleichrodt RP. Translocation of bacteria and endotoxin in organ donors. *Arch Surg* 1994; 129:1063-1066.
- 63) Okuaki Y, Miyazaki H, Zeniya M, Ishikawa T, Ohkawa Y, Tsuno S, Sakaguchi M, Hara M, Takahashi H, Toda G. Splenectomy-reduced hepatic injury induced by ischemia/reperfusion in the rat. *Liver* 1996; 16:188-194.
- 64) Minor T, Isselhard W. Platelet-activating factor antagonism enhances the liver's recovery from warm ischemia in situ. *J Hepatology* 1993; 18:365-368.
- 65) Le Moine O, Louis H, Stordeur P, Collet JM, Goldman M, Deviere J. Role of reactive oxygen intermediates in interleukin 10 release after cold liver ischemia and reperfusion in mice. *Gastroenterology* 1997; 113:1701-1706.
- 66) Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 1996; 271:4138-4142.
- 67) Bradham CA, Stachlewitz RF, Gao W, Qian T, Jayadev S, Jenkins G, Hannun Y, Lemasters JJ, Thurman RG, Brenner DA. Reperfusion after liver transplantation in rats differentially activates the mitogen-activated protein kinases. *Hepatology* 1997; 25:1128-1135.
- 68) Schlossberg H, Zhang Y, Dudus L, Engelhardt JF. Expression of c-fos and c-jun during hepatocellular remodeling following ischemia/reperfusion in mouse liver. *Hepatology* 1996; 23:1546-1555.
- 69) Essani NA, McGuire GM, Manning AM, Jaeschke H. Endotoxin-induced activation of the nuclear transcription factor kappa B and expression of E-selectin messenger RNA in hepatocytes, Kupffer cells, and endothelial cells in vivo. *J Immunol* 1996; 156:2956-2963.

- 70) Essani NA, Fisher MA, Jaeschke H. Inhibition of NF-kappa B activation by dimethyl sulfoxide correlates with suppression of TNF-alpha formation, reduced ICAM-1 gene transcription, and protection against endotoxin-induced liver injury. *Shock* 1997; 7:90-96.
- 71) Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:141-179. [Review]
- 72) Westwick JK, Weitzel C, Leffert HL, Brenner DA. Activation of Jun kinase is an early event in hepatic regeneration. *J Clin Invest* 1995; 95:803-810.
- 73) Taub R. Liver regeneration in health and disease. *Clin Lab Med* 1996; 16:341-360. [Review]
- 74) Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-76. [Review]
- 75) Dallegrì F, Ottonello L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm Res* 1997; 46:382-391. [Review]
- 76) Schmidt HH, Walter U. NO at work. *Cell* 1994; 78:919-925. [Review]
- 77) Test ST, Weiss SJ. The generation and utilization of chlorinated oxidants by human neutrophils. *Adv Free Rad Biol Med* 1986; 2:91-116.
- 78) Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 1990; 4:3355-3359.
- 79) Chosay JG, Essani NA, Dunn CJ, Jaeschke H. Neutrophil margination and extravasation in sinusoids and venules of liver during endotoxin-induced injury. *Am J Physiol* 1997; 272:G1195-1200.
- 80) Hartmut J. Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998; 5:402-408.
- 81) Saugstad OD. Role of xanthine oxidase and its inhibitor in hypoxia: reoxygenation injury. *Pediatrics* 1996; 98:103-107. [Review]
- 82) Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 1969; 244:3855-3863.
- 83) Saugstad OD. Hypoxanthine as an indicator of hypoxia: its role in health and disease through free radical production. *Pediatr Res* 1988; 23:143-150. [Review]
- 84) Adkison D, Hollwarth ME, Benoit JN, Parks DA, McCord JM, Granger DN. Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986; 548:101-107.
- 85) Higuchi M, Aggarwal BB, Yeh ET. Activation of CPP32-like protease in tumor necrosis factor-induced apoptosis is dependent on mitochondrial function. *J Clin Invest* 1997; 99:1751-1758.
- 86) Quillet-Mary A, Jaffrezou JP, Mansat V, Bordier C, Naval J, Laurent G. Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272:21388-21395.
- 87) Jin LJ, Lalonde C, Demling RH. Lung dysfunction after thermal injury in relation to prostanoid and oxygen radical release. *J Appl Physiol* 1986; 61:103-112.
- 88) Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry* 1984; 22:1-15.

