



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ

İSKEMİK ÖNKOŞULLANMA MODELİNDE POLİDATİN'İN
KARACİĞER PRESERVASYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Erhan KIZILKAYA
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Erol KILIÇ

HATAY - 2017

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ

İSKEMİK ÖNKOŞULLANMA MODELİNDE POLİDATİN'İN
KARACİĞER PRESERVASYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Erhan KIZILKAYA
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Erol KILIÇ

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü (BAP)
tarafından 16709 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ ONAY SAYFASI
T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**Tez Adı : İSKEMİK ÖNKOŞULLANMA MODELİNDE
POLİDATİN'İN KARACİĞER PRESERVASYONU ÜZERİNE
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tezi Hazırlayanın Adı: Dr. Erhan KIZILKAYA

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

(İmza).....
Prof.Dr.....
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

(İmza).....
.....Dr.....
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

(İmza).....
.....Dr.....
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1.(İsim ve imza).....
2.(İsim ve imza).....
3.(İsim ve imza).....

İÇİNDEKİLER

TABLolar.....	III
RESİMLER VE ŞEKİLLER.....	IV
KISALTMA	V
TEŞEKKÜR.....	VII
ÖZET.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İskemi Reperfüzyon Hasarının ve Uzak İskemik Önkoşullanmanın Fizyopatolojisi.....	3
2.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri.....	4
2.1.2. Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL).....	6
2.1.3. Komplemanın Rolü.....	7
2.1.4. Endotelin Rolü.....	8
2.2. Antioksidanlar.....	8
2.2.1 Endojen Antioksidanlar.....	10
2.2.1.1. Enzim Olan Endojen Antioksidanlar.....	10
2.2.1.2. Enzim Olmayan Endojen Antioksidanlar.....	11
2.2.2. Eksojen Antioksidanlar.....	11
2.3. Karaciğer.....	14
2.3.1 Karaciğer Anatomisi.....	14
2.3.2.Karaciğerin Vasküler Anatomisi.....	15
2.3.3.Karaciğer Histolojisi.....	16
3. MATERYAL VE METOD.....	17
3.1. Hayvanlar ve Deney Protokolü.....	17
3.2.Biyokimyasal Değerlendirme.....	21
3.2.1. Karaciğer Dokusunun Homojenizasyonu.....	21
3.2.1.1. SOD tayini.....	22
3.2.1.2. KAT tayini.....	22
3.2.1.3.GSH-Px tayini.....	22

3.2.2.Plazmada Parametreler	23
3.3.Patolojik Değerlendirme.....	23
3.4.İstatistiksel Değerlendirme.....	24
4.BULGULAR.....	25
4.1. Biokimyasal Bulgular	25
4.1.1. Katalaz Değerleri.....	25
4.1.2. SOD Değerleri.....	26
4.1.3. GSH-Px Değerleri.....	27
4.1.4. HIF 1 alfa Değerleri.....	28
4.1.5. TAS Değerleri.....	29
4.1.6. TOS Değerleri.....	30
4.1.7. AST Değerleri.....	31
4.1.8. ALT Değerleri.....	32
4.1.9. LDH Değerleri.....	33
4.1.10. ALP Değerleri.....	34
4.1.11. Total Protein Değerleri.....	35
4.1.12. Albumin Değerleri.....	36
4.2.Histopatolojik Bulgular.....	37
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇ.....	47
7. KAYNAKLAR.....	48
8.ÖZGEÇMİŞ.....	54

TABLolar

Tablo 1: Ana antioksidanların sınıflandırılması.....	9
Tablo 2: Karaciğer dokusunda hasar skorlanması.....	24
Tablo 3: Katalazın Gruplar arası değerlendirilmesi.....	25
Tablo4: SOD 'un Gruplar arası değerlendirilmesi.....	26
Tablo5: GSH-Px 'in Gruplar arası değerlendirilmesi.....	27
Tablo6: HIF 1 alfanın Gruplar arası değerlendirilmesi.....	28
Tablo7: TAS 'ın Gruplar arası değerlendirilmesi.....	29
Tablo 8: TOS 'un Gruplar arası değerlendirilmesi.....	30
Tablo 9: AST 'in Gruplar arası değerlendirilmesi.....	31
Tablo 10: ALT 'in Gruplar arası değerlendirilmesi.....	32
Tablo 11: LDH 'in Gruplar arası değerlendirilmesi.....	33
Tablo 12: ALP 'in Gruplar arası değerlendirilmesi.....	34
Tablo 13: Total Proteinin Gruplar arası değerlendirilmesi.....	35
Tablo 14: Albuminin Gruplar arası değerlendirilmesi.....	36
Tablo 15: Gruplara göre patolojik değerlendirme kriterlerin Ortalama aralığı.....	37
Tablo 16: Patoloji kriterlerin Gruplar arası Kruskal Warris Testi.....	38

RESİMLER VE ŞEKİLLER

Resim 1: Polidatin'in kimyasal yapısı.....	11
Resim 2 : Polidatin'in Ticari formu.....	12
Resim 3: Karaciğerin segmenter anatomisi.....	15
Resim 4 : Alt Ekstremitede İskemi Oluşturulması.....	19
Resim 5: Povidon İyod ile Cilt Antiseptiğın Sağlanması.....	19
Resim 6 : Laparatomı.....	20
Resim 7: Biyokimya Parametreleri için Kan Örneği Alınması.....	20
Resim 8: Karaciğer Doku Örneği Alınması.....	21

KISALTMALAR

ALT	: Alaninaminotransaminaz
AST	: Aspartataminotransferaz
KAT	: Katalaz
DTNB	: Dinitrobenzoik Asit
ET	: Endotelin
GP	: Glikoprotein
GSH	: Glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon Peroksidaz
GST	: Glutatyon S Transferaz
HCL	: Hidroklorür
HE	: Hemotoksilen Eozin
IL	: Interlökin
İR	: İskemi Reperfüzyon
KC	: Karaciğer
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)
NBT	: Nitro Blue Tetrazolium
NO	: Nitrik Oksit
OD	: Optik Dansite
PMNL	: Polimorf Nüveli Lökosit
SA	: Spesifik Aktivite
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOR	: Serbest Oksijen Radikali / Radikalleri
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
PD	: Polidatin
İE	: İskemik Önkoşullanma Erken
İEP	: İskemik Önkoşullanma Erken + Polidatin
İG	: İskemik Önkoşullanma Geç
İGP	: İskemik Önkoşullanma Geç + Polidatin

EİO	: Erken İskemik Önkoşullanma
GİO	: Geç İskemik Önkoşullanma
ROS	: Reaktif Oksijen Substratları (türevleri)
MDA	: Malonildialdehit
GSSG	: Glutasyonun Okside Formu
GR	: Glutasyon Redüktaz
CCl₄	: Karbon Tetraklorür
MAPK	: Mitojen Aktive Protein Kinaz
PTK	: Protein Tirozin Kinaz
PKC	: Protein Kinaz C
PMNs	: Polimorf Nüveli Lökositler
TAS	: Total Antioksidan Seviye
TOS	: Total Oksidan Seviye
HIF	: Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör
ABTS	: 2,2-Azinobis-3- etilbenotşazolin-6-sulfamik asit
TOC	: Total Organik Karbon
PerOX	: Peroksidaz
T-SOD	: Toplam Süperoksit Dismutaz

TEŞEKKÜR

Genel Cerrahi eğitimim süresince ilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, beni daima daha iyi bir cerrah olmaya teşvik eden ve cerrahi sanatının prensiplerini öğrenmemde bana destek olup, yetişmemde, cerrahi nosyonumun gelişmesinde emeği geçen Prof.Dr. Muhyittin TEMİZ, Doç.Dr. İbrahim YETİM ve Yrd. Doç.Dr. Mustafa UğUR ve bu tez çalışmasının her aşamasında desteğini esirgemeyen danışman Yrd. Doç.Dr. Erol KILIÇ'a teşekkür ederim.

Genel Cerrahi kliniğinde birlikte çalıştığım doktor arkadaşlarımdan Dr.İlhan PALTACI, Dr. Aydın KAPLAN, Dr. Uğraş DABAN, Dr.Cebrail YETKİN, Dr. Hüseyin ÇIĞIN, Dr. Ozan Utku ÖZTÜRK, Dr. Akın DEDEMOğLU ve beraber çalışmaktan mutlu olduğum bütün servis, yoğun bakım ve ameliyathane hemşire ve personel arkadaşlara teşekkür ederim.

Sabır ve fedakârlıkla desteğini her zaman yanımda hissettiğim ailem ve eşim Zişan KIZILKAYA'ya sonsuz teşekkürler.

Dr.Erhan KIZILKAYA

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada alt ekstremitede oluşturulan iskemi-reperfüzyon ile oluşturulan erken ve geç iskemik önkoşullanma modelinde, antioksidan ve antiinflamatuvar özelliği olan polidatin kullanımının karaciğer preservasyonuna katkısının olup olmayacağını, olursa nasıl bir etki sağlayacağını araştırılması planlandı.

Yöntem: Bu amaçla Wistar Albino türü ratlar rastgele beş gruba ayrıldı. Üç gün intraperitoneal polidatin verilen iki grup ile polidatin verilmeyen diğer iki gruptaki deney hayvanlarında, alt ekstremitte proksimalinde yapılan iskemi ve reperfüzyon sonrası erken ve geç iskemik önkoşullanma oluşturularak karaciğer dokusunda serbest oksijen radikalleri ve inflamatuvar lenfositik sitokinlerin hasar değerlendirmesi yapıldı. Birinci grup kontrol grubu olarak seçildi, intraperitoneal serum fizyolojik enjeksiyonu dışında herhangi bir uygulama yapılmadı. Deney sonunda kan ve doku örnekleri alındıktan sonra hayvanlar dekapite edildi.

Bulgular: Karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmesi, aspartataminotransaminaz (AST), alaninaminotransaminaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH), albümin, total protein seviyeleri ölçüldü. Oksidatif stresi belirlemek için TAS, TOS ve HIF 1 alfa plazmada ölçüldü. Karaciğer doku örneklerinde katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve GSH-Px ölçüldü. Alınan karaciğer doku örnekleri Hemotoksilen Eosin ile boyanmış halde ışık mikroskopunda incelendi.

Sonuç: Bu çalışmanın sonucuna dayanarak, Polidatin'in antioksidatif ve antiinflamatuvar özelliğinden dolayı iskemik önkoşullanma modelinde karaciğer preservasyonuna pozitif etki sağladığı düşünüldü.

Anahtar kelimeler: Karaciğer, iskemik önkoşullanma, polidatin, antioksidan.

ABSTRACT

Aim: In this study, it was planned to investigate whether or not there will be an additional contribution to liver preservation as a result of combined use of antioxidant and antiinflammatory polydatin in the early and late ischemic preconditioning model created by ischemia-reperfusion in the lower extremity.

Methods: For this purpose, Wistar Albino type rats were randomly divided into five groups. Two groups receiving intraperitoneal polydatin for three days and the other two groups without polydatin were evaluated for damage to free oxygen radicals and inflammatory cytokines in liver tissue as distant organ in the early and late ischemic preconditioning model after ischemia and reperfusion in the proximal lower extremity. The first group was selected as the control group and no application except intraperitoneal saline injection was made. At the end of the experiment, the animals were decapitated and blood and tissue samples were taken.

Results: Aspartataminotransaminase (AST), alaninaminotransaminase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH), albumin, total protein levels were measured to evaluate liver functions. TAS, TOS and HIF 1 alpha were measured in plasma to determine oxidative stress. Catalase, superoxide dismutase (SOD) and GSH-Px were measured in liver tissue samples. Liver tissue specimens were stained with hematoxylin eosin and then histopathologically examined under light microscope.

Conclusion: Based on the results of this study, it is thought that Polydatin has positive effect on liver preservation as a remote organ in the ischemic preconditioning model due to antioxidative and antiinflammatory properties of polydatin.

Keywords: Liver, ischemic preconditioning, polydatin, antioxidants

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi –reperfüzyon hasarı, meydana geldiği veya oluşan radikallerin dolaşım ile ulaştığı hücre ve organda hasar oluşturması ile sonlanan olaylar serisidir. İskemi, dokunun oksijen ihtiyacının karşılanamaması ve ortaya çıkan artık ürünlerin etkisiz hale getirilememesi olarak tanımlanabilir. Reperfüzyon, iskemik dokudaki kan akımının yeniden oluşturulmasıdır. İskemik ön koşullanma; tek veya yineleyen kısa süreli iskemi-reperfüzyon periyodlarının, takip eden dönemlerdeki uzun süreli iskemi durumları sonucunda gelişen doku veya organ hasarına karşı koruyucu etki oluşturmasıdır [1]. Uzak organ iskemik önkoşullanma ise bir doku veya organdaki uzamış iskemi-reperfüzyon hasarını azaltmak için vücutta bulunan başka bir doku veya organda kısa süreli iskemi-reperfüzyon yaratarak, hedef organ veya dokuda koruyucu bir etki oluşturma mekanizmasıdır [2]. Erken ve geç iskemik önkoşullanma olarak iki aşamada gerçekleşmektedir. Erken iskemik önkoşullanma (EİÖ), iskemi-reperfüzyon periyodları sonrası dakikalar içinde başlayıp, birkaç saat sonra ortadan kalkmaktadır. EİÖ'nün koruyucu etkisi, adenozin ve bradikinin gibi mediatörler ile tetiklenen ve kompleks ikinci ileti sistemlerinin aktivasyonu ile ortaya çıkmaktadır. [3]. Geç iskemik önkoşullanma (GİÖ), iskemi-reperfüzyon periyodlarından 24 saat sonra başlayıp, 48-72 saat sürmektedir. GİÖ'nün etkisi koruyucu protein indüksiyonu ile ortaya çıkmaktadır. [3]. Şiddetli iskemik durumlarda serbest radikallerin oluşturduğu hücrel hasarı engellemek için iskemik önkoşullanmanın yanısıra birçok endojen ve eksojen antioksidan çalışmaları yapılmıştır.

