



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

**RATLARDA KARACİĞER İSKEMİ / REPERFÜZYON
HASARINDA GLİKOPROTEİN IIB/IIIA İNHİBİTÖRÜ OLAN
TİROFİBAN HİDROKLORİD' İN KORUYUCU ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. İlhan PALTACI
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Akın AYDOĞAN**

HATAY - 2013

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

**RATLARDA KARACİĞER İSKEMİ / REPERFÜZYON
HASARINDA GLİKOPROTEİN IIB/III A İNHİBİTÖRÜ OLAN
TİROFİBAN HİDROKLORİD'İN KORUYUCU ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. İlhan PALTACI
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Akın AYDOĞAN**

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

**Tez Adı : RATLARDA KARACİĞER İSKEMİ / REPERFÜZYON
HASARINDA GLİKOPROTEİN IIB/IIIA İNHİBİTÖRÜ OLAN
TİROFİBAN HİDROKLORİD' İN KORUYUCU ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Tezi Hazırlayanın Adı: Dr. İlhan PALTACI

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).....
4.(İsim ve imza).....
5.(İsim ve imza).....

İÇİNDEKİLER

TABLolar	v
RESİMLER VE ŞEKİLLER	vi
KISALTMA	vii
TEŞEKKÜR	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. İskemi Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi	2
2.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri	3
2.1.2. Polimorf Nüveli Lökositler	6
2.1.3. Komplemanın Rolü	6
2.1.4. Endotelin Rolü	7
2.2. Antioksidanlar	7
2.2.1. Endojen Antioksidanlar	8
2.2.2. Eksojen Antioksidanlar	8
2.2.3. Katalaz	8
2.2.4. Glutasyon	9
2.2.5. Süperoksit Dismutaz	9
2.3. Karaciğer	9
2.3.1. Karaciğer Anatomisi	9
2.3.2. Karaciğer Histolojisi	10
2.4. Tirofiban Hidroklorid	11

3. MATERYAL VE METOD.....	13
3.1. Hayvanlar ve Tedavileri.....	13
3.2. Biyokimya.....	18
3.2.1. Dokularda Homojenizasyon İşlemleri.....	18
3.2.2. Biyokimyasal Analizler.....	22
3.3. İstatistiksel Analiz.....	26
4. BULGULAR.....	27
4.1. Biyokimyasal Bulgular.....	27
4.1.1. AST Değeri.....	27
4.1.2. ALT Değeri.....	28
4.1.3. LDH Değeri.....	30
4.1.4. Katalaz Değeri.....	31
4.1.5. Süperoksit Dismutaz Değeri.....	33
4.1.6. Glutasyon Değeri.....	34
4.2. Histopatolojik Bulgular.....	36
5. TARTIŞMA.....	40
6. SONUÇ.....	45
7. KAYNAKLAR.....	46
8. ÖZGEÇMİŞ.....	52

TABLÖLAR

Tablo 1: Hepatik hasar gradelemesi	14
Tablo 2: Lowry metodu.....	20
Tablo 3: Protein standart grafiğinin çizimi.....	21
Tablo 4: CAT enzim aktivitesi çalışılması	23
Tablo 5: Total-SOD deney metodu.....	25
Tablo 6: Gruplara ait AST ortalama değerleri.....	27
Tablo 7: Gruplara ait ALT ortalama değerleri.....	29
Tablo 8: Gruplara ait LDH ortalama değerleri.....	30
Tablo 9: Gruplara ait Katalaz ortalama değerleri.....	32
Tablo 10: Gruplara ait SOD ortalama değerleri	33
Tablo 11: Gruplara ait Glutatyon ortalama değeri.....	35
Tablo 12: Grupların hepatik hasar skorlaması.....	38

RESİMLER VE ŞEKİLLER

Resim 1: KC vasküler yapısı (portal hilus).....	10
Şekil 1: Tirofiban' ın molekül yapısı.....	11
Resim 2: Tirofiban Hidroklorid ticari form.....	11
Resim 3: Pavidon iyod ile cilt antisepsisi.....	15
Resim 4: Laparotomi.....	15
Resim 5: Portal hilus eksplorasyonu.....	16
Resim 6: İntrakardiyak kan alınması.....	16
Resim 7: Portal hilus blokajı.....	17
Resim 8: Batın kapama.....	17
Şekil 2: Protein standart grafiği.....	22
Şekil 3: Gruplara ait AST ortalama değerleri grafiği.....	28
Şekil 4: Gruplara ait ALT ortalama değerleri grafiği.....	29
Şekil 5: Gruplara ait LDH ortalama değerleri grafiği.....	31
Şekil 6: Gruplara ait Katalaz ortalama değerleri grafiği.....	32
Şekil 7: Gruplara ait SOD ortalama değerleri grafiği.....	34
Şekil 8: Gruplara ait Glutasyon ortalama değerleri grafiği.....	35
Resim 9: Kontrol grubu; hepatositlerde normal morfolojik yapı.....	36
Resim 10: İskemi reperfüzyon grubu; hepatositlerde hasar bulguları.....	37
Resim 11: İskemi öncesi TH verilen grup; azalmış hasar bulguları.....	37
Resim 12: Reperfüzyon öncesi TH verilen grup; azalmış hasar bulguları.....	38