- 89) Bacon BR, Tavill AS, Brittenham GM, Park CH, Recknagel RO. Hepatic lipid peroxidation *in vivo* in rats with chronic iron overload. *J Clin Invest* 1983; 71:429-439.
- 90) Atalla SL, Toledo-Pereyra LH, MacKenzie GH, Cederna JP. Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers. *Transplantation* 1985; 40:584-590.
- 91) Flye MW, Yu S. The synergistic effect of superoxide dismutase and adenosine triphosphate-MgCl₂ on acute hepatic ischemia. *Transplant Proc* 1987; 19:1324-1326.
- 92) Weisiger RA. Oxygen radicals and ischemic tissue injury. *Gastroenterology* 1986; 90:494-496.
- 93) Gorecki M, Beck Y, Hartman JR, Fischer M, Weiss L, Tochner Z, Slavin S, Nimrod A. Recombinant human superoxide dismutases: production and potential therapeutical uses. *Free Radic Res Commun* 1991; 12:401-410.
- 94) Turrens JF, Crapo JD, Freeman BA. Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J Clin Invest* 1984; 73:87-95.
- 95) Walther FJ, David-Cu R, Lopez SL. Antioxidant-surfactant liposomes mitigate hyperoxic lung injury in premature rabbits. *Am J Physiol* 1995; 269:L613-617.
- 96) Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Radic Res Commun* 1991; 15:277-284.
- 97) Tanswell AK, Freeman BA. Antioxidant therapy in critical care medicine. *New Horiz* 1995; 3:330-341. [Review]
- 98) Yabe Y, Nishikawa M, Tamada A, Takakura Y, Hashida M. Targeted delivery and improved therapeutic potential of catalase by chemical modification: combination with superoxide dismutase derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289:1176-1184.
- 99) Dhaunsi G, Gulati S, Singk AK, Orak JK, Asayama K, Singh I. Demonstration of Cu-Zn superoxide dismutase in rat liver peroxisomes: Biochemical and immunochemical evidence. *J Biological Chem* 1992, 267:6870-6873.
- 100) Singh AK, Dhaunsi G, Gupta MP, Orak JK, Asayama K, Singh I. Demonstration of glutathione peroxidase in rat liver peroxisomes and its intraorganellar distribution. *Arch Biochem Biophys* 1994, 315:331-338.
- 101) Lauterburg BH, Adams JD, Mitchell JR. Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology* 1984; 4:586-590.
- 102) Aebi S, Assereto R, Lauterburg BH. High-dose intravenous glutathione in man. Pharmacokinetics and effects on cyst(e)ine in plasma and urine. *Eur J Clin Invest* 1991; 21:103-110.
- 103) Winterbourn CC, Metodiewa D. The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch Biochem Biophys* 1994; 314:284-290.
- 104) Liu P, Fisher MA, Farhood A, Smith CW, Jaeschke H. Beneficial effects of extracellular glutathione against endotoxin-induced liver injury during ischemia and reperfusion. *Circ Shock* 1994; 43:64-70.
- 105) Bilzer M, Lauterburg BH. Glutathione metabolism in activated human neutrophils: stimulation of glutathione synthesis and consumption of glutathione by reactive oxygen species. *Eur J Clin Invest* 1991; 21:316-322.

- 106) Stein HJ, Oosthuizen MM, Hinder RA, Lamprechts H. Oxygen free radicals and glutathione in hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 1991; 50:398-402.
- 107) Ross D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Mechanisms of free-radical induced toxicity and glutathione-dependent protection. *Pharmacol Ther* 1988; 37:231-249. [Review]
- 108) Caraceni P, Yao T, Degli Esposti S, Gasbarrini A, Bowie BT, Zern M, Borle AB, Van Thiel DH. Effect of vitamin E on reoxygenation injury experienced by isolated rat hepatocytes. *Life Sci* 1994; 55:1427-1432.
- 109) Marubayashi S, Dohi K, Sugino K, Kawasaki T. The protective effects of administered alpha-tocopherol against hepatic damage caused by ischemia-reperfusion or endotoxemia. *Ann N Y Acad Sci* 1989; 570:208-218.
- 110) Marubayashi S, Dohi K, Ochi K, Kawasaki T. Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: prevention of damage by alpha-tocopherol administration. *Surgery* 1986; 99:184-192.