Uzak İskemik önkoşullanma oluşturulması, karaciğer transplantasyonu veya majör karaciğer rezeksiyonu sonrası iskemi reperfüzyon hasarını önleyerek morbidite ve mortaliteyi azaltan en önemli faktörlerdendir [4]. Hipotermi uygulaması, farklı farmakolojik ajanların kullanımı, genetik modülasyon uygulamalarının yanı sıra erken iskemik önkoşullanma ve geç iskemik önkoşullama bu alanda umut veren uygulamalardır. İskemik önkoşullama, sağlıklı karaciğer dokusuna sahip hastalarda

devamlı klemplemeyle karşılaştırıldığında daha iyi tolere edilir. Daha az kan transfüzyonu ihtiyacını ve postoperatif komplikasyonların azalmasını sağlar [5].

Polidatin'in (PD) bilinen birçok biyolojik fonksiyonu vardır, PD antioksidatif ve antiinflamatuvar etkileri vardır. Özellikle oksidatif stres ilişkili inflamatuvar cevabı baskılamasının yanında, iskemi-reperfüzyon hasarının azaltılmasında antioksidatif özelliği ile önemli anahtar regülatörlerdendir [6]. Bu çalışmada alt ekstremitte proksimalinde oluşturulan tekrarlı iskemi-reperfüzyon uygulaması ile erken - geç iskemik önkoşullanma modellerinde, polidatin kullanımı ile organ preservasyonunda etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi Reperfüzyon Hasarının ve Uzak İskemik Önkoşullanmanın Fiziopatolojisi

İskemi; organı veya dokunun oksijenizasyon yetersizliğine bağlı olarak gelişen, reversibl/irreversibl hücre/doku hasarına yol açar. Doku veya organdaki iskemi esnasında, hücrelerde pek çok metabolik ve yapısal değişiklikler oluşmaktadır. Hücrenin oksidatif fosforilasyonu bozulması sonucu hücre içi adenosin trifosfat (ATP) ve fosfokreatin sentezinde azalma, enerji depoları boşalır ve Na^+ - K^+ ATPaz pompası inhibe olarak hücre içinde Na^+ ve Ca^{++} iyonları birikir [7]. İskemi durumunda adenin nükleotidinin yıkımı da artmakta, reaktif oksijen türevlerinin (ROS) prekürsörü olan hipoksantin hücre içinde birikir. Reperfüzyon ile moleküler oksijenin yeniden sunulması ile birlikte ROS türevleri hızla ortaya çıkmaktadır [7].

Hipoksi ile hücre düzeyinde Hipoksik İskemik Faktörler (HIF) oluşmaktadır. HIF, hipoksi ile regüle olan elementler olarak adlandırılan, kanonik DNA segmentlerine bağlanan transkripsiyon faktörleridir. Bu faktörler, hücre metabolizmasını, anjiyogenezi, vasküler tonusu, eritropoezi ve diğer fonksiyonları regüle eden proteinleri kodlayan birçok genin ekspresyonunu aktive ederler [8, 9]. HIF, hipoksi ile tetiklenen HIF α (HIF1 α ya da 2 α) alt ünitesinden ve temel eleman olan HIF1 β 'dan oluşan heterodimerik, bir DNA bağlayıcı komplekstir. HIF yolu oksijene bağımlı postranslasyonel HIF α hidroksilasyonu ile regüle edilir ve bunun sonucunda normoksi sırasında hızlı şekilde inaktivasyon ve degradasyon olur. HIF α alt üniteleri prolin hidroksilaz bölgesi enzimleri ve aspargil hidroksilazı (faktör inhibe edici HIF, FIF) içeren oksijene bağımlı enzimler ailesinin substratlarıdır. Bu enzimler oksijen algılayıcılar olarak işlem görürler ve normoksik koşullarda HIF α 'nın özel bölgelerden hidroksilasyonunu katalize ederler [8, 10]. Normoksi sırasında, prolin hidroksilaz bölgesi enzimleri HIF1 α 'nın 2 korunmuş prolin

kalıntısını hidroksile ederler [10]. Bu protein HIF α 'nın proteazom tarafından degradasyonuna yardımcı olur. Hipoksik koşullarda, HIF α proteazomal yıkımdan kaçır, sitozolde birikir ve nükleusa geçerek HIF β ile heteromerik bir kompleks oluşturur. Ouşan kompleks hedef genlerin promoter ya da artırıcı sekanslarına bağlanır. Hipoksiye ek olarak, TNF- α ve interlökün 1 β gibi proinflatuar sitokinler de HIF ekspresyonunu tetikleyebilir [11].

İskemik Önkoşullanma; hücre veya dokuların tekrarlı bir şekilde iskemi ve reperfüzyona kısa süreli maruz kalması ile şiddetli iskemi durumlarında doku hasarında belirgin olarak azalma sağlanmasıdır. İskemik önkoşullamanın etkinliğini ilk kez 1986 yılında Murry ve arkadaşları köpek miyokardında göstermiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarla, uygulamanın beyin, spinal kord, iskelet kası ve karaciğer gibi organlarda da uygulanabileceği bildirilmektedir. Farmakolojik önkoşullama, iskemi sonrasında gelişebilecek doku, organ veya hücre hasarına karşı, organ yada dokunun farmakolojik bir ajanla yapılan uygulamalar olarak tanımlanır [12,13]. Uzak İskemik Önkoşullanma; bir doku veya organda meydana gelen tekrarlı bir şekilde iskemi reperfüzyon (I/R) sonrası dolaşıma geçen proenflatuar ajan ve serbest oksijen radikallerinin kalp, böbrek, akciğer ve karaciğer gibi organlarda oluşturduğu stres sonrası, bu organlarda daha sonra oluşacak uzun süreli iskemi-reperfüzyon koşullarına adapte olma durumudur [14]. Postiskemik uzak organ hasarı, Serbest Oksijen Radikalleri, Polimorf Nüveli Lökositler, Kompleman Sistemi, Endotel Hücrelerinin etkileşimleri sonucunda gelişmektedir.

2.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest radikal; eşlenmemiş elektron içeren atom/moleküldür, reaktiftir [15]. Sürekli olarak serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı belirli oranda oluşur ve hücre içi mekanizmalarla zararlı etkileri önlenir. Mitokondriyal oksijen düzeylerinin azalmasıyla birlikte, hücrelerde aerobik metabolizması yavaşlar, enerji depoları homeostatik fonksiyonları devam ettirebilmek amacıyla tüketilir. Yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin (ATP) yıkımı, hipoksantin birikmesine neden olur. Oksijenizasyon olmadığı sürece biriken hipoksantin ksantine dönüştürülemez. Hücre, enerji üretimi için anaerobik glikolize geçmesi sonucunda glukoz ve pirüvat azalırken, hücre içi laktik asit üretimi artar. Beraberinde, iskemi

sürecinde mikrovasküler endotelyumun ksantin dehidrogenaz enzimi ksantin oksidaz enzimine dönüştürülür. Reperfüzyonda, ksantin oksidaz enzimi, biriken hipoksantini ksantine dönüştürmesinin yanında çok miktarda serbest oksijen radikalının ortama çıkmasına sebep olur [16]. Oksijen, süperoksite (O_2^-), ardından da hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikaline (OH^\cdot) dönüşür [16].

e^-

$O_2 \rightarrow O_2^-$ (süperoksit radikali oluşumu)

SOD

$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O$ (Hidrojen Peroksit)

$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\cdot$ (Fenton reaksiyonu)

$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH + OH^\cdot + Fe^{3+}$ (Haber-Weiss reaksiyonu)

Oluşan bu serbest radikaller oldukça reaktiftirler ve hücrenin DNA, protein ve lipit yapılarını bozarlar. Hücrenin membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitleri oksidatif hasardan en fazla etkilenen yapılardır. Reperfüzyon sonrası süperoksit radikali (O_2^-), hidroksil radikaline (OH^\cdot) dönüşerek membran lipit peroksidasyonunu başlatabileceği gibi, endotel kaynaklı nitrik oksit (NO) ile etkileşerek "peroksinitrit" oluşturarak da lipit peroksidasyonunu başlatabilir. Lipit peroksidasyonu başladıktan sonra kendi kendini devam ettiren zincirleme bir dizi reaksiyon şeklinde ilerler. Bu reaksiyonun sonucunda biyolojik olarak aktif malondialdehit (MDA) açığa çıkar ve hücre membranında parçalanma gerçekleşir.

Serbest radikallerin hücresel hasarı, lipit peroksidasyonu, protein modifikasyonu ve DNA hasarı mekanizmaları ile ortaya çıkar.

- **Lipit peroksidasyonu:** Çok zincirli doymamış yağ asitlerinden köken alan hidroperoksitler, hücresel düzeyde toksik etkinin en önemli kısmını oluşturur. Fosfolipitlerin zarlarındaki doymamış yağ asidi zincirlerinin parçalanması, hücre zarında bozulmalara neden olur. Bu olay genellikle eritrosit, lizozom ve endoplazmik retikulum zarlarında oluşmaktadır [17].
- **Protein oksidatif modifikasyonu:** Serbest oksijen radikalleri, aminoasit yan zincirlerinde oksidasyon yaratarak, protein-protein bağlarını oluşturur.

Proteinlerdeki ana zincirleri okside ederek proteinleri parçalar. Hücresel düzeyde fonksiyon gösteren enzimlerin yapısında bozulmalar oluşturur [17].

- **DNA hasarı:** Timin bazı ile etkileşerek tek zincir kırılmalarına neden olur. Hücrede enerji kaybı olur ve nekroz şeklinde ölüm gerçekleşir [18].

2.1.2. Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL)

İskemi reperfüzyon ile lökosit aktivasyonu sonucu yüksek miktarda SOR üretirler. İskemi reperfüzyon hasarında PMNL'in rolü şu mekanizmalar ile olduğu gösterilmiştir [19]. Bunlar:

- 1) Mikrovasküler oklüzyon,
- 2) SOR salınması,
- 3) Sitotoksik enzim salınması,
- 4) Vasküler permeabilite artışı,
- 5) Sitokin salınmasında artıştır.

PMNL'lerin aktivasyon ve migrasyonları endotel ve lökositlerde bulunan selektinler aracılığıyla olur. L, P ve E selektin olmak üzere bilinen üç üyesi vardır. İ/R, endoteldeki P-selektin ekspresyonunu artırır ve PMNL'lerde bulunan P-selektin glikoprotein 1 (PSGL-1) adlı reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteli lökosit endotel bağlantısını oluşturur (lökosit rolling). İkinci aşamada, lökosit beta2 integrinler (CD11a/CD18 ve CD11b/CD18) ile endoteldeki interselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1) ile etkileşerek lökosit adhezyonu ve agregasyonu meydana gelir.. Üçüncü aşamada, trombosit-endotel hücresi adhezyon molekülü 1 (PECAM-1) ile endotel hücre bağlantıları etkileşerek lökosit transmigrasyonu meydana gelir [20]. Dokuda aktive lökositlerin başlattığı yanıt ise [21].

- Fosfolipaz A2 aktivasyonu araşidonik asit metabolitleri (prostoglandinler ve lökotrienler) sonucu üretilir,
- Degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır,
- SOR üretimi gerçekleşir.

Serbest radikallerin oluşumunda ve İ/R hasarında nötrofiller oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz enzimlerini aktive ederler. Bu enzimler

aktive nötrofillerde ksantin-oksidad'ın artması sonucu SOR'un salınması yada "solunum patlaması" olayını meydana gelir ve oksidan doku hasarına yol açar. İskemi sonrası reperfüzyonla dokuya sunulan oksijenin yaklaşık %70'i NADPH-bağımlı oksidad ile süperoksit iyonlarına oksitlenir. Süperoksit iyonu spontan dismutasyonla hidrojen peroksida dönüşür [22].

2.1.3. Komplemanın Rolü

Kompleman sisteminin aktivasyonu sonunda C3a, C5a, C3b ve C5b-9 gibi proinflatuar komponentler oluşur. C3a ve C5a lökositleri aktive ederler. Lökosit aktivasyonu ve kemotaksisin uyarılmasına ilaveten C5a, makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b, monosit kemoatraktan protein (MCP)-1, TNF-a, IL-1 ve IL-6 üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı artırır. Kompleman aracılığıyla üretimi uyarılan lökosit adhezyon molekülleri şunlardır [23].

- Vasküler hücre adhezyon molekülü 1 (VCAM-1),
- İnterselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1),
- E-selektin,
- P-selektin.

2.1.4. Endotelin Rolü

Oksidatif stres, endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerini bozar. Endotel hücreleri SOR için potansiyel hedef olmanın yanında SOR üretim kaynağıdır. Endotel hücreleri endotelin (ET) ve nitrik oksidi (NO) salgılar. NO arteriyel dolaşımda ET'nin vazokonstriktör etkisine antagonist eğiliminde, venlerde ise tersi söz konusudur. SOR'ların uzak organ endotel hücreleri üzerindeki etkisi sonrası endotelin/NO oranı endotelin lehine bozularak arteriyel vazokonstriksiyon, venöz vazodilatasyon olur [24]. Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman aktivasyonu ve lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisi ile endotel hücrelerinden doku hasara yanıt olarak İL-1, PAF, prostaglandinler (PGI₂, PGE₂), GM-CSF, büyüme faktörleri, endotelin, NO ve tromboksan A₂ (TxA₂) salgırlar.

2.2. Antioksidanlar

Antioksidanlar, başka substratın oksidasyonunu azaltan veya engelleyen maddelerdir. Tüm hayvanlarda ve bitkilerde serbest radikallerin doku hasarına yol açan etkilerini önlemek için endojen antioksidan sistemleri bulunur. Vücutta sentezlenebildiği gibi diyet ile dışarıdan da alınabilirler. Canlılarda antioksidan savunma sistemi metabolizmada üretilen (endojen) ve dışarıdan diyet ile alınan (ekzojen) antioksidan sistemleridir. Bu sistemler enzimatik olan ve olmayan iki ana gruba ayrılır [25].