KISALTMALAR

AK: Absorbans **K**ör

ALT: Alaninaminotransaminaz

AN: Absorbans Numune

AST: Aspartataminotransferaz

CAT: 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

MCP: Monosit Kemotaktik Protein (Monocyte Chemoattractant Protein)

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

TH: Tirofiban Hidroklorid

TNF: Tümör Nekrozis Faktör

TEŞEKKÜR

Genel Cerrahi eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, sabır ve hoşgörülerini ile beni daima daha iyi bir cerrah olmaya teşvik eden ve cerrahi sanatının prensiplerini öğrenmemde bana destek olup, yetişmemde emeği geçen başta Doç.Dr. Muhyittin TEMİZ, Yrd.Doç.Dr. Akın AYDOĞAN, Yrd.Doç.Dr. İbrahim YETİM, Yrd.Doç.Dr. Seçkin AKKÜÇÜK, Doç.Dr. Orhan Veli ÖZKAN, Doç.Dr. Ahmet ASLAN, Opr.Dr. Ersan SEMERCİ ve Yrd.Doç.Dr. Mustafa UĞUR'a teşekkür ederim.

Genel Cerrahi kliniğinde birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarımdan Dr. Fikret BEYAZ, Dr. Güvenç DİNER, Dr. Yılmaz YİĞİT, Dr. Elif CANBOLANT, Dr.İsmail KURT, Dr.Aydın KAPLAN, Dr.Uğraş DABAN, Dr.Orhan Gazi ÖZBİLEN, Dr.Erhan KIZILKAYA, Dr.Cebrail YETKİN, servis sorumlu hemşiremiz Emine GÖKKAYA ve ekibi, ameliyathane hemşiremiz Fatma TOPAK' a teşekkür ederim.

Sabır ve fedakârlıkla desteğini her zaman yanımda hissettiğim eşim Fatma Bola PALTACI, biricik çocuklarım Tanıl ve Taylan' a sonsuz teşekkürler.

Dr.İlhan PALTACI
Ocak 2013

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada karaciğer iskemi reperfüzyonun (İR) neden olduğu hasarın, birtakım biyokimyasal ve histopatolojik parametreler üzerinden değerlendirilmesi ve Glikoprotein IIb/IIIa inhibitörü olan, Tirofiban Hidroklorid (TH) uygulamasının, bu parametrelerde oluşabilecek değişikliklere etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu amaçla Wistar Albino türü erkek sıçanlarda, karaciğer dokusunda portal ven, hepatik arter ve safra yollarına 45 dakika iskemi, hemen sonrasında 60 dakika reperfüzyon uygulandı. Gruplardan birine iskemiden 30 dakika önce, başka bir gruba reperfüzyondan 30 dakika önce TH intraperitonel olarak verildi. Deney sonunda hayvanlar dekapite edilerek kan ve doku örnekleri alındı.

Bulgular: Karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmek amacıyla serumda aspartataminotransaminaz (AST), alaninaminotransaminaz (ALT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) seviyeleri ölçüldü. Karaciğer doku örneklerinde katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon (GSH) düzeyleri ölçüldü. Alınan karaciğer doku örnekleri Hemotoksilen Eosin ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda histopatolojik olarak incelendi. Serumda ölçülen AST, ALT ve LDH değerlerinde İR sonucunda artış gözlenirken, TH verilen gruplarda bu parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüş sağlanmıştır. İR gruplarında doku düzeyindeki katalaz, SOD ve GSH değerlerinde azalma gözlenmiştir. TH verilen gruplarda ise antioksidan değerlerinde İR gruplarına göre artış gözlenmiştir. Histopatolojik olarak İR hasarının göstergesi olan hepatosellüler seviyedeki hasar, TH uygulaması ile belirgin olarak azalma göstermiştir.

Sonuç: Bu çalışmanın sonucuna dayanarak, TH tedavisinin karaciğerde İR olayları sonucu oluşabilecek serbest radikal aracılı hasarı önleyerek, morbidite ve mortaliteyi azaltabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Karaciğer, iskemi reperfüzyon, Tirofiban Hidroklorid, antioksidanlar

ABSTRACT

Background and Aim: We aimed to determine the liver ischemia-reperfusion (IR) damage via some biochemical and hystopathological parameters and aimed to determine the effects of tirofiban hydrochloride (TH), an inhibitor of glycoprotein IIb-IIIa, on the changes of these parameters in this study.

Methods: Forty-five minutes of ischemia and 60 minutes of reperfusion at liver, portal vein, hepatic artery and biliary tract of Wistar Albino rats were performed. Intraperitoneal TH was applied to rats in a group 30 minutes before the ischemia and to another group 30 minutes before reperfusion. The rats were anesthetized and decapitated at the end of the study to obtain blood and tissue samples.

Results: Serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and lactate dehydrogenase (LDH) were analyzed to evaluate the liver functions. Catalase, superoxide dismutase (SOD), and glutathione levels were analyzed in liver tissue samples. Liver tissue samples were also analyzed under light microscope hystopathologically after stained with hematoxylin eosin. Serum AST, ALT, LDH levels were elevated in IR group, but a statistically significant decrease in these levels were detected in the groups TH applied. Decreases were detected in tissue catalase, SOD, and GSH analysis. Antioxidant values were decreased in IR groups with statistically significant differences. At the other hand antioxidant values were elevated in TH groups compared with IR groups. Hepatocellular damage as a marker of hystopathologic IR damage was significantly lower after TH application.