- 111) Marubayashi S, Dohi K, Kawasaki T. Role of free radicals in hepatic reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 723:368-370.
- 112) Padh H. Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol* 1990; 68:1166-1173. [Review]
- 113) Biesalski HK, Frank J. Antioxidants in nutrition and their importance in the anti-oxidative balance in the immune system. *Immun Infect* 1995; 23:166-173. [Review]
- 114) Akkuş İ. Klinik biyokimya laboratuvarı el kitabı. Akkuş İ (Ed). Öz Eğitim Bas Yay Dağ 1997, Konya:314-315.
- 115) Sun Y, Oberley LW, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34:497-500.
- 116) Durak I, Yurtarslan Z, Canbolat O, Akyol O. A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chim Acta* 1993; 214:103-104.
- 117) Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab & Clin Med* 1967; 70:158-169.
- 118) Prajda N, Weber G. Malign transformation linked imbalance decreased XO activity in hepatomas. *FEBS Lett* 1975; 59:245-249.
- 119) Wei H, Frenkel K. In vivo formation of oxidized DNA bases in tumor promoter-treated mouse skin. *Cancer Res* 1991; 51:4443-4449.
- 120) Wasowicz W, Neve S, Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: Importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* 1993; 39:2522-2526.
- 121) Mueller AR, Platz KP, Langrehr JM, Hoffman RA, Nussler AK, Nalesnik M, Billiar TR, Schraut WH. The effects of administration of nitric oxide inhibitors during small bowel preservation and reperfusion. *Transplantation* 1994; 58:1309-1316.
- 122) Malinski T, Taha Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* 1992; 358:676-678.

- 123) Cortas NK and Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36:1440-1443.
- 124) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
- 125) Sandritter WA, Reid UN. Morphology of liver cell necrosis. In: Keppler D. (Ed.) *Pathogenesis and Mechanisms of Liver Cell Necrosis*. Lancaster: MTP Press. 1975:1-14.
- 126) Fitzpatrick DB, Karmazyn M. Comparative effects of calcium channel blocking agents and varying extracellular calcium concentration on hypoxia/reoxygenation and ischemia/reperfusion-induced cardiac injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 228:761-768.
- 127) Zhong Z, Jones S, Thurman RG. Glycine minimizes reperfusion injury in a low-flow, reflow liver perfusion model in the rat. *Am J Physiol* 1996; 270:G332-338.
- 128) Bolling SF, Schirmer WJ, Gott VL, Flaherty JT, Bulkley BH, Gardner TJ. Enhanced myocardial protection with verapamil prior to postischemic reflow. *Surgery* 1983; 94:283-290.
- 129) Elimadi A, Settaf A, Morin D, Sapena R, Lamchouri F, Cherrah Y, Tillement JP. Trimetazidine counteracts the hepatic injury associated with ischemia-reperfusion by preserving mitochondrial function. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286:23-28.
- 130) Mizutani A, Okajima K, Jchiba M, Noguchi T. Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation. *Blood* 2000; 95:3781-3787.
- 131) Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, Crenesse D, Rostagno P, Maulon L, Saint-Paul MC, Ferrua B, Mouiel J, Auberger P. Caspase inhibition protects from liver injury following ischemia and reperfusion in rats. *Transpl Int* 2000; 13:S568-572.
- 132) Marubayashi S, Dohi K, Ochi K, Kawasaki T. Protective effects of free radical scavenger and antioxidant administration on ischemic liver cell injury. *Transplant Proc* 1987; 19:1327-1328.
- 133) Narayanaswami V, Sies H. Antioxidant activity of ebselen and related selenoorganic compounds in microsomal lipid peroxidation. *Free Radic Res Commun* 1990; 10:237-244.
- 134) Ozaki M, Nakamura M, Satoshi T, Ota K. Ebselen, a novel anti-oxidant compound, protects the rat liver from ischemia-reperfusion injury. *Transpl Int* 1997; 10:96-102.
- 135) Barkley LRC, Locke SJ, MacNeil JM. Autooxidation in micelles: synergism of vitamin C with lipid-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochem Biophys Acta* 1985; 835:366-374.
- 136) Castle L, Perkins MJ. Inhibition kinetics of chain-breaking phenolic antioxidants in SDS micelles: evidence that intermicellar diffusion rates may be rate-limiting for hydrophobic inhibitors such as alpha-tocopherol. *J Am Chem Soc* 1986; 108:6381-6382.