Tablo 1. Ana antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidan Enzimler	Rolü	Özellikleri
Superoksit dizmutaz (SOD)	$O_2^- \rightarrow H_2O_2$ 'ye dönüştürür	Manganez içerir (Mn-SOD) Bakır ve çinko içerir (CuZn-SOD) Mn ve Fe içerir (Fe-SOD) Ni içerir (Ni-SOD) Bakır içerir (Cu-SOD)
Katalaz (KAT)	$H_2O_2 \rightarrow H_2O$ 'ya çevirir.	Peroksizomlarda yer alan tetramerik bir proteindir.
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	H_2O_2 ve lipit peroksitlerini etkisizleştirir.	Selenoprotein (Se^{2+} içerir), daha çok sitozolde, az olarak mitokondride bulunur ve GSH kullanır.
Antioksidan Vitaminler	Rolü	Özellikleri
Alfa tokoferol	Lipit peksidasyonunu kırar. Lipit peroksitlerini O_2^- ve OH 'yi temizler.	Yağda çözünür.
Beta karoten	Peroksi radikalleri ile O_2^- ve OH'yi temizler. Vitamin A'nın oksidasyonunu önler. Geçiş metallerini bağlar.	Yağda çözünür.
Askorbik asit	Direk olarak O_2^- , OH ve H_2O_2 temizler. Nötrofiller tarafından uyarılan antioksidanları nötralize eder.	Suda çözünür.

Antioksidan savunma sistemi dört ayrı şekilde çalışmaktadır.

- Serbest oksijen radikallerini tutma, yok etme (süpürücü etki) [26],
- Serbest oksijen radikallerine hidrojen aktararak etkisizleştirme [27],
- Serbest oksijen radikallerini bağlayıp, zincirlerini kırarak etkisiz hale getirmek [28],
- Serbest oksijen radikallerinin oluşturdukları hasarı onarmak [29].



2.2.1 Endojen Antioksidanlar

2.2.1.1. Enzim Olan Endojen Antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz (SOD)

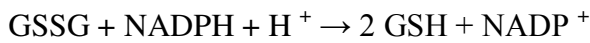
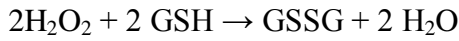
Endojen olarak üretilir ve hücre için esansiyel bir enzimdir. Hücresel SOD metalloenzimlerin bir grubudur. SOD beş farklı formda olup vücutta en bol olarak bakır çinko CuZn-SOD bulunur. Ekstraselüler SOD (EC-SOD), CuZn-SOD'dan farklı olarak bakır ve çinko taşıyan salgısal SOD'dur [30]. EC-SOD, sadece fibroblast ve endotelial hücreler tarafından sentez edilir, SOD ROS'i H₂O₂'ye indirger.



SOD'un antioksidan etkisi süperoksit ile Fe³⁺ 'ün, Fe²⁺ 'ye indirgeyerek hidroksil radikalinin oluşmasının engellenmesi ile gerçekleşir [31].

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

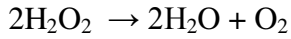
Glutasyon(GSH) redoks döngüsü, hücreiçi hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlar. Glutasyon peroksidaz seleno-sistein bileşiği olup, katalitik aktivitesini 4 atom selenyuma sahip olma özelliği sayesinde sağlar. Aktivasyon için glutatyon gereksinim duyar. GSH-Px glutatyonu okside ederken H₂O₂'yu da H₂O'ya indirgemektedir. Okside glutatyonun (GSSG) tekrar GSH'ya çevrilmesi ise glutatyon redüktaz (GR) tarafından sağlanır.



GSH-Px katalaz, selenyum ve demir gibi geçiş metallerinin kofaktörlüğüne ihtiyaç duyar [25].

Katalaz (KAT)

Hayvansal organizmaların özellikle karaciğer ve eritrosit gibi aerobik hücrelerinde yoğun, beyin, kalp, iskelet kaslarında ise düşük miktarlarda bulunur. KAT ve GSH-Px, hidrojen peroksidi su ve atomik oksijene indirger. KAT ve GSH-Px enzim aktiviteleri artmadan SOD aktivitesinin artışı, hidrojen peroksit birikmesi ve hidroksil radikallerinin oluşmasına neden olur [25].



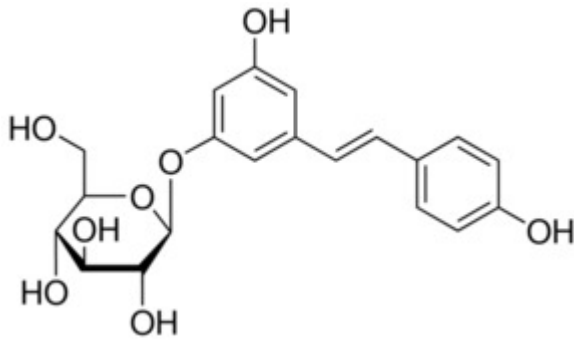
2.2.1.2. Enzim Olmayan Endojen Antioksidanlar

Enzim olmayan endojen antioksidanlar olarak, transferrin, miyoglobulin, serüloplazmin, hemoglobin, melatonin, ferritin, bilirubin, sistein, metiyonin, ürat, glutatyon, albümin ve laktoferrin sayılabilir.

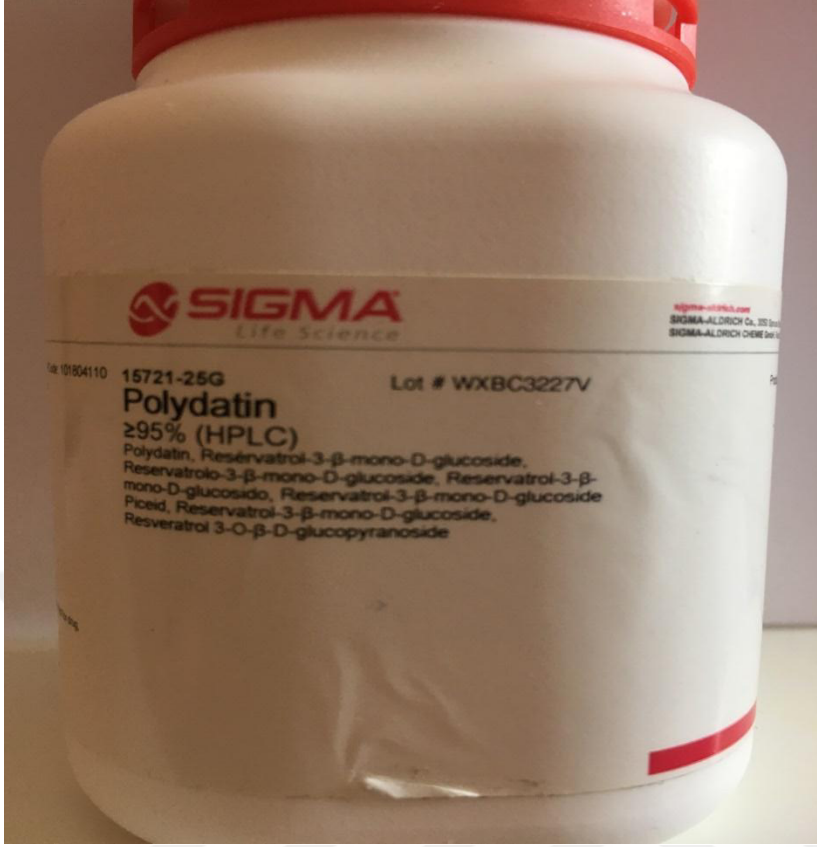
2.2.2. Eksojen Antioksidanlar

Polidatin (PD)

Polidatin *polygonum cuspidatum* bitkisinin köklerinden elde edilir. Üzüm ve yer fıstığında da bulunmaktadır. Kimyasal yapısı 3,4,5-trihydroxystilbene-3-β-D-glukosiddir.



Resim 1: Polidatin'in kimyasal yapısı



Resim 2: Polidatin'in Ticari formu

Polidatin, organlarda İ/R hasarını azaltmaktadır. Bir trans-resveratrol analogu olarak mitokondriyal elektron transport zincir kompleksi-III ' de serbest oksijen radikallerin oluşumunu azaltmaktadır [32]. PD'nin karaciğer hücrelerini koruyucu etkisi, antiinflamatuvar ve antioksidatif aktivitesi ile ilgilidir. PD karaciğerde glutamik piruvik transaminaz salınımını, MDA oluşumunu ve glutasyon birikimini azaltarak koruyucu etki gösterir. NO ve MDA oluşumunu azaltıcı, NOS akitivitesini inhibe edici ve SOD, GSH-Px aktive edici etkisi vardır. PD serum AST, ALT ve hepatik MDA, TNF- α , interlökin 1- β siklooksijenaz-2 (COX-2), iNOS yükselmelerini tersine çevirmektedir [33].

Alfa tokoferol (Vitamin E)

Hücrelerin yağda çözünen ana antioksidanıdır. Vitamin E, organizma için esansiyel olan bir antioksidan bileşiktir. Absorbsiyonu yağ ile birlikte ve yaklaşık

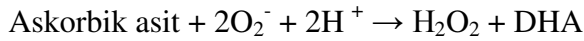
olarak % 40'ı emilmektedir. Absorbe edilen vitamin E şilomikronlar ile lenf sistemine ve kan dolaşımına katılır, yağ dokuda depolanır. Membranların fosfolipitleri alfa tokoferole afinite göstermekte, buralarda yoğunlaşmaktadır. Alfa tokoferol etkisini membran fosfolipitlerinin peroksidasyonu ve hücre membranlarının hasarının önlenmesi ile gösterir [34].

Beta-karoten (Vitamin A)

Karotenoidler, sebze ve meyveler renk veren maddelerdir, vitamin A prekürsörleridir, antioksidandır. En önemlileri β-karoten, likopen, krosetin, kantaksantin ve fukoksantindir. Bunlardan β-karoten, iki molekül vitamin A'nın (retinol) birleşmesinden oluşur, singlet oksijeni yakalama, serbest radikalleri temizleme ve hücre membranı lipitlerini oksidatif dejenerasyona karşı koruma mekanizmaları ile antioksidan etkisi gerçekleşir [25].

Vitamin C (Askorbik asit)

Suda çözünebilen, zincir kıran etkisiyle özellikle detoksifikasyon metabolizması esnasında meydana gelen serbest radikalleri ve ROS'ları etkisiz hale getirir [35]. Redükte edici (elektron verici) özelliğiyle moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve c'yi indirger. Bir elektronun verilmesi sonucu askorbat, semidehidroaskorbat (DHA) radikaline çevirir. Askorbat, süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca reaksiyona girer [25].



Askorbik asit tarafından $\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$ ye dönüştürülür, böylece hidrojen peroksidin hidroksil radikaline çevrilmesi sağlanır [36].

İlaç Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar

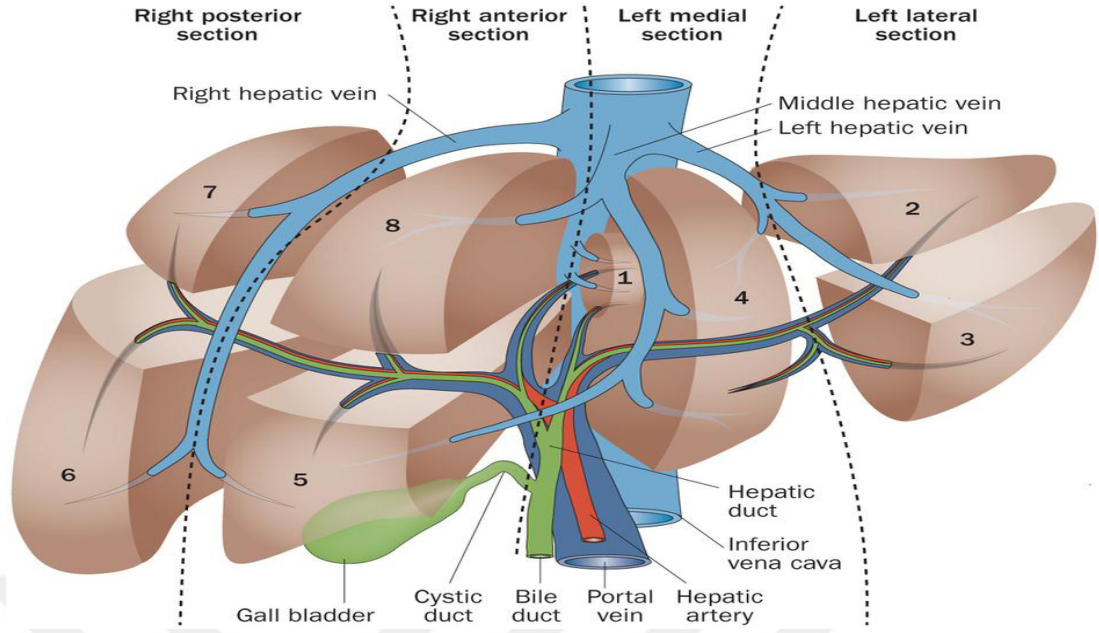
- NADPH, oksidaz inhibitörleri (lokal anestezikler, adenozin kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar)
- Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, tungsten)
- Rekombinant süperoksit dismutaz
- Trolox C (vitamin C analogu)

- Demir redoks döngüsü inhibitörleri
- Barbitüratlar
- Demir şelatörleri
- Sitokinler (TNF ve IL-1)

2.3. Karaciğer

2.3.1 Karaciğer Anatomisi

Karaciğer abdomenin en büyük organdır, büyüklüğü ve konturları kişiden kişiye değişiklik gösterir. Ortalama ağırlığı kadınlarda 1200-1400 gram, erkeklerde ise 1400-1600 gramdır. Klasik olarak karaciğer falsiform ligaman tarafından sağ ve sol loblarına ayrılır, sağ lob daha sonra kuadrat ve kaudat loblara ayrılır, ancak kuadrat ve kaudat lobların aslında karaciğer sol lobun fonksiyonel bölümleri olduğu gösterilmiştir [37]. Karaciğerin segmentlerinin ve subsegmentlerinin tanımlanması Couinaud tarafından yapılmış Bismuth tarafından revize edilmiştir [38]. Couinaud sınıflamasında, hepatik ve portal venlerin üç boyutlu bir karaciğer içindeki dağılımları esas alınmaktadır. Orta hepatik ven, karaciğeri anatomik olarak sağ ve sol loblara ayırır, ancak kaudat lob bu ayrımın dışındadır. Portal ve hepatik venler esas alındığında ise kaudat lob segment I'dir. Sağ hepatik ven sağ lobu anterior ve posterior segmentlere ayırırken, sol hepatik ven sol lobu lateral ve medial segmentlere ayırır. Sağ ve sol portal ven dallarının transvers seyirleri esas alınarak, yukarıda tanımlanan her bir segment superior ve inferior segmentlere bölünerek saat yönünde numaralandırılmış 8 segment oluşturulmuş olur. Bismuth, segment 4'ü süperior (segment 4a) ve inferior (segment 4b) olarak ikiye ayırmıştır. Portal ven dağılımı karaciğerin kesitsel planlarının ayrımında önem taşır. Ana portal ven kaudat lob önünde sağ ve sol portal ven olmak üzere iki ana dala ayrılır, sağ portal ven posterokaudal yönde seyrederek ön ve arka olmak üzere dallanır. Önde segment V ve VIII'e, arkada segment VI ve VII'ye uzanır. Sol portal ven sağa göre daha ön ve kraniale doğru seyrederek, laterale ayrılan dalları segment II ve III'e gider. Sağa ayrılan asendan ve desendan dalları segment IV'e ulaşır. Portal bifurkasyon, sağ ve sol portal venden çıkan bir veya daha fazla dal kaudat lobu besler [39].