Conclusion: As a result of this study, it is possible to suggest that, TH treatment can reduce the mortality and morbidity risks by preventing the liver from free radical damages after ischemia-reperfusion disorders.

Keywords: Liver, ischemia reperfusion, tirofiban hydrochloride, antioxidants

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi reperfüzyon, hücre ve doku seviyesinde hasar ile sonlanan olaylar serisidir. İskemi, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının sağlanamaması ve ortaya çıkan artık ürünlerin dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması olarak tanımlanır (1). Reperfüzyon ise, iskemik dokudaki kan dolaşımının yeniden oluşturulmasıdır (1). Damar yatağındaki kan akımının azalması ile oluşan iskemi, en sık görülen hücre hasar şeklidir. İskemi sonucu hücrede protein sentezi, hücre membranı, hücrenin genetik elemanları ve oksidatif fosforilasyon hasarlanmasına bağlı pek çok histolojik ve biyokimsyasal değişiklikler meydana gelmektedir. Organ yada dokunun tekrar oksijenlenmesi, yani reperfüzyon ile oluşan hasar, daha da artmaktadır (2).

İR tıbbın bir çok alanında karşılaşılan bir olaydır. Travma, organ transplantasyonu, miyokard infarktüsü, inme, şok, yanık, sepsis ve daha bir çok klinik durumda iskemi reperfüzyon hasarı görülmesine rağmen, gelişim süreci tartışmaları devam etmektedir. İR hasarı, farklı organlarda farklı biçimde ortaya çıkmaktadır. Karaciğer cerrahisinin morbiditesini etkileyen en önemli mekanizma karaciğer iskemisidir. Transplantasyonda, rezeksiyonda ve kanama olgularının kontrolünde hepatic pedikül blokajı (pringle manevrası) yaygın olarak kullanılmaktadır.

TH, Glikoprotein IIb/IIIa inhibisyonu yaparak trombosit agregasyonunu önlemektedir. Klinikte miyokard enfarktüsünde kullanımı mevcuttur. Bu çalışmada TH' in karaciğer İR hasarı üzerindeki koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi

İskemi; kan akımının azalmasına bağlı olarak organ ve dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu, oksijen ve diğer metabolitlerin dokuya ulaşamaması anlamına gelir. Toksik metabolitlerin birikimi sonucu hücre ölümü meydana gelmektedir. Dokunun oksijen ihtiyacının tekrar karşılanması ve toksik etkilerin azalması için hücreye yeniden kan akımının sağlanması gerekmektedir. Reperfüzyon olarak tanımlanan bu durum, dokuda paradoksal bir hasar oluşturmaktadır (3). Reperfüzyona bağlı doku hasarında, ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin rolü büyüktür. Proteinler, nükleik asitler, zar lipitleri deoksiribonükleik asit molekülleri reperfüzyon hasarına oldukça duyarlıdır (4).

Karaciğerde hepatik arter ve portal venin klemplenmesi pringle manevrası olarak adlandırılır. Geniş karaciğer yaralanmalarında, transplantasyonda ve karaciğer rezeksiyonlarında kanama kontrolü sağlamak için uygulanmaktadır. Yapılan karaciğer rezeksiyonlarında pringle manevrasının 90 dakikaya kadar yapılabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (5).

İskemi süresinde, kan akımının kesilmesi ile dokuda metabolik ve yapısal değişiklikler oluşur. Hücresel düzeyde oksidatif fosforilasyon azalır, adenosin trifosfat ve kreatinin gibi yüksek enerjili fosfat düzeyleri azalır (6). Enerji depoları boşalır ve Na⁺ K⁺- ATPaz pompası inhibe olarak hücre içine Na⁺ ve Ca⁺⁺ iyonları birikir (7). Ca⁺⁺ iyon artışına bağlı hücrede sitotoksik etkiler görülür (8).

İR hasarının fizyopatolojisi, birbirleriyle ilişkili bir dizi hücresel ve humoral olaylar serisinden oluşmaktadır (9,10).

Özellikle;

- Serbest Oksijen Radikalleri
- Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL)
- Kompleman sistemi
- Endotel hücreleri olmak üzere, dört ana faktör İR hasarının nedenleri arasında yer almaktadır.

2.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri

Elektronlar atom veya molekül içinde sıklıkla eşlenmiş olarak bulunurlar. Eşlenmemiş elektron taşıyan atom veya moleküllere serbest radikal denmektedir. Mevcut halde reaktif olmayan olan bu radikaller elektron kaybı ya da kazancı ile reaktif hale gelirler (11).