- 137) Wu TW, Hashimoto N, Au JX, Wu J, Mickle DA, Carey D. Trolox protects rat hepatocytes against oxyradical damage and the ischemic rat liver from reperfusion injury. *Hepatology* 1991; 13:575-580.
- 138) Lee SM, Clemens MG. Effect of alfa-Tocopherol on hepatic mixed function oxidases in hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology* 1992; 15:276-281.

- 139) Mickle DA, Weisel RD. Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. *Can J Cardiol* 1993; 9:89-93.
- 140) Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett* 1993; 329:21-24.
- 141) Pascual C, Gonzalez R, Torricella RG. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* 1994; 41:9-13.
- 142) Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SA, Dandiya PC. Antibacterial, antifungal, antiameboic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol* 1991; 35:77-82.
- 143) Ilhan A, Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Ciralik H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Eur J Cardio Thorac Surg* 1999; 16:458-463.
- 144) Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Aydinc M, Karaman A, Gultek A, Akyol O, Gursoy MH, Aydin E. Caffeic acid phenethyl ester prevents intestinal reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 1999; 34:1458-1462.
- 145) Loeper J, Goy J, Rozensztajn L, Bedu O, Moisson P. Lipid peroxidation and protective enzymes during myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 1991; 196:119-125.
- 146) Slavikova H, Lojek A, Hamar J, Duskova M, Kubala L, Vondracek J, Ciz M. Total antioxidant capacity of serum increased in early but not late period after intestinal ischemia in rats. *Free Radic Biol Med* 1998; 25:9-18.
- 147) Jaiswal AK, Venugopal R, Mucha J, Carothers AM, Grunberger D. Caffeic acid phenethyl ester stimulates human antioxidant response element-mediated expression of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene. *Cancer Res* 1997; 57:440-446.
- 148) Koltuksuz U, Irmak MK, Karaman A, Uz E, Var A, Ozyurt H, Akyol O. Testicular nitric oxide levels after unilateral testicular torsion/detorsion in rats pretreated with caffeic acid phenethyl ester. *Urol Res* 2000; 28:360-363.
- 149) Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, Quyyumi AA, Panza JA. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension* 1997; 30:57-63.
- 150) van der Hoeven JA, Lindell S, van Suylichem PT, Vos T, Groothuis GG, Moshage H, Ploeg RJ. Extended preservation and effect of nitric oxide production in liver transplantation. *Transpl Int* 1998; 11:S171-173.
- 151) Liu P, Yin K, Nagele R, Wong PY. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates peroxynitrite generation, but augments neutrophil accumulation in hepatic ischemia-reperfusion in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284:1139-1146.
- 152) Koken T, Inal M. The effect of nitric oxide on ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Clin Chim Acta* 1999; 288:55-62.
- 153) Shiraishi M, Hiroyasu S, Nagahama M, Miyaguni T, Higa T, Tomori H, Okuhama Y, Kusano T, Muto Y. Role of exogenous L-arginine in hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 1997; 69:429-434.
- 154) Jones SM, Thurman RG. L-arginine minimizes reperfusion injury in a low-flow, reflow model of liver perfusion. *Hepatology* 1996; 24:163-168.

- 155) Langle F, Roth E, Steininger R, Winkler S, Muhlbacher F. Arginase release following liver reperfusion. Evidence of hemodynamic action of arginase infusions. *Transplantation* 1995; 59:1542-1549.
- 156) Cottart CH, Do L, Blanc MC, Vaubourdolle M, Descamps G, Durand D, Galen FX, Clot JP. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999; 29:809-813.
- 157) Shimamura T, Zhu Y, Zhang S, Jin MB, Ishizaki N, Urakami A, Totsuka E, Kishida A, Lee R, Subbotin V, Furukawa H, Starzl TE, Todo S. Protective role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Am Coll Surg* 1999; 188:43-52.
- 158) Jaeschke H, Schini VB, Farhood A. Role of nitric oxide in the oxidant stress during ischemia/reperfusion injury of the liver. *Life Sci* 1992; 50:1797-1804.
- 159) Kamiike W, Burdelski M, Steinhoff G, Ringe B, Lauchart W, Pichlmayr R. Adenine nucleotide metabolism and its relation to organ viability in human liver transplantation. *Transplantation* 1988; 45:138-143.