Resim 3: Karaciğerin segmenter anatomisi

2.3.2. Karaciğerin Vasküler Anatomisi

Karaciğere gelen kanın yaklaşık %30'u hepatik arterden gelir. Hepatik arter çölyak trunkusunun bir dalıdır ve portal hilusta sağ ve sol terminal dallarına ayrılır. Tekrarlayan dallanmalar ile interlobüler arterleri oluşturur. İnterlobüler arterlerin hem portal yapıları besler hemde direkt olarak sinüzoidlere dökülen arteriollerini oluşturur [39]. Portal ven gastrointestinal sistemin venöz kanını karaciğere getirir ve karaciğere gelen kanın % 75'ini taşır. Portal ven kanı oksijen içeriği bakımından yetersiz olmasına rağmen akım miktarı hepatik arterden fazladır, bu nedenle karaciğerin oksijen gereksiniminin çoğunu karşılar. Tekrarlayan dallanmalar ile interlobüler dalları ve sinüzoidlere dökülen venülleri oluşturur. Sinüzoidler lobüllerin merkezinde biraraya gelerek santral venleri oluşturur. Santral venler, sublobüler venleri bunlar da daha sonra hepatik venleri oluşturup vena kava inferiora dökülürler [39]. Karaciğer vücuttaki tüm lenf sıvısının yaklaşık %40 kadarını üretir. Lenf damarları portal hilustaki lenf nodlarına dökülür, oradan çölyak nodlarına drene olur. Karaciğerin peritonsuz yüzeyinden diyaframı geçerek arka mediasten lenf nodlarına drene olur ancak daha az orandadır [37].

2.3.3.Karaciğer Histolojisi

Karaciğerde çeşitli hücreler bulunmakla bunların %80'i hepatositlerdir. Kalanı, parankimal olmayan hücreler olarak gruplandırabileceğimiz endotelial hücreler, Kupffer hücreleri, lenfositler ve yıldız hücrelerdir. Hepatositler karaciğerin metabolik işlevlerinde esas yükü taşırlar. Endotel hücreleri sinüzoidler ve damarların iç yüzeyini döşer. Kupffer hücreleri sinüsoidlerde fagositoz yapar ve sitokin salarlar. Lenfositler immun sistemin bir parçasıdır. Yıldız hücreler ekstraselüler matriks üretir ve A vitamini depolarlar [40].



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hayvanlar ve Deney Protokolü

Çalışmamıza Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 30.11.2016 tarihli 2016/10-3 onay kodlu etik kurul izni alınarak başlanmıştır. Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi (MKÜ-DAM) laboratuvarında yapılan çalışmamızda, ağırlıkları 275-300 gr arasında değişen 50 adet Wistar Albino cinsi erişkin erkek rat kullanıldı. Ratlar rastlantısal olarak 5 gruba ayrıldı. Çalışma süresince Hayvan Haklarının Korunması hususundaki esaslara özenle uyuldu.

Bütün ratlar deney öncesi sabit çevre koşulları altında standart rat yemi ve su ile beslenerek 7 gün boyunca bekletilip ortama adapte olmaları sağlandı. Tüm gruplar aynı şartlar altında ve aynı ortamda 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ortamda tutuldu. Ratlara 0.5 ml Ketamine (Ketalar 50 mg/ml, Pfizer), 0.1 ml Ksilazin HCl (Alfazyne % 2 20 mg/ml, Alfasan International) ile anestezi uygulandı. Sırt üstü pozisyonda karın tüyleri temizlendikten sonra, karın cildi povidon iyot ile silinerek cilt antisepsisi uygulandı (Resim 5). Batın orta hattan laparotomi yapıldı (Resim 6).

Grup 1 (Kontrol grubu-C): Sadece intraperitoneal serum fizyolojik enjekte edildi. Ratlara 0.5 ml Ketamine (Ketalar 50 mg/ml, Pfizer), 0.1 ml Ksilazin HCl (Alfazyne % 2, 20 mg/ml, Alfasan International) ile anestezi uygulandıktan sonra laparotomi ve torakotomi yapılarak intrakardiyak kan örneği alındı (Resim 7), daha sonra total hepatektomi uygulandı (Resim 8).

Grup 2 (Erken iskemik ön koşullanma-İE): Bu gruptaki ratlara anestezi uygulandıktan sonra alt ekstremitte proksimalinden 4 dk kapalı ve 4 dk açık olacak şekilde turnike uygulandı. Alt ekstremitenin toplam 40 dk iskemik kalması sağlandı. Erken iskemik önkoşullanmanın oluştuğu 4.saatin sonunda laparotomi ve torakotomi yapılarak intrakardiyak kan örneği alındıktan sonra total hepatektomi uygulandı.

Grup 3 (Erken iskemik ön koşullanma+Polidatin-İEP): Bu gruptaki ratlara önce günlük 40 mg/kg/gün dozunda polidatin 3 gün intraperitoneal enjekte edildi. Dördüncü gün ratlara anestezi uygulandıktan sonra alt ekstremitenin proksimalinden 4 dk kapalı ve 4 dk açık olacak şekilde turnike uygulandı. Alt ekstremitenin toplam 40 dk iskemik kalması sağlandı. Erken iskemik önkoşullanmanın oluştuğu 4. saatin sonunda laparotomi ve torakotomi yapılarak intrakardiyak kan örneği alındıktan sonra total hepatektomi uygulandı.

Grup 4 (Gecikmiş iskemik ön koşullanma-İG): Bu gruptaki ratlara anestezi uygulandıktan sonra alt ekstremitenin proksimalinden 4 dk kapalı ve 4 dk açık olacak şekilde turnike uygulandı. Alt ekstremitenin toplam 40 dk iskemik kalması sağlandı. Gecikmiş iskemik önkoşullanmanın oluştuğu 3. günün sonunda tekrar anestezi altında laparotomi ve torakotomi yapılarak intrakardiyak kan örneği alındıktan sonra total hepatektomi uygulandı.

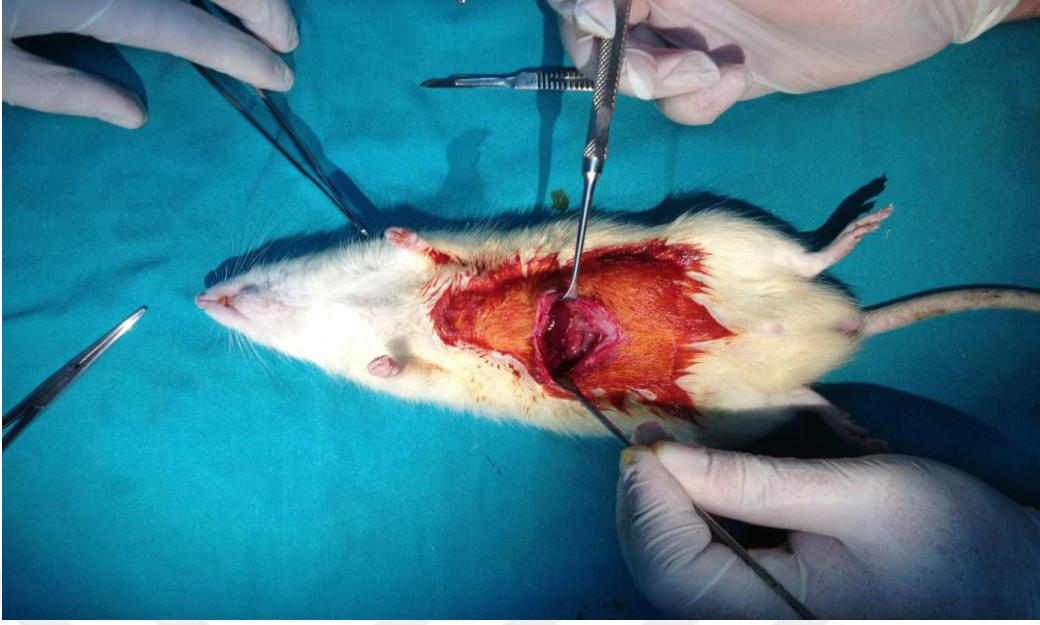
Grup 5 (Gecikmiş iskemik ön koşullanma+Polidatin-İGP): Bu gruptaki ratlara önce günlük 40 mg/kg/gün dozunda polidatin 3 gün intraperitoneal enjekte edildi. Dördüncü gün ratlara anestezi uygulandıktan sonra alt ekstremitenin proksimalinden 4 dk kapalı ve 4 dk açık olacak şekilde turnike uygulandı. Alt ekstremitenin toplam 40 dk iskemik kalması sağlandı. Gecikmiş iskemik önkoşullanmanın oluşması için 3 gün beklendi. Yedinci gün ratlara tekrar anestezi uygulanarak sedasyon sağlandı. Laparotomi ve torakotomi yapılarak intrakardiyak kan örneği alındıktan sonra total hepatektomi uygulandı.



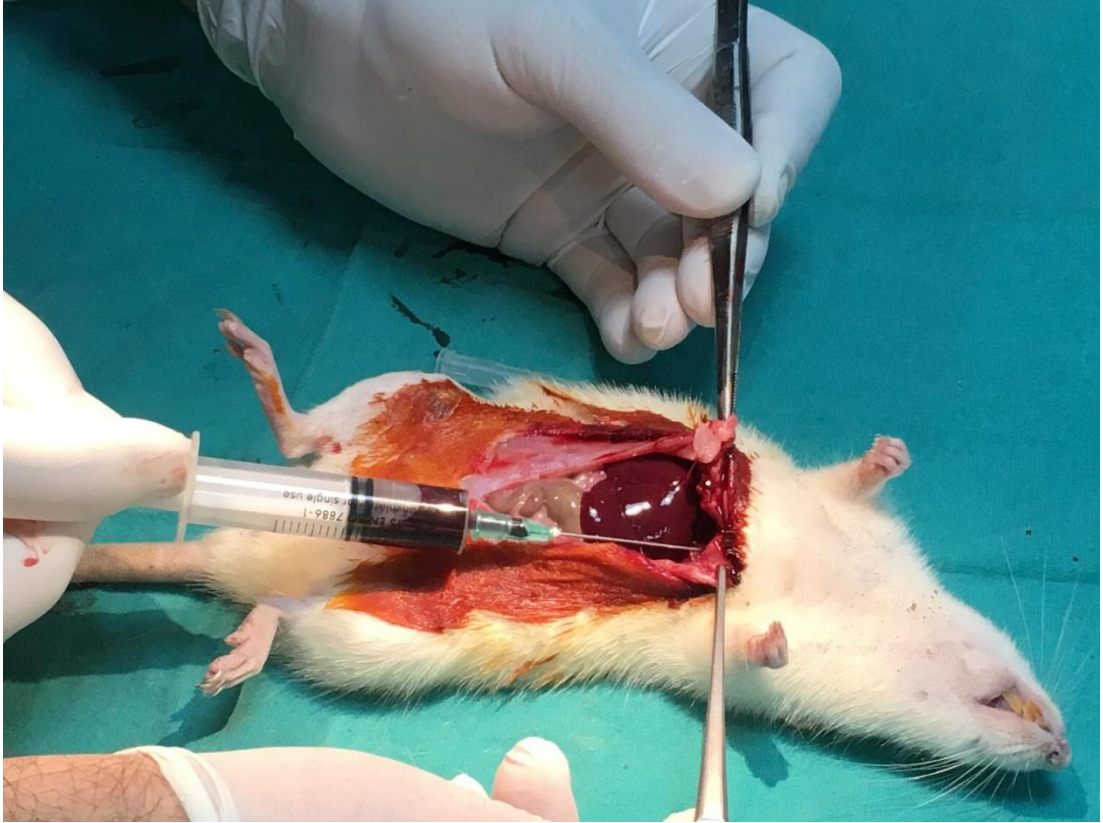
Resim 4 : Alt Ekstremitede İskemi Oluşturulması



Resim 5: Povidon İyod ile Cilt Antiseptiğin Sağlanması



Resim 6 : Laparotomi



Resim 7: Biyokimya Parametreleri için Kan Örneği Alınması



Resim 8: Karaciğer Doku Örneği Alınması

3.2.Biyokimyasal Değerlendirme:

Rezeke edilen karaciğer dokusu alüminyum folyo içine sarılarak -85°C derecede muhafaza edildi. Dondurulan örnekler oda ısısında çözüldükten sonra GSH-Px, Katalaz, SOD aktiviteleri ölçüldü. Jelli biyokimya tüpüne alınan kan örneği 4000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Plazma -20°C derecede muhafaza edildi. Örnekler oda ısısında çözüldükten sonra SOD, GSH-Px, KAT, TAS, TOS, HIF, Total Protein, Albumin, AST, ALT, ALP ve LDH değerleri ölçüldü.