Moleküler oksijen (O_2), iki adet eşlenmemiş elektron içeren biradikal moleküldür. Biyolojik sistemlerle alakalı serbest radikaller şunlardır (12);

- Süperoksit anyonu (O_2^-)
- Hidroksil radikali (OH^-)
- Peroksil radikali (HO_2)
- Singlet oksijen (1O_2)
- Nitrik oksit (NO^-)

Süperoksit radikali, oksijene bir elektronun eklenmesi ile oluşur. Süperoksit dismutaz (SOD) tarafından Hidrojen peroksit (H_2O_2) 'e indirgenir. H_2O_2 , glutatyon peroksidaz veya katalaz tarafından toksik olmayan ürünlere dönüştürülür. Metal iyonlar varlığında ise, toksik hidroksil (OH^-) radikaline dönüşür (13).

2.1.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^-)

Süperoksit radikali moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle oluşur. Süperoksit radikali direk toksik etkili değildir. Geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi ve hidrojen peroksit kaynağı olması temel önemini oluşturur. Süperoksit radikali hem indirgeyici hem de oksitleyici özelliğe sahiptir (13).

e⁻

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

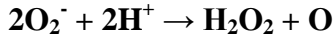
$Sitc(Fe_3^+) + O_2^- \rightarrow O_2 + Sitc(Fe_2^+)$ reaksiyonunda olduğu gibi indirgeyici olarak görev alır.

Süperoksit radikali epinefrin oksidasyonunda görev alarak bir elektron alır ve hidrojen peroksit'e (H₂O₂) indirgenir. Süperoksit radikali Nitrik oksit (NO) ile birleşerek reaktif oksijen türü olan peroksinitrit'i (ONOO⁻) oluşturur. Peroksinitrit, nitrit (NO₂) ve nitrat (NO₃) gibi toksik ürünlere dönüşür (14,15).

2.1.1.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

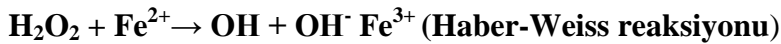
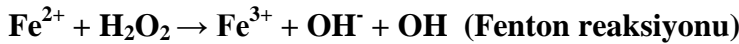
Hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksidin etraf moleküllerden bir elektron almasıyla ya da moleküler oksijenin etraf moleküllerden iki elektron almasıyla oluşan peroksidin iki proton (H) ile birleşmesiyle oluşur. Esas oluşumu peroksidin (O₂⁻) dismutasyonu ile olmaktadır (16,17).

SOD



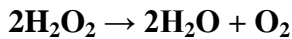
Bu reaksiyon süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenir (16-20).

H₂O₂, geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu ile, süperoksit radikalının varlığında Haber-Weiss reaksiyonu ile, reaktif ve hasar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil (OH⁻) radikalini oluşturur (17,21,22).



H₂O₂ katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından toksik olmayan ürünlere çevrilir (23).

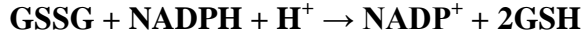
CAT



GSH-Px



GSH-REDÜKTAZ



2.1.1.3. Hidroksil Radikali (OH[•])

Hidrojen peroksit' in Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarına uğraması sonucu hidroksil radikali oluşur. Oldukça reaktif bir oksidan radikaldir. Hidroksi radikali oluştuğu yerde yeni radikaller meydana getirerek, dokuda şiddetli hasara yol açmaktadır (24,25).

Serbest radikallerin hücrel hasarı, üç reaksiyon zemininde gelişmektedir;

- **Lipit peroksidasyonu:** Çok zincirli doymamış yağ asitlerinden köken alan hidroperoksitler, hücrel 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 (26,27).
- **Proteinlerin oksidatif modifikasyonu:** Serbest oksijen radikalleri, aminoasit yan zincirlerinde oksidasyon yaratarak, protein-protein bağlarını oluşturur. Proteinlerdeki ana zincirleri okside ederek proteinleri parçalar. Hücrel düzeyde fonksiyon gösteren enzimlerin yapısında bozulmalar oluşturur (26,27).
- **DNA hasarı:** Serbest oksijen radikalleri DNA'da timin bazı ile etkileşerek tek zincir kırılmalarına neden olur. Hücrede enerji kaybı olur ve nekroz şeklinde ölüm gerçekleşir (28,29).

2.1.2. Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL)

Yapılan çalışmalarda nötrofillerin, reperfüzyonda mikrovasküler permabilitedeki artıştan primer sorumlu olduğu gösterilmiştir (30).

PMNL yüksek miktarda SOR üretmektedir. İR hasarında PMNL' nin rol aldığı mekanizmalar şu şekildedir (31):

- Vasküler permabilitede artış
- SOR ve sitotoksik enzim salınımı
- Mikrovasküler oklüzyon
- Sitokin salınımı

Lökositlerin aktivasyonu adhezyon molekülleri tarafından sağlanmaktadır. Selektinler adhezyon molekülü olarak görev alır. PMNL' lerde yer alan P selektin, glikoprotein 1 (PSGL-1) adlı reseptörü ile etkileşime girer ve düşük afiniteli lökosit endotel bağlantısını oluşturur. Beta 2 integrinler (CD11a/CD18 ve CD11b/CD18), lökosit adhezyon ve agregasyonunu geliştirmek üzere endotelde yer alan intersellüler adhezyon molekülü 1 (ICAM 1) ile etkileşime girer. Trombosit endotel hücresi adhezyon molekülü 1 (ICAM 1) ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim sonucu lökosit transmigrasyonu gerçekleşir (32,33). Aktive lökositlerin damar dışına çıkması ile kemotaksis başlar. Aktif hale getirilmiş lökositler, şu mekanizmalar sayesinde dokuda yanıt başlatırlar (33,34).