- 160) Lanir A, Jenkins RL, Caldwell C, Lee RG, Khettry U, Clouse ME. Hepatic transplantation survival: correlation with adenine nucleotide level in donor liver. *Hepatology* 1988; 8:471-475.
- 161) Harvey PR, Iu S, McKeown CM, Petrunka CN, Ilson RG, Strasberg SM. Adenine nucleotide tissue concentrations and liver allograft viability after cold preservation and warm ischemia. *Transplantation* 1988; 45:1016-1020.
- 162) Nishida T, Koseki M, Kamiike W, Nakahara M, Nakao K, Kawashima Y, Hashimoto T, Tagawa K. Levels of purine compounds in a perfusate as a biochemical marker of ischemic injury of cold-preserved liver. *Transplantation* 1987; 44:16-21.
- 163) Pesonen EJ, Linder N, Raivio KO, Sarnesto A, Lapatto R, Hockerstedt K, Makisalo H, Andersson S. Circulating xanthine oxidase and neutrophil activation during human liver transplantation. *Gastroenterology* 1998; 114:1009-1015.
- 164) Yokoyama Y, Beckman JS, Beckman TK, Wheat JK, Cash TG, Freeman BA, Parks DA. Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am J Physiol* 1990; 258:G564-570.
- 165) Matsumura F, Yamaguchi Y, Goto M, Ichiguchi O, Akizuki E, Matsuda T, Okabe K, Liang J, Ohshiro H, Iwamoto T, Yamada S, Mori K, Ogawa M. Xanthine oxidase inhibition attenuates kupffer cell production of neutrophil chemoattractant following ischemia-reperfusion in rat liver. *Hepatology* 1998; 28:1578-1587.
- 166) Salaris SC, Babbs CF, Voorhees WD. Methylene blue as an inhibitor of superoxide generation by xanthine oxidase. A potential new drug for the attenuation of ischemia/reperfusion injury. *Biochem Pharmacol* 1991; 42:499-506.
- 167) Zhong Z, Lemasters JJ, Thurman RG. Role of purines and xanthine oxidase in reperfusion injury in perfused rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 250:470-475.
- 168) Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78:6858-6862.
- 169) Fantone JC, Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 1982; 107:395-418.

- 170) Flaherty JT, Weisfeldt ML. Reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 1988; 5:409-419. [Review]
- 171) Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* 1990; 85:1936-1943.
- 172) Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM. Chemokine expression during hepatic ischemia/reperfusion-induced lung injury in the rat. The role of epithelial neutrophil activating protein. *J Clin Invest* 1995; 95:134-141.
- 173) Ghezzi P, Dinarello CA, Bianchi M, Rosandich ME, Repine JE, White CW. Hypoxia increases production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human mononuclear cells. *Cytokine* 1991; 3:189-194.
- 174) Suzuki S, Toledo-Pereyra LH. Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res* 1994; 57:253-258.
- 175) Zhou W, McCollum MO, Levine BA, Olson MS. Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology* 1992; 16:1236-1240.
- 176) Scoazec JY, Durand F, Degott C, Delautier D, Bernuau J, Belghiti J, Benhamou JP, Feldmann G. Expression of cytokine-dependent adhesion molecules in postreperfusion biopsy specimens of liver allografts. *Gastroenterology* 1994; 107:1094-1102.
- 177) Koo A, Komatsu H, Tao G, Inoue M, Guth PH, Kaplowitz N. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology* 1992; 15:507-514.
- 178) Mathews WR, Guido DM, Fisher MA, Jaeschke H. Lipid peroxidation as molecular mechanism of liver cell injury during reperfusion after ischemia. *Free Radic Biol Med* 1994; 16:763-770.
- 179) Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991; 260:G355-362.
- 180) Kobayashi S, Clemens MG. Kupffer cell exacerbation of hepatocyte hypoxia/reoxygenation injury. *Circ Shock* 1992; 37:245-252.
- 181) Mochida S, Arai M, Ohno A, Masaki N, Ogata I, Fujiwara K. Oxidative stress in hepatocytes and stimulatory state of Kupffer cells after reperfusion differ between warm and cold ischemia in rats. *Liver* 1994; 14:234-240.
- 182) Komatsu H, Koo A, Ghadishah E, Zeng H, Kuhlenkamp JF, Inoue M, Guth PH, Kaplowitz N. Neutrophil accumulation in ischemic reperfused rat liver: evidence for a role for superoxide free radicals. *Am J Physiol* 1992; 262:G669-676.