3.2.1. Karaciğer Dokusunun Homojenizasyonu:

Karaciğer dokusu 0,5-0,9 gr parçalara ayrıldı ve bir homojenizatör ile Tris-HCl tamponu (pH 7.4) içinde 16000 rpm' de 3 dakika homojenize edildi. Homojenizasyon bir buz kabının içerisinde gerçekleştirildi. Homojenat $5000\times g$ 'de 1 saat ($+4^{\circ}\text{C}$ 'de) santrifüjlenerek süpernatant elde edildi. KAT ve GSH-Px enzimleri süpernatantta ölçüldü. Süpernatant daha sonra 1/1 oranında etanol/kloroform karışımı (5/3, v/v) eklenerek vortekslenildi ve $5000\times g$ 'de ($+4^{\circ}\text{C}$ 'de) 1 saat santrifüjlendi. Üstteki etanol fazında t-SOD aktivitesi belirlendi.

3.2.1.1. SOD tayini:

Sun ve arkadaşlarının tariflediği [41] ve Durak ve arkadaşlarının modifiye ettiği metoda göre çalışıldı [42]. Kısaca: reaksiyon ortamında ksantin/ksantin oksidaz sisteminin ürettiği süperoksit radikalleri normalde nitroblue tetrazoliumu (NBT) redükleyerek 560 nm’de en iyi tesbit edilebilen mavi-mor bir rengin oluşmasına neden olur. Karaciğer süpernatantında bulunan SOD, bu redüklenmeyi inhibe ederek renk oluşumunu engelleyip, mavi-mor renk meydana gelmemekte ve enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır. Enzim bulunmayan (Kör) değer ile enzim bulunan numune absorbans değerleri hesaba katılır.

Hesaplama:

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

Birimi:

- Plazma için: Ü / mL

-Doku için: SA / (mg protein / mL) = (Ü/mL) / (mg protein/mL) = Ü / mg protein

Örnek Hesaplama: 0,3 mmol / L Xanthine : (M = m / [mw x V (L)] den; m = M x mw x V(L) = 93/1000 x 152,1 x 4 x 10⁻² → m = 1,825 mg alınır. 40 ml. d. suda çözülür.) Sonuç: 0.00913 g/200 mL distile su.

3.2.1.2. KAT tayini:

Aebi [43] metoduna göre yapıldı. Özet olarak; fosfat tamponu içerisinde (pH 7.4) hazırlanıp 240 nm’de yaklaşık 0.500 absorbans veren H₂O₂ çözeltisinin içine numune ilave edildiğinde, numunede bulunan KAT enzimi H₂O₂’yi parçalayarak moleküler oksijen ve su oluşturur. Bu arada absorbans azalması monitörden takip edilip eğimden aktivite hesabı yapıldı.

3.2.1.3.GSH-Px tayini:

Paglia [44] ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı. Kısaca: karaciğer süpernatantında bulunan GSH-Px, reaksiyon ortamına ilave edilen redükte glutatyonu (GSH) okside glutatyon (GSSG) çevirir. Ortama ilave edilmiş olan glutatyon

redüktaz enzimi okside glutasyonu yeniden GSH'a çevirirken molaritesini bildiğimiz NADPH okside olur. İnkübasyon periyodundan sonra (30 dak.) 340 nm'de absorbans azalması belirlenip eğimden aktivite hesaplandı.

3.2.2.Plazmada Parametreler

Plazma AST, ALT, Total Protein, Albumin, ALP ve LDH seviyeleri M.K.Ü biyokimya laboratuvarında Spektrofotometrik olarak otomatikleştirilmiş bir analizör ile ölçüldü.

TAS, Randox tarafından sağlanan bir kit ile değerlendirildi. ABTS (2,2 - azino-di- [3-etilbenziazolin Sülfonat]), peroksidaz (metmyoglobin) ve hidrojen peroksit ile katyon ABTS⁺ elde edilir. ABTS⁺ bileşiğinin mavi-yeşil bir rengi var, bu renk spektrofotometrik olarak 600 nm dalga boyunda değerlendirildi. (mikroplak okuyucu). Numunede bulunan antioksidanlar içeriğiyle orantılı olarak bu renk oluşumunu azaltır.

TOS tespiti immun teşhis ile sağlanan ticari bir kit (PerOx, TOS / TOC) ile yapıldı. Bu deneyde, peroksidaz, TMB'nin renkli bir ürüne dönüştürülmesi ile elde edilen solusyondaki peroksidler ile reaksiyona girer. Durdurma çözeltisinin eklenmesi ile reaksiyon durur ve renk değişikliğine neden olur. Numunenin emiciliği 450 nm'de bir mikrotitre plaka okuyucusunda ölçülmüştür. Miktar tayini, verilen kalibratör ile gerçekleştirildi.

3.3.Patolojik Değerlendirme:

Işık mikroskobu incelemesi için her karaciğerin sağ lobu ayrıldı ve doku parçaları %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Dokuların birer kesit yüzeyi örneklendikten sonra parafine gömüldü, karaciğer dokularının tüm yüzeyini gösteren 4 mikrometre kalınlıkta kesitler alındı ve hematoksen-eozin (HE) ile boyandı. Karaciğer dokusunda Sözen ve ark.larının çalışmasına benzer şekilde hepatositlerde vakuolizasyon, hipereozinofili, hepatositler arası bağlantılar, kanama, nekroz, portal inflamasyon ve polimorf nüveli lökosit infiltrasyonu değerlendirildi ve patolojik olarak skorlandı [45].

Tablo 2: Karaciğer dokusunda hasar skorlanması

GRADE 0	Hafif ya da hiç hasar yok
GRADE 1	Hafif hasar; fokal nükleer piknoz ve sitoplazmik vakuolizasyon
GRADE 2	Orta-ağır hasar; yaygın nükleer piknoz, sitoplazmik hipereozinofili ve intersellüler köprü kaybı
GRADE 3	Ağır nekroz; hepatik kordonlarda ayrılma, hemoraji ve nötrofil infiltrasyonu

3.4.İstatistiksel Değerlendirme:

Çalışma sonrası elde edilen veriler SPSS® paket programı (SPSS® 21.0 for Windows®) kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirildi. Tanımlayıcı istatistiklerde ölçüm ile elde edilen verilerin ortalaması ve standart sapması belirtildi. Ölçüm ile elde edilen veriler için her grupta örnek sayısı 10 olduğundan dolayı istatistiğin değerlendirilmesinde gruplar normal dağılıma uygunsuz bulundu. Bu yüzden istatistiki değerlendirmede grup ortalamaların karşılaştırılmasında nonparametrik testler kullanıldı. Beş grubun kendi içinde karşılaştırılmasında Kruskal Wallis varyans analizi, grupların ikili karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanıldı.

4.BULGULAR

4.1. Biokimyasal Bulgular

4.1.1. Katalaz Değerleri

Tablo 3: Katalazın Gruplar arası değerlendirilmesi

Grup	Ortalama	Standart Sapma	P*	İkili** Karşılaştırma
Kontrol	84,16	34,39	0,003	Grup2 ile P:0,015 Grup3 ile P:0,045 Grup4 ile P:0,052 Grup5 ile P:0,065
Erken İskemik Ön Koşullanma	116,19	39,77		Grup3 ile P:0,011 Grup4 ile P:0,001 Grup5 ile P:0,005
Erken İskemik Ön Koşullanma+ Polidatin	126,65	86,78		Grup4 ile P:0,579 Grup5 ile P:0,280
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma	94,05	31,83		Grup5 ile P:0,971
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma+Polidatin	122,83	91,07		
Total	130,78	71,90		

* Kruskal Wallis, ** Mann Whitney U

KAT seviyelerinin gruplar arası Kruskal Wallis varyans analizi ile yapılan değerlendirmesinde, istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü. Yapılan ikili Mann Whitney U karşılaştırmalı testlerde kontrol grubu ile erken iskemik ön koşullanma grubu arasında anlamlı farklılık olduğu görüldü. İskemi oluşturulması sonrası SOR ve KAT sentezinin arttığı görüldü. Polidatin kullanılan gruplarda

istatistiksel olarak KAT sentezinde daha fazla artış olduğu görüldü. İstatistiksel olarak Erken İskemik Önkoşullanma + Polidatin grubunda anlamlı artış oldu.

4.1.2. SOD Değerleri

Tablo4: SOD ‘un Gruplar arası değerlendirilmesi

Grup	ortalama	Standart sapma	P*	İkili** Karşılaştırma
Kontrol	0,28	0,19	0,004	Grup2 ile P:0,001 Grup3 ile P:0,007 Grup4 ile P:0,043 Grup5 ile P:0,002
Erken İskemik Ön Koşullanma	0,72	0,32		Grup3 ile P:0,853 Grup4 ile P:0,105 Grup5 ile P:0,242
Erken İskemik Ön Koşullanma+ Polidatin	0,81	0,51		Grup4 ile P:0,123 Grup5 ile P:0,190
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma	0,57	0,57		Grup5 ile P:0,247
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma+Polidatin	0,63	0,19		
Total	0,58	0,42		

* Kruskal Wallis, ** Mann Whitney U

SOD’un gruplar arası Kruskal Wallis varyans analizi ile yapılan değerlendirmesinde istatistiksel anlamlı farklılık olduğu görüldü.Yapılan Mann

Whitney U karşılaştırmalı testlerde ikili gruplar arasında anlamlı farklılık görülmedi. Kontrol grubuna göre diğer gruplarda iskemi oluşması ve polidatin'in SOD sentezini indüklemesi sonucu SOD değerlerin arttığı görüldü.

4.1.3. GSH-Px Değerleri

Tablo5: GSH-Px 'in Gruplar arası değerlendirilmesi

Grup	ortalama	Standart sapma	P*	İkili** Karşılaştırma
Kontrol	228,25	42,82	0,655	Grup2 ile P:0,315 Grup3 ile P:0,063 Grup4 ile P:0,393 Grup5 ile P:0,912
Erken İskemik Ön Koşullanma	206,59	90,23		Grup3 ile P:0,631 Grup4 ile P:1,000 Grup5 ile P:0,631
Erken İskemik Ön Koşullanma+ Polidatin	257,90	22,41		Grup4 ile P:0,971 Grup5 ile P:0,393
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma	222,78	67,88		Grup5 ile P:1,000
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma+Polidatin	244,04	104,88		
Total	219,91	62,19		

* Kruskal Wallis, ** Mann Whitney U

GSH-Px'in gruplar arası Kruskal Wallis varyans analizi ile yapılan değerlendirmesinde istatistiksel anlamlı farklılık olmadığı görüldü. Yapılan Mann Whitney U karşılaştırmalı testlerde ikili gruplar arasında anlamlı farklılık görülmedi. Kontrol grubuna göre polidatin kullanılan gruplarda artış olduğu görüldü.

4.1.4. HIF 1 alfa Değerleri

Tablo6: HIF 1 alfanın Gruplar arası değerlendirilmesi

Grup	ortalama	Standart sapma	P*	İkili** Karşılaştırma
Kontrol	57,76	16,96	0,001	Grup2 ile P:0,004 Grup3 ile P:0,247 Grup4 ile P:0,035 Grup5 ile P:0,089
Erken İskemik Ön Koşullanma	90,23	21,60		Grup3 ile P:0,004 Grup4 ile P:0,315 Grup5 ile P:0,001
Erken İskemik Ön Koşullanma+ Polidatin	48,93	24,33		Grup4 ile P:0,015 Grup5 ile P:0,796
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma	76,30	17,76		Grup5 ile P:0,002
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma+Polidatin	45,05	18,89		
Total	63,66	25,87		

* Kruskal Wallis, ** Mann Whitney U

HIF 1 alfanın gruplar arası Kruskal Wallis varyans analizi ile yapılan değerlendirmesinde istatistiksel anlamlı farklılık olduğu görüldü. Yapılan Mann

Whitney U karşılaştırmalı testlerde ikili gruplar arasında anlamlı farklılık görüldü. Kontrol grubu dışında iskemi oluşturulan bütün gruplarda HIF 1 alfanın arttığı görüldü. Erken ve geç iskemik ön koşullanma oluşturulan gruplarda arttığı, erken ve geç iskemik ön koşullanma oluşturulmadan önce polidatin verilen gruplarda artışın daha az olduğu görüldü.

4.1.5. TAS Değerleri

Tablo7: TAS 'ın Gruplar arası değerlendirilmesi

Grup	ortalama	Standart sapma	P*	İkili** Karşılaştırma
Kontrol	13,21	3,17	0,001	Grup2 ile P:0,001 Grup3 ile P:0,001 Grup4 ile P:0,105 Grup5 ile P:0,075
Erken İskemik Ön Koşullanma	16,47	4,26		Grup3 ile P:0,971 Grup4 ile P:0,001 Grup5 ile P:0,002
Erken İskemik Ön Koşullanma+ Polidatin	18,62	4,11		Grup4 ile P:0,001 Grup5 ile P:0,004
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma	27,88	7,64		Grup5 ile P:0,631
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma+Polidatin	29,51	5,91		
Total	21,94	6,89		

* Kruskal Wallis, ** Mann Whitney U

TAS'ın gruplar arası Kruskal Wallis varyans analizi ile yapılan değerlendirmesinde istatistiksel anlamlı farklılık olduğu görüldü. Yapılan Mann

Whitney U karşılaştırmalı testlerde ikili gruplar arasında kontrol grubu ile erken iskemik ön koşullanma grupları arasında anlamlı farklılık görüldü. Diğer gruplar arasında anlamlı farklılık görülmedi. Polidatin kullanılan gruplarda, kullanılmayan aynı gruplara göre TAS değerlerinde bir artış olduğu gözlemlendi.