- Fosfolipaz A2 aktivasyonu
- SOR üretimi
- Lizozomal enzim salınımı

Bu ürünler sayesinde enflamatuar uyarının etkisi güçlenir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmak için, bu enflamatuar yanıt sonucu ödem, tromboz, mikrovasküler permabilitede artış ve parankim hücre ölümü gerçekleşir. İşlev sonrası lökositler apoptoza uğrayarak ortamdan uzaklaştırılır (33).

2.1.3. Komplemanın Rolü

Kompleman sisteminin aktivasyonu sonucu, C3a, C5a, İC3b, C5b-9 olarak adlandırılan proinflamatuvar komponentler oluşur. Lökosit aktivasyonu anaflatoksin olan C3a ve C5a tarafından sağlanmaktadır. C5b-9 endotelde IL-1a, IL8 ve MCP1

salgısını uyararak lökosit aktivasyonunu ve kemotaksisini artırır. Kompleman tarafından sentezi uyarılan lökosit adhezyon molekülleri şunlardır (35-37);

- Vasküler adhezyon molekülü 1 (VCAM-1)
- İntersellüler hücre molekülü 1 (ICAM-1)
- E selektin
- P selektin

2.1.4. Endotelin Rolü

İR hasarı oluşumunda endotel hücreleri önemli role sahiptir. Oluşan oksidatif stres, endotel hücre aktivasyonuna ve bu hücrelerde işlev bozukluğuna yol açar. Endotel tarafından mikrovasküler homeostazı sağlayan endotelin (ET) ve nitrik oksit (NO) üretilir. NO, arteryel dolaşımında ET'in vazokonstrüktör etkisini inhibe ederek tersine çevirir. Venöz sistemde bunun tam tersi söz konusudur. İR hasarında endotelin etkisi baskın gelir ve sonuçta arterlerde vazokonstriksiyon, venlerde ise vazodilatasyon oluşur.

Endotel hücrelerinin oksidatif stresi, komplemanın aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu durum lökosit adhezyon moleküllerinin ortamda artmasına neden olur. Lökositlerin endotelle etkileşimi sonucu lökosit transmigrasyonu başlamış olur (34,38).

2.2. Antioksidanlar

Serbest oksijen radikallerinin meydana gelişini ve oluşturdukları hasarı önlemede organizmayı koruyan ‘‘ antioksidan savunma mekanizması’’ vardır. Bu sistem dört ayrı şekilde çalışmaktadır.

- Serbest oksijen radikallerini tutma, yok etme (süpürücü etki) (39,40).
- Serbest oksijen radikallerine hidrojen aktararak etkisizleştirme (41).
- Serbest oksijen radikallerini bağlayıp, zincirlerini kırarak etkisiz hale getirmek (42).
- Serbest oksijen radikallerinin oluşturdukları hasarı onarmak (43).

2.2.1 Endojen Antioksidanlar

2.2.1.1. Enzim Olan Endojen Antioksidanlar (44)

Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz, Hidroperoksidaz, Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), Glutatyon S – Transferaz (GST), Mitokondriyal sitokrom oksidaz.

2.2.1.2. Enzim Olmayan Endojen Antioksidanlar (45)

Transferrin, miyoglobilin, serüloplazmin, hemoglobin, melatonin, ferritin, bilirubin, sistein, metiyonin, urat, glutatyon, albumin, laktoferrin.

2.2.2. Eksojen Antioksidanlar

2.2.2.1. Vitamin Aksojen Antioksidanlar

Alfa tokoferol (E vitamini), Askorbik asit, Beta karoten, Folik asit.

2.2.2.2. İlaç Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar (46)

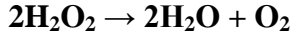
- NADPH, oksidaz inhibitörleri, (lokal anestezikler, adenozin kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar)
- Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, tungsten)
- Rekombinant süperoksit dismutaz
- Trolox C (vitamin C analogu)
- Demir redoks döngüsü inhibitörleri
- Barbitüratlar
- Demir şelatörleri
- Sitokinler (TNF ve IL-1)

2.2.3. Katalaz

Katalaz vücutta doğal olarak oluşmaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD) ile kombine şekilde etkimektedir. Esas olarak peroksizomlarda, daha az olarak da

sitozolde ve mikrozomal yapıda bulunur. H_2O_2 ' i parçalayarak su ve oksijen oluşturur. Böylelikle hidroksil serbest radikali ($OH\cdot$) oluşumu önlenmiş olur (47).

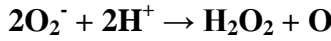
CAT



2.2.4. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Dokuları serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerinden koruyan bir metalloenzimdir. Bakır-çinko ve mangan içeren izoenzimleri vardır. Süperoksit radikalının hidrojen peroksit'e indirgenmesini sağlar. Bu reaksiyonda hem oksidan hem de antioksidan olarak rol oynar. Serbet oksijen radikallerinin oluşturduğu hasara karşı SOD, katalaz ve glutatyon enzim gruplarıyla birlikte çalışan bir koruyucu mekanizmadır. Oluşan hidrojen peroksit, glutatyon ve katalaz tarafından su ve oksijene indirgenir. SOD'ın, aerobik dokuları, süperoksitin zararlı etkilerinden koruduğu düşünülmektedir (47).

SOD



2.2.5. Glutatyon

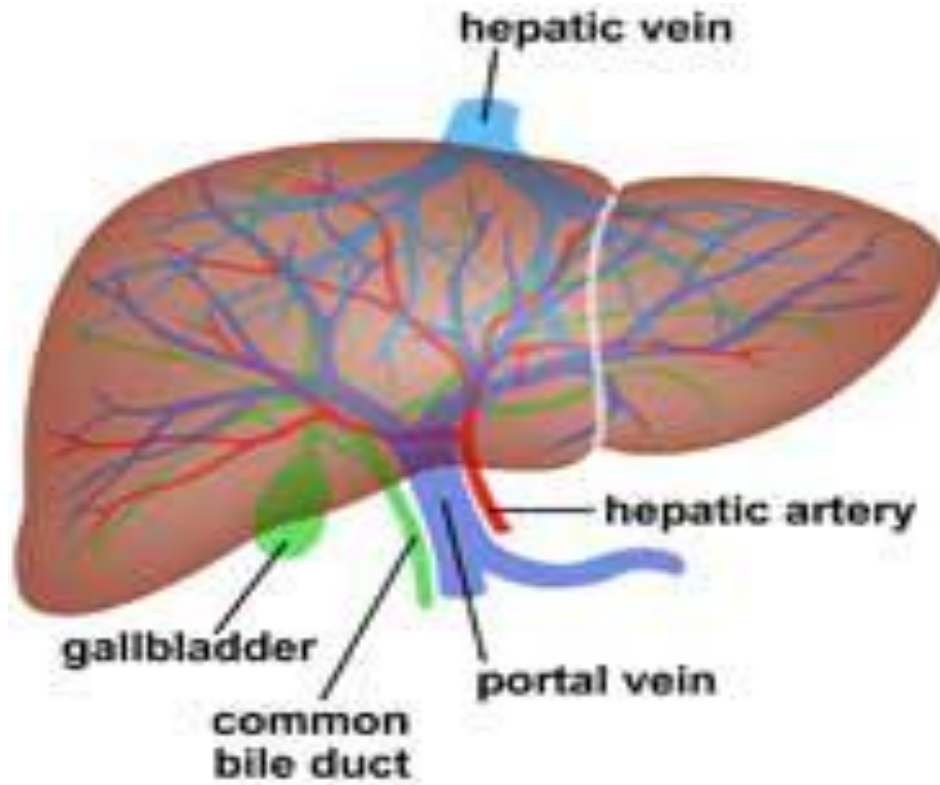
Tripeptit yapıdan olan ve birçok hücrede bulunabilen bir antioksidandır. Glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşur. Glutatyon hücre zarında aminoasitlerin taşınmasında görev alır. Koenzim olarak enzim yapısına katılır. Proteinlerin sülfidril gruplarını koruyarak, toksik maddelerin etkilerinin ortadan kaldırılmasında görev alır (48).

2.3. Karaciğer

2.3.1 Karaciğer Anatomisi

Karaciğer vücudun en büyük parankimal organıdır. Midklaviiküler hatta 4. İnterkostal aralıktan kosta kavsine kadar uzanır. Kişilerin yaş ve boyutuna göre değişmekle beraber hacmi ortalama 1500 ml'dir. Yetişkin bir insanda karaciğer

toplam vücut ağırlığının % 2-3 'ünü oluşturmasına karşın, organdan geçen kan, dakikada 1400-1500 ml olup, dolaşımdaki kanın % 25- 30 'u kadardır. Karaciğere kanın % 70-80 'i portal venden, geri kalan kısmı hepatic arterden gelmektedir. Karaciğer hilusundan portal ven, hepatic arter ve sinirler girer, sağ ve sol hepatic kanallar ile lenfatikler çıkar. Karaciğer, diyafragma ve arka yüzde, batınla temas eden bölüm dışında periton ile örtülüdür (49).



Resim 1: KC vasküler yapısı (portal hilus) (49)

2.3.2. Karaciğer Histolojisi

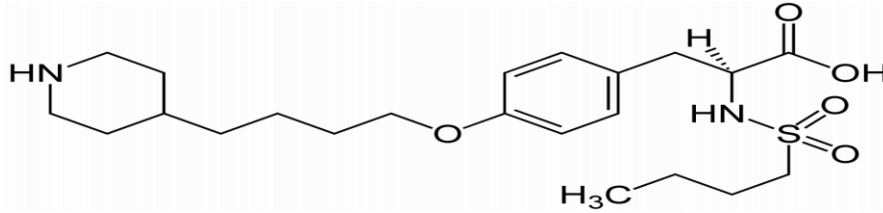
Karaciğer hücrelerinin % 65 'i hepatositlerden meydana gelmektedir. Ayrıca Kupffer denilen sinozoidal makrofajlar ve presinozoidal yıldızlı hücreler (ito hücreleri) bulunmaktadır.