4.1.6. TOS Değerleri

Tablo 8: TOS'un Gruplar arası değerlendirilmesi

Grup	ortalama	Standart sapma	P*	İkili** Karşılaştırma
Kontrol	3,57	0,73	0,005	Grup2 ile P:0,035 Grup3 ile P:0,105 Grup4 ile P:0,003 Grup5 ile P:0,009
Erken İskemik Ön Koşullanma	4,31	0,77		Grup3 ile P:0,436 Grup4 ile P:0,023 Grup5 ile P:0,190
Erken İskemik Ön Koşullanma+ Polidatin	4,08	0,69		Grup4 ile P:0,029 Grup5 ile P:0,123
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma	5,62	1,57		Grup5 ile P:0,579
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma+Polidatin	5,27	1,57		
Total	21,94	6,89		

* Kruskal Wallis, ** Mann Whitney U

TOS'un gruplar arası Kruskal Wallis varyans analizi ile yapılan değerlendirmesinde istatistiksel anlamlı farklılık olduğu görüldü. İskemi oluşturulan

bütün gruplarda kontrol grubuna göre artış olduğu görüldü. Geç iskemik ön koşullanma grubunda polidatin kullanılması ile istatistiksel olarak anlamlı olmasada bir azalma olduğu görüldü.

4.1.7. AST Değerleri

Tablo 9: AST 'ın Gruplar arası değerlendirilmesi

Grup	ortalama	Standart sapma	P*	İkili** Karşılaştırma
Kontrol	142,90	54,08	0,001	Grup2 ile P:0,001 Grup3 ile P:0,003 Grup 4 ile P:0,912 Grup 5 ile P:0,075
Erken İskemik Ön Koşullanma	329,80	156,58		Grup3 ile P:0,165 Grup 4 ile P:0,002 Grup 5 ile P:0,001
Erken İskemik Ön Koşullanma+ Polidatin	235,20	61,99		Grup 4 ile P:0,011 Grup 5 ile P:0,001
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma	156,50	82,37		Grup 5 ile P:0,063
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma+Polidatin	105,50	23,21		
Total	193,98	116,70		

* Kruskal Wallis, ** Mann Whitney U

AST'nin gruplar arası Kruskal Wallis varyans analizi ile yapılan değerlendirmesinde istatistiksel anlamlı farklılık olduğu görüldü. Polidatin verilen 3.

ve 5. Gruplarda antioksidatif mekanizmaların indüklenmesi sonucu bu gruplarda karaciğerde iskemik ön koşullanma oluşurken oksidatif faktörlerin negatif etkisinin azaldığı görüldü. En düşük AST değerleri Geçikmiş İskemik Ön Koşullanma + Polidatin grubunda ölçüldü.

4.1.8. ALT Değerleri

Tablo 10: ALT'nin Gruplar arası değerlendirilmesi

Grup	ortalama	Standart sapma	P*	İkili** Karşılaştırma
Kontrol	55,00	14,05	0,001	Grup2 ile P:0,280 Grup3 ile P:0,089 Grup 4 ile P:0,089 Grup 5 ile P:0,005
Erken İskemik Ön Koşullanma	65,10	18,90		Grup3 ile P:0,739 Grup 4 ile P:0,005 Grup 5 ile P:0,001
Erken İskemik Ön Koşullanma+ Polidatin	63,00	11,28		Grup 4 ile P:0,002 Grup 5 ile P:0,001
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma	45,30	11,70		Grup 5 ile P:0,043
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma+Polidatin	37,30	7,40		
Total	53,74	16,95		

* Kruskal Wallis, ** Mann Whitney U

ALT'nin gruplar arası Kruskal Wallis varyans analizi ile yapılan değerlendirmesinde istatistiksel anlamlı farklılık olduğu görüldü. Geçikmiş İskemik Ön koşullanma gruplarında ALT değerlerinin ikili karşılaştırmalı testlerde anlamlı olarak düşük olduğu görüldü. Geçikmiş İskemik Ön Koşullanma + Polidatin grubundaki koruyuculuğu görülmektedir.

4.1.9. LDH Değerleri

Tablo 11: LDH'nin Gruplar arası değerlendirilmesi

Grup	ortalama	Standart sapma	P*	İkili** Karşılaştırma
Kontrol	369,20	211,28	0,001	Grup 2 ile P:0,035 Grup 3 ile P:0,684 Grup 4 ile P:0,105 Grup 5 ile P:0,063
Erken İskemik Ön Koşullanma	1106,80	498,52		Grup3 ile P:0,089 Grup 4 ile P:0,001 Grup 5 ile P:0,001
Erken İskemik Ön Koşullanma+ Polidatin	763,60	389,11		Grup 4 ile P:0,052 Grup 5 ile P:0,023
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma	589,20	184,97		Grup 5 ile P:0,971
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma+Polidatin	440,80	221,73		
Total	673,92	417,24		

* Kruskal Wallis, ** Mann Whitney U

LDH'nin gruplar arası Kruskal Wallis varyans analizi ile yapılan değerlendirmesinde istatistiksel anlamlı farklılık olduğu görüldü. İkili

karşılaştırmalarda sadece kontrol grubu ile erken iskemik ön koşulanma grubu arasında istatistiksel anlamlılık olduğu görüldü. En düşük LDH değeri Geçikmiş İskemik Önkoşulanma + Polidatin grubunda ölçüldü.

4.1.10. ALP Değerleri

Tablo 12: ALP'nin Gruplar arası değerlendirilmesi

Grup	ortalama	Standart sapma	P*	İkili** Karşılaştırma
Kontrol	125,10	31,41	0,001	Grup 2 ile P:0,247 Grup 3 ile P:0,280 Grup 4 ile P:0,007 Grup 5 ile P:0,011
Erken İskemik Ön Koşullanma	128,30	35,23		Grup 3 ile P:0,631 Grup 4 ile P:0,075 Grup 5 ile P:0,002
Erken İskemik Ön Koşullanma+ Polidatin	109,80	25,14		Grup 4 ile P:0,105 Grup 5 ile P:0,001
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma	186,40	45,79		Grup 5 ile P:0,001
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma+Polidatin	112,80	72,01		
Total	128,48	79,19		

* Kruskal Wallis, ** Mann Whitney U

ALP'nin gruplar arası Kruskal Wallis varyans analizi ile yapılan değerlendirmesinde istatistiksel anlamlı farklılık olduğu görüldü. Polidatin kullanımı ALP değerlerinde düşmeye neden olmadığı görüldü.

4.1.11. Total Protein Değerleri

Tablo 13: Total Proteinin Gruplar arası değerlendirilmesi

Grup	ortalama	Standart sapma	P*	İkili** Karşılaştırma
Kontrol	5,52	0,60	0,003	Grup 2 ile P:0,436 Grup 3 ile P:0,001 Grup 4 ile P:0,280 Grup 5 ile P:0,123
Erken İskemik Ön Koşullanma	5,31	0,70		Grup 3 ile P:0,005 Grup 4 ile P:0,971 Grup 5 ile P:0,631
Erken İskemik Ön Koşullanma+ Polidatin	4,56	0,22		Grup 4 ile P:0,001 Grup 5 ile P:0,029
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma	5,23	0,40		Grup 5 ile P:0,579
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma+Polidatin	5,12	0,69		
Total	5,14	0,62		

* Kruskal Wallis, ** Mann Whitney U

Total Proteinin gruplar arası Kruskal Wallis varyans analizi ile yapılan değerlendirmesinde istatistiksel anlamlı farklılık olduğu görüldü. İskemi oluşturulan gruplarda antioksidatif mekanizmalarda kullanılmasına sekonder azaldığı görüldü. Erken İskemik Ön Koşulanma grubuna göre Erken İskemik Ön Koşulanma + Polidatin grubunda total proteinde istatistiksel anlamlı düşüklük olduğu görüldü.

4.1.12. Albumin Değerleri

Tablo 14: Albuminin Gruplar arası değerlendirilmesi

Grup	ortalama	Standart sapma	P*	İkili** Karşılaştırma
Kontrol	2,50	0,24	0,001	Grup 2 ile P:0,105 Grup 3 ile P:0,001 Grup 4 ile P:0,393 Grup 5 ile P:0,019
Erken İskemik Ön Koşullanma	2,30	0,30		Grup 3 ile P:0,001 Grup 4 ile P:0,393 Grup 5 ile P:0,315
Erken İskemik Ön Koşullanma+ Polidatin	1,79	0,11		Grup 4 ile P:0,001 Grup 5 ile P:0,001
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma	2,39	0,20		Grup 5 ile P:0,089
Gecikmiş İskemik Ön Koşullanma+Polidatin	2,17	0,29		
Total	2,23	0,33		

* Kruskal Wallis, ** Mann Whitney U

Albuminin gruplar arası Kruskal Wallis varyans analizi ile yapılan değerlendirmesinde istatistiksel anlamlı farklılık olduğu görüldü. İskemi oluşturulan gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüklük olduğu görüldü. Polidatin'in antioksidatif sistem enzimlerinin sentezini indüklemesi sonrası albümin kullanımında artmaya bağlı anlamlı düşüklükler geliştiği görüldü.

4.2.Histopatolojik Bulgular

Tablo 15: Gruplara göre patolojik değerlendirme kriterlerin Ortalama aralığı

Patolojik değerlendirme kriterleri	grup	Rat sayısı	Mean Rank
Sinüzoidal konjesyon	1,00	10	11,15
	2,00	10	34,70
	3,00	10	24,25
	4,00	10	38,60
	5,00	10	18,80
	Total	50	
Sitoplazmik vakuolizasyon	1,00	10	25,50
	2,00	10	25,50
	3,00	10	25,50
	4,00	10	25,50
	5,00	10	25,50
	Total	50	
PMNs	1,00	10	9,15
	2,00	10	32,80
	3,00	10	24,00
	4,00	10	39,25
	5,00	10	22,30
	Total	50	
Karaciğer nekrozu	1,00	10	15,60
	2,00	10	31,10
	3,00	10	28,95
	4,00	10	35,20
	5,00	10	16,65
	Total	50	
Portal inflamasyon	1,00	10	17,00
	2,00	10	35,50
	3,00	10	24,30
	4,00	10	31,80
	5,00	10	18,90
	Total	50	

Tablo 16: Patoloji kriterlerin Gruplar arası Kruskal Warris Testi

	Sinüzoidal konjesyon	Sitoplazmik vakuolizasyon	PMNs	KC nekrozu	Portal inflamasyon
Ki-Kare	25,594	,000	26,933	16,160	14,159
p değeri	,000	1,00	,000	,003	,007

İstatistiksel olarak yapılan Kruskal Wallis testte, gruplar arasında sitoplazmik vakuolizasyon dışında diğer parametrelerde anlamlı farklılıklar olduğu görüldü. Sinüzoidal konjesyon, PMNs infiltrasyonu, karaciğerde oluşan nekroz şiddeti ve portal inflamasyon göz önünde bulundurulduğunda beklenildiği gibi kontrol grubunda en düşük olduğu görüldü.

Gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalı Mann-Whitney U testlerinde erken iskemik ön koşullanma oluşturulan gruba göre erken iskemik ön koşullanma + polidatin kullanılan grubunda patolojik değerlendirme kriterlerin daha düşük olduğu görülmesine rağmen istatistiksel anlamlı bir farklılık görülmedi (p değerleri > 0,05).

Geç iskemik ön koşullanma grubuna göre geç iskemik ön koşullanma + polidatin grubunda istatistiksel olarak patolojik değerlendirme kriterlerinde anlamlı farklılık görüldü. (sinüzoidal konjesyon için p: 0,001, PMNs için p: 0,002, karaciğerde nekroz şiddetine için p:0,002, portal inflamasyon için P:0,043)

Polidatin'in, iskemik ön koşullanma oluşturulurken uzak organ olarak karaciğerde koruyucu etki oluşturduğu görüldü. Geç iskemik ön koşullanmada bu etkinin anlamlı olduğu sonucuna varıldı.

5. TARTIŞMA

Çalışmada alt ekstremitede oluşturulan iskemi-reperfüzyon mekanizması ile karaciğerde erken-geç dönem iskemik önkoşullanma oluşturmak, antioksidatif ve antienflamatuar özelliği olan polidatin'in iskemik önkoşullanma ile birlikte organ preservasyonuna katkısının araştırılması amaçlandı.

İskemik ön koşullanmanın (İÖ) sinyalizasyon yolunu, adenosin, bradikinin, katekolaminler, asetil kolin, anjiotensin II ve opioidler gibi lokal olarak salınan agonistlerin G proteinine bağlı reseptörleri aktive etmesi başlatır. Reseptör aktivasyonu ile protein kinaz C (PKC), protein tirozin kinaz (PTK), ve mitojen aktive protein kinaz (MAPK) ailesinin üyeleri fosforile olarak uyarılır [46, 47]. PKC, hem İÖ hem de kalsiyuma (Ca^{++}) bağlı ön koşullanmada önemli rol oynar [48, 49]. MAPK ailesi içinden özellikle p38'in, MAPK'ın cevapta önemli olduğu bilinmektedir [50].

Oksidatif stres, endotel disfonksiyon patogeneğinde önemli bir etkiye neden olmaktadır. Polidatin; H_2O_2 'in tetiklediği oksidatif stres hasarını engelleyerek, LDH ve SOR salınımını azaltırken SOD, GSHP_x (glutasyon peroksidaz) aktivitesini arttırmak, PKC (protein kinaz -C) sinyal yolunu regüle etmek gibi değişik mekanizmalar vasıtasıyla hücre ve doku koruyucu etki gösterir. PKC önemli bir interselüler sinyal iletim molekülüdür. PKC'nın hücre proliferasyonunda, diferasyonunda ve apoptoziste birçok görevi vardır [51].

Çalışmada uzak iskemik önkoşullanma modelinde oksidatif stres sonrası karaciğerde oluşan hasarın azaldığı görüldü.