Karaciğerin lobüler yapısı 3 gruba ayrılır. Köşelerde Glisson üçgeni, ortada vena santralisten oluşan altıgen şekilli klasik karaciğer lobülü; üç klasik karaciğer lobülünün vena santralislerinin birleşmesiyle oluşan portal lobül ve interlobüler venlerden kanlanan hücre gruplarından oluşan asinüs (50)

2.4. Tirofiban Hidroklorid

Tirofiban, trombosit agregasyonunda yer alan majör trombosit yüzey reseptörü olan Glikoprotein IIb/IIIa reseptörlerini reversibl olarak antagonize eden bir non-peptit ajandır. Bu etkisi ile platelet agregasyonunun en temel aşaması olan, fibrinojen ağı oluşumunu bloke eder. Bir çok randomize kontrollü çalışmada tirofiban'ın platelet agregasyonunu yüksek oranda inhibe ettiği ve arteryel tromboz oluşumunu önlediği gösterilmiştir (51,52).

Tirofiban'ın yarı ömrü yaklaşık iki saattir. Tirofiban plazma proteinlerine pek bağlanmaz. Plazma konsantrasyonu sonrasında büyük ölçüde böbreklerden atılarak temizlenir. Sağlıklı erişkinlerde tirofibanın plazma klirensi 213-214 ml/dk arasındadır. Renal plazma klirensinin yaklaşık % 40-70' idir.



Şekil 1 : Tirofiban'ın molekül yapısı



Resim 2 : Ticari Form

GP IIb/IIIa reseptör inhibitörlerinin kullanımı için tek mutlak kontrendikasyon aktif kanamadır. Kanama daha çok mukokütanöz bölgelerde

olabilir. Özellikle en korkulan komplikasyon intrakraniyal hemorajidir. GP IIb/IIIa reseptör inhibitörlerinin bir diğer yan etkisi ise trombositopenidir.

Tirofiban (AGGRASTAT Merck&Co Inc) infüzyon şeklinde, kardioloji kliniklerinde, koroner arter hastalığı olan hastalarda anti-koagulan olarak medikal tedavide çok sık kullanılmaktadır. Özellikle akut koroner sendromlu, myokard infarktüsülü ve stent uygulanmış hastalarda kullanımı endikedir. Bir çok kardiak çalışmada (PRISM RESTORE) etkinliği kanıtlanmıştır (52).

3. MATERİYAL VE METOD

3.1 Hayvanlar ve Tedavileri

Çalışmamıza Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik kurul izni alınarak başlanmıştır. Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi (MKÜ-DAM) laboratuvarında yapılan çalışmamızda ,ağırlıkları 180-300 gr arasında değişen 32 adet Wistar Albino cinsi erişkin erkek rat kullanıldı. Ratlar rastlantısal olarak 4 gruba ayrıldı.

Bütün ratlar deney öncesi sabit çevre koşulları altında standart rat yemi ve su ile beslenerek 7 gün boyunca bekletilip ortama adapte olmaları sağlandı. 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 pavidon iyot ile silinerek cilt antisepsisi uygulandı(Resim 3). Batın orta hattın laparotomi yapıldı (Resim 4).

Grup A: Hayvanlarda kontrol amacı ile portal hilus eksplore edildi (Resim 5). 90 dakika sonra intrakardiyak kan ve karaciğer doku örneği alındı (Resim 6).

Grup B: (İskemi/Reperfüzyon grubu). Hayvanlar 45 dakika iskemi, ardından 60 dakika reperfüzyona tabi tutuldu (Resim 7). İşlem sonrası intrakardiyak kan ve karaciğer doku örneği alındı.

Grup C: Hayvanlara iskemide 30 dakika önce TH verildi. 30 dakika iskemi ve 60 dk reperfüzyon sonrası kan ve karaciğer doku örneği alındı. Uygulamalar sonrası bekleme süresinde batın ipek suture ile kapatıldı (Resim 8).

Grup D: Hayvanlara iskemi uygulanıp, reperfüzyonun 30 dk öncesinde tirofiban hidroklorid intraperitoneal olarak verildi. 60 dakika reperfüzyon sonrası, kan ve karaciğer doku örneği alındı.

Rezeke edilen karaciğer dokusu alüminyum folyo içine sarılarak – 85 derecede muhafaza edildi. Dondurulan örnekler oda ısısında çözüldükten sonra katalaz, SOD, GSH aktiviteleri ölçüldü. Alınan kan örneği 4000 rpm’ de 5 dk santrifüj edildi. Plazma – 20 derecede muhafaza edildi. Örnekler oda ısısında çözüldükten sonra AST, ALT ve LDH değerleri ölçüldü.