İnsanlarda, uzak iskemik önkoşullanmanın inflamatuvar hücre aktivasyonunu ve endotel disfonksiyonunu azalttığı daha önce gösterilmiştir [52]. Yakın zamanlarda, Cheung ve arkadaşları, insanlarda uzak iskemik önkoşullanmanın ilk

linik uygulamasını tanımlamışlardır [53]. Bu randomize kontrollü çalışmada yazarlar, kalp cerrahisi geçiren çocuklarda bir kan basıncı turnikesi kullanarak 4-5 dakikalık alt ekstremite iskemi / reperfüzyon döngüsü ile uzak iskemik önkoşullamayı oluşturdukları çalışmada uzak iskemik önkoşullama ile miyokardiyal hasarı, postoperatif inotropik gereksinimleri ve hava yolu direncinin azaldığını göstermişlerdir [53].

Çalışmamızın bulguları ile uyumlu olarak, uzak iskemik ön koşullanma modelinin polidatin ile birlikte kullanılması karaciğerde iskemik hasarı azaltmak için rasyonel bir terapötik strateji olduğuna işaret etmektedir.

Hui-Lin Wang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, polidatin'in plazma ve miyokard dokusunda malonidialdehid (MDA) seviyesini önemli ölçüde azalttığı, toplam süperoksit dismutaz (T-SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitelerini artırdığını gösterilmiştir [54].

Bizim yaptığımız çalışmada da polidatin'in kullanılması ile dokunun iskemik önkoşullanma adaptasyonu oluşurken, KAT ve SOD için gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p < 0.05$). SOD için İskemik Önkoşullanma modeli oluşturulurken, kontrol grubuna göre polidatin kullanılan gruplardaki artışın, polidatin kullanılmayan gruplardaki artıştan daha fazla olduğu görüldü. Polidatin'in iskemik önkoşullanma oluşurken dengenin antioksidatif yöne doğru olduğu görüldü.

Çalışmamızda Polidatin uygulanan gruplarda KAT, SOD, GSH-Px artışın olması; karaciğer dokusunda antioksidatif enzim indüklenmesinin tetiklendiği düşünüldü.

Polidatin'in doğrudan antioksidatif etkisinin olduğu bilinmektedir [55]. H. Zhang ve arkadaşlarının 2012 de yaptıkları çalışmada, CCl_4 ile indüklenen sıçanların karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonu belirgin olarak arttığı ve antioksidan enzimlerin aktivitesilerinin inhibe olduğu ancak polidatin'in, CCl_4 ile indüklenen hasarlı karaciğer dokularında SOD, GSH, GSH-Px, GST ve KAT'in karaciğer doku mRNA ekspresyon düzeylerini belirgin olarak artırdığını göstermişlerdir. [55].

Hipoksi-İndüklenebilir Faktör (HIF-1), vücudun düşük oksijen konsantrasyonlarına veya hipoksiye tepkisinde ayrılmaz bir rol oynayan dimerik bir protein kompleksidir. HIF-1, homeostatik süreçte yer alan ve lokalize iskemi ve tümörler gibi hipoksik alanlarda vaskülarizasyon geliştirebilen primer genler arasındadır. Düzinelerce hedef gen için bir transkripsiyon faktörüdür; HIF-1 aynı zamanda immünolojik yanıtlar için de önemlidir ve homeostazın, vaskülarizasyonun ve anaerobik metabolizmanın önemli bir fizyolojik düzenleyicisidir. Dahası, HIF-1, algılanan terapötik potansiyel nedeniyle giderek incelenmektedir. Anjiyogeneze neden olduğu için, bu genin iskemik hastalarda iyileştirilmesi, oksijenasyon için gerekli olan damar çoğalmasını teşvik edebilir. Buna karşılık, HIF-1, anjiyojenik özelliklerinden ötürü kanserli hücrelerin hayatta kalmasına ve çoğalmasına izin verdiği için, inhibisyon potansiyel olarak kanserin yayılmasını önleyebilir [60].

Dokularda oluşan hipoksi sonrasında HIF-1 α seviyelerinde artış gözlenmektedir. Marcelle Bergeron ve arkadaşlarının sıçan beyinde oluşturulan iskemi ile yaptığı çalışmada; fokal iskemi sonrası, HIF-1 α , glükoz taşıyıcı-1 ve çeşitli glikolitik enzimleri kodlayan mRNA'ların up regüle olduğunu göstermişlerdir. Hipoksi, dokularda HIF-1'i indükler.

Çalışmada alt ekstremitede oluşturulan iskemi sonrası HIF 1 α seviyelerinde istatistiksel anlamlı artış olduğu görüldü. Erken –Geç İskemik Ön koşullanma modeli oluşturulurken Polidatin verilen gruplarda diğer gruplara göre HIF 1 α seviyelerinin anlamlı olarak daha az olduğu görüldü. Bu sonuçlar, polidatin'in oluşacak olan hipoksiyi ve hipoksi ile ortaya çıkan oksidatif stresi azaltarak etki gösterdiği düşünülmüştür. Çalışmada polidatin'in karaciğer üzerine antioksidatif etkinlik gösterdiği görüldü.

Askın Tas Hekimoglu ve arkadaşlarının ratlarda yaptığı Renal İskemi-Reperfüzyon sonrası, karaciğer doku hasarı ile ilgili çalışmada, oksidatif durumu TOS ve TAS olarak, oksidatif stres göstergesi olan OSI ölçümüyle değerlendirdiler. Süperoksit radikal anyonu, hidrojen peroksit gibi birer birer farklı oksidan moleküllerinin seviyelerinin ölçülmesindeki zorluklardan dolayı serumda TOS'u ölçtüler. Aynı şekilde, antioksidan molekülleri ayrı ayrı ölçmek yerine TAS olarak değerlendirdiler. Son zamanlarda, OSI'nin oksidatif durumu yalnızca TOS veya TAS

düzeinden daha doğru gösterebileceği yaygın olarak belgelenmiştir. Bu çalışmada, TOS ve OSI seviyeleri belirgin olarak artmış ve TAS seviyesi, IR grubunda, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında belirgin şekilde azalmıştır. Öte yandan, antioksidan ile tedavi edilen IR ratlarda TAS düzeyi, IR grubuna göre belirgin şekilde arttı. Bu sonuçlar böbrek IR' nin karaciğer dokusunda artmış oksidatif strese yol açtığını ve oksidatif stresin yükselişinin oksitosin uygulandığında önlendiğini gösterdi [56].

Bizim yaptığımız çalışmada oksidan moleküller plasmada TOS olarak, antioksidan moleküller ise plasmada TAS olarak ölçüldü. TAS ölçümlerinde gruplar arası anlamlı farklılık olduğu görüldü (p:0,001). Polidatin kullanılan gruplarda enzim indüksiyonuna bağlı olarak TAS değerlerinde daha fazla yükselme olduğu görüldü. TOS ölçümlerinde gruplar arası anlamlı farklılık olduğu görüldü (p:0,005). Polidatin kullanılan gruplarda TOS değerlerinin daha fazla düştüğü görüldü. Polidatin kullanımına sekonder oksidatif stresin azaldığı görüldü. Polidatin, oksidatif stresi azaltma özelliği ile Uzak İskemik Önkoşullanma Modeli oluşurken SOR oluşumunu azaltarak ve antioksidatif enzim indüksiyonunu sağlayarak karaciğer preservasyonuna katkı sağladığı düşünöldü.

Karaciğer doku hasarı sonrasında hücre sitoplazmasında bulunan AST, ALT enzim seviyelerindeki artış oranları karaciğer hasarının ciddiyetini yansıtmaktadır. [57].

Guang-Jin Yuan ve arkadaşlarının Ratlarda iskemi / reperfüzyon hasarı sırasında iskemik önkoşullamayla karaciğer oksidan-antioksidan sisteminin modölyasyonu adlı çalışmada, karaciğer iskemi / reperfüzyonu, karaciğer hücrelerinde hasar ve işlev bozukluğuna neden olabilir. İskemik önkoşullanma, karaciğer de dahil olmak üzere çeşitli organlarda İ / R hasarını azaltmak için yaygın bir şekilde kullanıldığı gösterilmişti. Çalışmamızda İskemik Önkoşullanmanın, serum ALT ve AST düzeylerinde azalma ve İ / R grubuna kıyasla artmış doku patolojik değişikliği ile gösterilen hepatik İ / R hasarını azaltabileceğini göstermişlerdir.

Çalışmamızda, alt ekstremitede iskemi oluşturularak açığa çıkan SOR etkisi ile karaciğer dokusunda hasar meydana geldiği görüldü. Karaciğer dokusundaki hasar plasmada AST, ALT değerleri ölçölerek gözlendi. İskemik Önkoşullanma modeli oluşturulmadan önce polidatin verilen gruplarda karaciğer doku hasarında

istatistiksel olarak anlamlı olarak daha az ($p:0,001$ AST ve ALT için) olduğu görüldü. Polidatin'in antioksidatif ve antiinflamatuvar özelliği ile karaciğer dokusunun preservasyonu sağlayarak AST ve ALT enzim seviyelerinin yükselmesini engellediği düşünüldü.

Alexander Chouker ve arkadaşlarının *invivo* hipoksik önkoşullanmanın adenozin reseptör yolu ile karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarında koruduğunu gösterdikleri çalışmada, karaciğer doku hasarını plasma LDH, AST ve ALT ölçümleri ile gösterdiler. İskemi-reperfüzyon yapılmadan önce hipoksik önkoşullanma oluşturulan gruplarda karaciğer doku hasarının azaldığını gösterdiler [58].

Bizim çalışmamızda iskemik koşullanma oluşturulan gruplarda LDH artışının polidatin kullanıldıktan sonra iskemik önkoşullama oluşturulan gruplara göre anlamlı artışlar olduğu görüldü. Polidatin'in antioksidatif ve antiinflamatuvar özelliği ile karaciğer doku preservasyonunda pozitif etki sağladığı düşünüldü.

J Yu, S Yin ve arkadaşlarının Hipoksik Önkoşullanma ile Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerinin proliferasyonunu artırarak rat kitlesel hepatektomi modelinde karaciğer rejenerasyonunu teşvik etmesi adlı çalışmada, VEGF+H-BMMSG grubunda, kontrol ve H-BMMSG gruplarına göre siklin D₁ ve serum albümin değerleri anlamlı olarak düşük bulundu. Karaciğer rejenerasyonunda ve hipoksik önkoşullanma oluşurken antioksidatif enzim sentezi aşamalarında albümin kullanılmasına sekonder anlamlı düşüklükler olduğunu gösterdiler [59].

Bizim çalışmamızda iskemik ön koşullanma modeli oluşturulduğunda antioksidatif enzim sentezinde kullanılması ve karaciğer sentez fonksiyonuna azalmasına sekonder serum albüminin seviyesinde azalma olduğu görüldü. Polidatin verilen gruplarda karaciğer doku hasarında azalmaya rağmen serum albümin seviyelerinde anlamlı azalma olmasını, polidatin'in enzim indüksiyonunu tetiklemesine bağlı olduğu düşünüldü.

H Zhang ve arkadaşlarının Polidatin'in ratlarda karbon tetraklorürle oluşturulan karaciğer hasarına karşı koruyucu etkileri adlı çalışmada, karbon tetraklorür ile iskemik karaciğer hasarı oluşturulmadan önce 5 gün polidatin verilen grup ile diğer gruplar değerlendirildi. Karaciğer dokusu optik bir mikroskop altında aşağıdaki histopatolojik değişiklikleri gösterdi. Normal hepatik hücreler, merkezi

ven çevresinde düzenli ve radyal olarak düzenlenmiş ve hepatik lobül yapı bozulmamıştı. Karbon tetraklorür verilen ratların karaciğer hücreleri, dejenerasyon, vakuoller ve nekroz gibi değişiklikler görüldü ve portal yollar ve karaciğer lobülleri arasında büyük miktarda anormal eozinofil infiltrasyonu mevcuttu. Polidatin verilen grupta, karaciğer dokusunda azalmış inflamatuvar hücre infiltrasyonu eşliğinde önemli derecede hafifletilmiş dejenerasyon ve nekroz gözlemlendi. Polidatin'in ratların CCl₄ ile uyarılan hepatotoksisiteye karşı korunduğunu düşündürmektedir. Karaciğer fonksiyon belirteçlerinin değişimi ile paralel olarak, bu fenomenler, dejenerasyon ve nekroz hafifletilmiş histolojik bulgular ve karaciğer dokusunda azalmış inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile de teyit edildi [55].

Y Wang ve arkadaşlarının Uzak İskemik Önkoşullanmanın Heme Oksijenaz - 1-indüklü Otofaji ile Karaciğer İskemi-Reperfüzyon Hasarına karşı Korunması adlı çalışmada, reperfüzyondan sonra karaciğer, IR grubunda, özellikle de merkezi ven çevresindeki geniş alanlarda hepatosit nekrozu ve sinüzoidal konjesyon oluştuğunu gösterdi. Histolojik incelemede, uzak iskemik önkoşullanma modeli oluşturulan grupta hepatosit nekrozu, sitoplazmik vakuolizasyon ve sinüzoid konjesyonu azalma eğiliminde olduğunu gösterdi [60].

Bizim çalışmamızda kontrol grubuna göre diğer gruplarda sinüzoidal konjesyon (p:0,001), PMNs infiltrasyonu (p:0,001), karaciğer nekrozu (p:0,003) ve portal inflamasyon (p:0,007) şiddetinde anlamlı artışlar olduğu görüldü. İskemik Önkoşullanma Modeli oluşturulmadan önce 3 gün Polidatin verilen gruplarda sinüzoidal konjesyon, PMNs infiltrasyonu, karaciğer nekrozu ve portal inflamasyon şiddetinde azalma olduğu görüldü. Erken iskemik önkoşullanma oluşturulan grup 2 ve 3 kendi aralarında değerlendirildiğinde, polidatin verilen grup 3 de sinüzoidal konjesyon (p:0,06), PMNs infiltrasyonu (p:0,10), karaciğer nekrozu (p:0,63) ve portal inflamasyon (p:0,14) şiddetinde istatistiksel olarak anlamsız düşmeler olduğu görüldü. Kontrol grubuna göre grup 3'de anlamlı olmayan artışlar olduğu görüldü, kontrol grubuna göre grup 2'de sinüzoidal konjesyon (p:0,001), PMNs infiltrasyonu (p:0,001), karaciğer nekrozu (p:0,04) ve portal inflamasyon (p:0,003) şiddetinde anlamlı artışlar olduğu görüldü. Erken iskemik önkoşullanma oluşturulurken polidatin'in karaciğer dokusunda koruyucu etkisinin ortaya çıktığı düşünüldü. Geç iskemik önkoşullanma oluşturulan grup 4 ve 5 kendi aralarında

değerlendirildiğinde, polidatin verilen grup 5 de sinüzoidal konjesyon (p:0,001), PMNs infiltrasyonu (p:0,002), karaciğer nekrozu (p:0,002) ve portal inflamasyon (p:0,04) şiddetinde anlamlı düşmeler olduğu görüldü. Kontrol grubuna göre grup 5 de sadece PMNs infiltrasyonunda (p:0,005) anlamlı artış olduğu, diğer parametrelerde anlamlı artış olmadığı görüldü, kontrol grubuna göre grup 4'de sinüzoidal konjesyon (p:0,001), PMNs infiltrasyonu (p:0,001), karaciğer nekrozu (p:0,001) ve portal inflamasyon (p:0,023) şiddetinde anlamlı artışlar olduğu görüldü. Geç iskemik önkoşullanma oluşturulurken polidatin'in karaciğer dokusunda koruyucu etkisinin ortaya çıktığı düşünüldü. Biyokimyasal değerler ve histopatolojik değişiklikler göz önünde bulundurulduğunda İskemik Önkoşulanma Modelinde Polidatin'in Karaciğer Preservasyonu üzerine sitoprotektif katkı sağladığı düşünüldü.

6. SONUÇ

Alt ekstremitede oluşturulan iskemi-reperfüzyon sonrası serbest oksijen radikalleri ve sitokinlerin uzak organ olarak karaciğerde iskemik önkoşullanma yaratırken doku hasarında oluşturmaktadır.

Alt ekstremitede iskemi-reperfüzyon oluşturmadan önce Polidatin kullanılması, uzak organ olarak karaciğerde iskemik önkoşullanma oluşurken oluşan doku hasarını azaltarak, AST, ALT, LDH değerlerinde azalma sağlamaktadır.

Alt eksteremite iskemi-reperfüzyon oluşturmadan önce Polidatin kullanılması SOR yıkımı için kullanılan GSH-Px, KAT, SOD seviyelerini artırırken, bu enzimlerin sentezinde kullanılan total protein ve albümin seviyelerini azalmaktadır.

Polidatin kullanılması sonrası, karaciğerde oluşan Sinüzoidal konjesyon, PMNs infiltrasyonu ve hücrel nekroz şiddeti anlamlı şekilde azalmaktadır.

Polidatin'in, İskemik önkoşullanma modelinde karaciğer preservasyonuna pozitif katkı sağladığı gösterilmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Öncel, T.U., P.Ç. Dinçer, and İ. Cinel, İskemik Önkoşullamanın Klinik Önemi. Göğüs-Kalp-Damar Anestezi ve Yoğun Bakım Derneği Dergisi, 2012. 2012(1): 1-10.
2. Sarsılmaz, H., Böbrek iskemesine; iskemik ard koşullanma, karaciğer iskemik ard koşullanma ve pravastatinin koruyucu etkisinin araştırılması. 2015-ESOGO ,Sağlık Bilimleri Enstitüsü yayını
3. Loukogeorgakis, S.P., et al., Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans. Journal of the American College of Cardiology, 2005. 46(3): 450-456.
4. Luh, S.-p. and P.-c. Yang, Organ preconditioning: the past, current status, and related lung studies. Journal of Zhejiang University Science B, 2006. 7(5): 331-341.
5. Heizmann, O., et al., Ischemic preconditioning improves postoperative outcome after liver resections: a randomized controlled study. European journal of medical research, 2008. 13(2): 79.
6. Qiao, H., et al., Polydatin attenuates H2O2-induced oxidative stress via PKC pathway. Oxidative medicine and cellular longevity, 2016. 2016.
7. Kandilci, H.B. and B. Gümüşel, Akciğerlerde iskemireperfüzyon hasarı ve iskemik önkoşullanma. Hacettepe Üniversitesi. Eczacılık Fakültesi Dergisi, 2005. 25: 35.
8. Kaelin, W.G. and P.J. Ratcliffe, Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. Molecular cell, 2008. 30(4): 393-402.
9. Chavez, A., et al., Mitochondria and Hypoxia-induced Gene Expression Mediated by Hypoxia-inducible Factors. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008. 1147(1): 312-320.
10. Yamakuchi, M., et al., P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. 107(14): 6334-6339.
11. Rabie, T. and H.H. Marti, Brain protection by erythropoietin: a manifold task. Physiology, 2008. 23(5). 263-274.
12. Kukreja, R.C., et al., Pharmacological preconditioning with sildenafil: basic mechanisms and clinical implications. Vascular pharmacology, 2005. 42(5): 219-232.

13. Ludwig, L.M., et al., Morphine Enhances Pharmacological Preconditioning by Isoflurane Role of Mitochondrial KATP Channels and Opioid Receptors. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 2003. 98(3): 705-711.
14. Berkan, Ö., et al., Alt ekstremité iskemi reperfüzyona bağlı gelişen akciğer hasarında askorbik asidin etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg*, 2001. 9(4): 238-241.
15. Şener, G. and Y. ÇB, İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Derg*, 2009. 22(3): 5-13.
16. McCord, J.M., Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine*, 1985. 312(3): 159-163.
17. Girotti, A.W., Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of lipid research*, 1998. 39(8): 1529-1542.
18. Marnett, L.J., Oxyradicals and DNA damage. *carcinogenesis*, 2000. 21(3): 361-370.
19. Eltzschig, H.K. and C.D. Collard, Vascular ischaemia and reperfusion injury. *British medical bulletin*, 2004. 70(1): 71-86.
20. Woodfin, A., M.-B. Voisin, and S. Nourshargh, PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2007. 27(12): 2514-2523.
21. Schoenberg, M.H. and H.G. Beger, Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Critical care medicine*, 1993. 21(9): 1376-1386.
22. Korthuis, R.J. and D.N. Granger, Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clinical cardiology*, 1993. 16(S1): 19-26.
23. Thrane, A., J. Skehan, and P. Thrane, A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Medical hypotheses*, 2007. 68(6): 1363-1370.
24. García-Villalón, A.L., et al., Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascular pharmacology*, 2008. 48(2): 109-114.
25. Çaylak, E., Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 2011. 9(1): 73-83.
26. Karihtala, P. and Y. Soini, Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *Apmis*, 2007. 115(2): 81-103.

27. Cherubini, A., et al., Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. *Current medicinal chemistry*, 2008. 15(12): 1236-1248.
28. Mickle, D. and R. Weisel, Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. *The Canadian journal of cardiology*, 1992. 9(1): 89-93.
29. Virág, L. and C. Szabó, The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacological reviews*, 2002. 54(3): 375-429.
30. Marklund, S.L., Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1982. 79(24): 7634-7638.
31. Marjani, A., Lipid peroxidation alterations in type 2 diabetic patients. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2010. 13(15): 723.
32. Zeng, Z., et al., Polydatin protecting kidneys against hemorrhagic shock-induced mitochondrial dysfunction via SIRT1 activation and p53 deacetylation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016. 2016.
33. Du, Q.-H., C. Peng, and H. Zhang, Polydatin: a review of pharmacology and pharmacokinetics. *Pharmaceutical biology*, 2013. 51(11): 1347-1354.
34. Gey, K., et al., Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *The American journal of clinical nutrition*, 1991. 53(1): 326S-334S.
35. Carr, A.C., B.-Z. Zhu, and B. Frei, Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and α -tocopherol (vitamin E). *Circulation research*, 2000. 87(5): 349-354.
36. Proteggente, A.R., et al., Potential problems of ascorbate and iron supplementation: pro-oxidant effect in vivo? *Biochemical and biophysical research communications*, 2000. 277(3): 535-540.
37. Snell, R.S., *Clinical anatomy by systems*. 2007: Lippincott Williams & Wilkins.
38. Bismuth, H., *Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver*. *World journal of surgery*, 1982. 6(1): 3-9.
39. Köken, D., Karaciğer hidatik kistlerinin tiplendirilmesinde ultrasonografi ve difüzyon ağırlıklı manyetik rezonans görüntüleme bulgularının karşılaştırılması. 2012.
40. Fausto, N. and J.S. Campbell, The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mechanisms of development*, 2003. 120(1): 117-130.

41. Sun, Y., L.W. Oberley, and Y. Li, A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 1988. 34(3): 497-500.
42. Durak, I., et al., A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clinica Chimica Acta*, 1993. 214(1): 103-104.
43. Aebi, H.i. and H. Bergmeyer, *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New York, 1974. 2: 674-84.
44. Paglia, D.E. and W.N. Valentine, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 1967. 70(1): 158-169.
45. Sözen, S., et al., The effects of glutamine on hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *Hippokratia*, 2011. 15(2): 161.
46. Armstrong, S.C., Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular research*, 2004. 61(3): 427-436.
47. Xuan, Y.-T., et al., Role of the protein kinase C- ϵ -Raf-1-MEK-1/2-p44/42 MAPK signaling cascade in the activation of signal transducers and activators of transcription 1 and 3 and induction of cyclooxygenase-2 after ischemic preconditioning. *Circulation*, 2005. 112(13): 1971-1978.
48. Downey, J.M. and M.V. Cohen, Arguments in favor of protein kinase C playing an important role in ischemic preconditioning. *Basic research in cardiology*, 1997. 92: 37-39.
49. Nishizuka, Y., Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 1992. 258(5082): 607-615.
50. Dreixler, J.C., et al., Mitogen-activated protein kinase p38 α and retinal ischemic preconditioning. *Experimental eye research*, 2009. 89(5): 782-790.
51. Nakagawa, M., et al., Phorbol ester-induced G1 phase arrest selectively mediated by protein kinase C δ -dependent induction of p21. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. 280(40): 33926-33934.
52. Kharbanda, R., et al., Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation*, 2002. 106(23): 2881-2883.
53. Cheung, M.M., et al., Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery. *Journal of the American College of Cardiology*, 2006. 47(11): 2277-2282.
54. Wang, H.-L., et al., Comparative studies of polydatin and resveratrol on mutual transformation and antioxidative effect in vivo. *Phytomedicine*, 2015. 22(5): 553-559.

55. Zhang, H., et al., Protective effects of polydatin from *Polygonum cuspidatum* against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *PLoS One*, 2012. 7(9): e46574.
56. Tas Hekimoglu, A., et al., Oxytocin ameliorates remote liver injury induced by renal ischemia-reperfusion in rats. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 2013. 17(2): 169-173.
57. Srivastava, A. and T. Shivanandappa, Hepatoprotective effect of the root extract of *Decalepis hamiltonii* against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. *Food Chemistry*, 2010. 118(2): 411-417.
58. Choukèr, A., et al., In vivo hypoxic preconditioning protects from warm liver ischemic/reperfusion injury through the adenosine A2B receptor. *Transplantation*, 2012. 94(9): 894.
59. Yu, J., et al., Hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells promote liver regeneration in a rat massive hepatectomy model. *Stem cell research & therapy*, 2013. 4(4): 83.
60. Wang, Y., et al., Remote ischemic preconditioning protects against liver ischemia-reperfusion injury via heme oxygenase-1-induced autophagy. *PloS one*, 2014. 9(6): e98834.

ÖZGEÇMİŞ

25 Şubat 1981 yılında Malatya’da doğdum. İlköğretim ve lise eğitimimi 1986-1997 yılları arasında Malatya’da tamamladım. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesini 1998 yılında kazandım. Haziran 2006 yılında mezun oldum. 2012 yılına kadar kamu kuruluşlarında ve özel hastanelerde pratisyen hekim olarak çalıştım. 2008-2009 yıllarında askerlik hizmetimi tamamladım. 03.08.2012 tarihinde Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı’nda asistan doktor olarak göreve başladım, halen bu görevimi sürdürmekteyim.

Dr.Erhan KIZILKAYA



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı :40595970-050.99/
Konu :Yrd.Doç.Dr. Erol KİLİÇ

SAYIN YRD.DOÇ.DR. EROL KİLİÇ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI ÖĞRETİM ÜYESİ

İlgi :23/11/2016 tarihli 32937454-020-65230 sayılı yazı,

Kurulumuzun 30/11/2016 tarihli toplantısında almış olduğu 2016/10-3 numaralı karar aşağıda sunulmuştur.
Bilgilerinize rica ederim.

Prof.Dr. Muhammed Enes ALTUĞ
Başkan

Karar-2016/10-3 Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Erol KİLİÇ'in (Genel Cerrahi AD) yürütücüsü olduğu Doç. Dr. İbrahim YETİM (Genel Cerrahi AD), Asistan Dr. Erhan KIZILKAYA (Genel Cerrahi AD), Yrd. Doç. Dr. İlke E. SEÇİNTİ (Tıbbi Patoloji AD) ve Yrd. Doç. Dr. Oğuzhan ÖZCAN'ın (Tıbbi Biyokimya AD) ortak çalışmaları "**İskemik Önkoşullanma Modelinde Polydatinin Karaciğer Presevasyonu Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi**" proje önerisi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine uygun bulunarak onaylanmasına oybirliğiyle karar verilmiştir.

Mevcut Elektronik İmzalar

MUHAMMED ENES ALTUĞ (Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu - Başkan) 09/12/2016 09:46

GİZLİ

T: F:

E-Posta : Web:

İletişim: Hükümet Ardılı (Dahili: 3262455845)