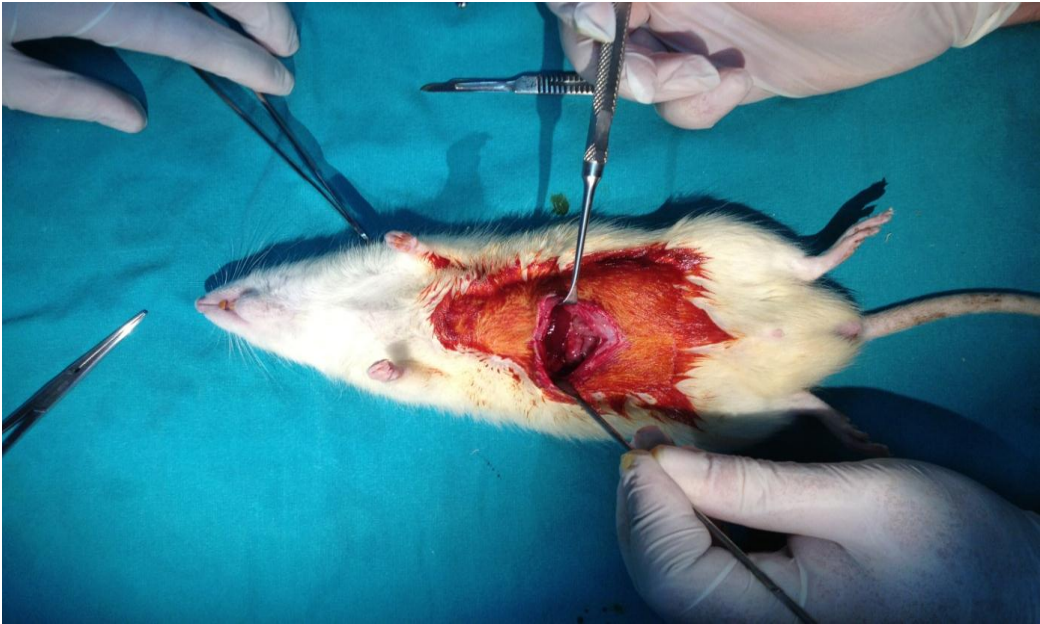
Işık mikroskobu incelemesi için her karaciğerin sağ lobu ayrıldı ve doku parçaları %10’ luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Dokuların birer kesit yüzeyi örneklendikten sonra parafine gömüldü, karaciğer dokularının tüm yüzeyini gösteren 4 mikrometre kalınlıkta kesitler alındı ve hematoksiyen-eozin (HE) ile boyandı. Karaciğer dokusunda Sözen ve ark.larının çalışmasına benzer şekilde hepatositlerde vakuolizasyon, hipereozinofili, hepatositler arası bağlantılar, kanama, nekroz ve polimorf nüveli lökosit infiltrasyonu değerlendirildi ve patolojik olarak skorlandı (53) (Tablo 1).

Tablo 1: Hepatik hasar gradelemesi

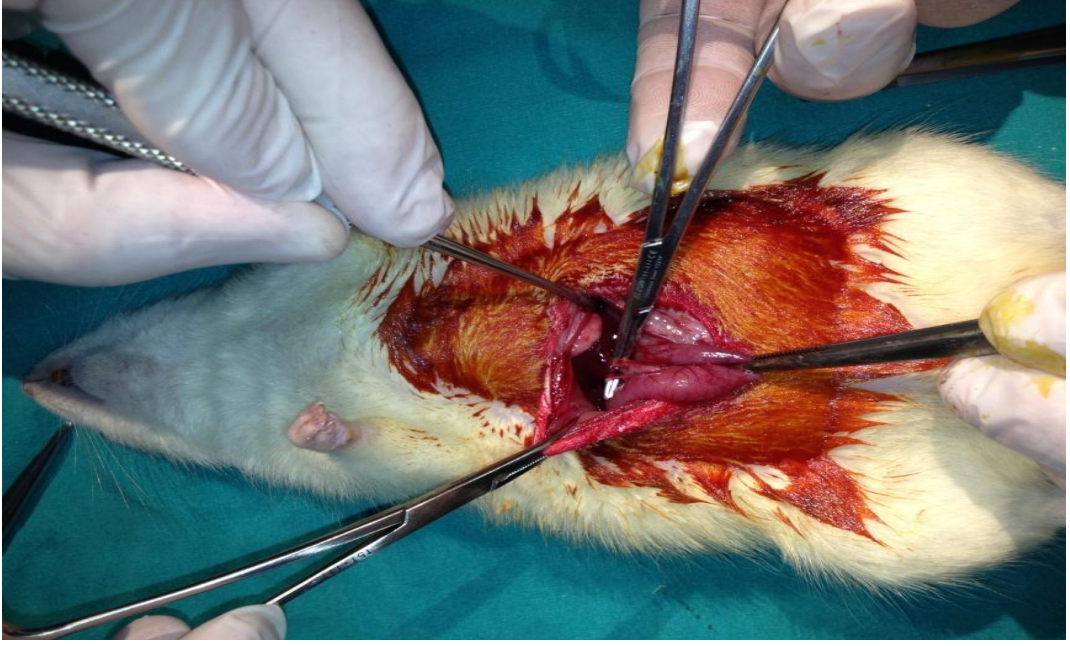
GRADE 0	Hafif ya da hiç hasar yok
GRADE 1	Hafif hasar; fokal nükleer piknoz ve sitoplazmik vakuolizasyon
GRADE 2	Orta-ağır hasar; yaygın nükleer piknoz, sitoplazmik hipereozinofili ve intersellüler köprü kaybı
GRADE 3	Ağır nekroz; hepatic kordonlarda ayrılma, hemoraji ve nötrofil infiltrasyonu



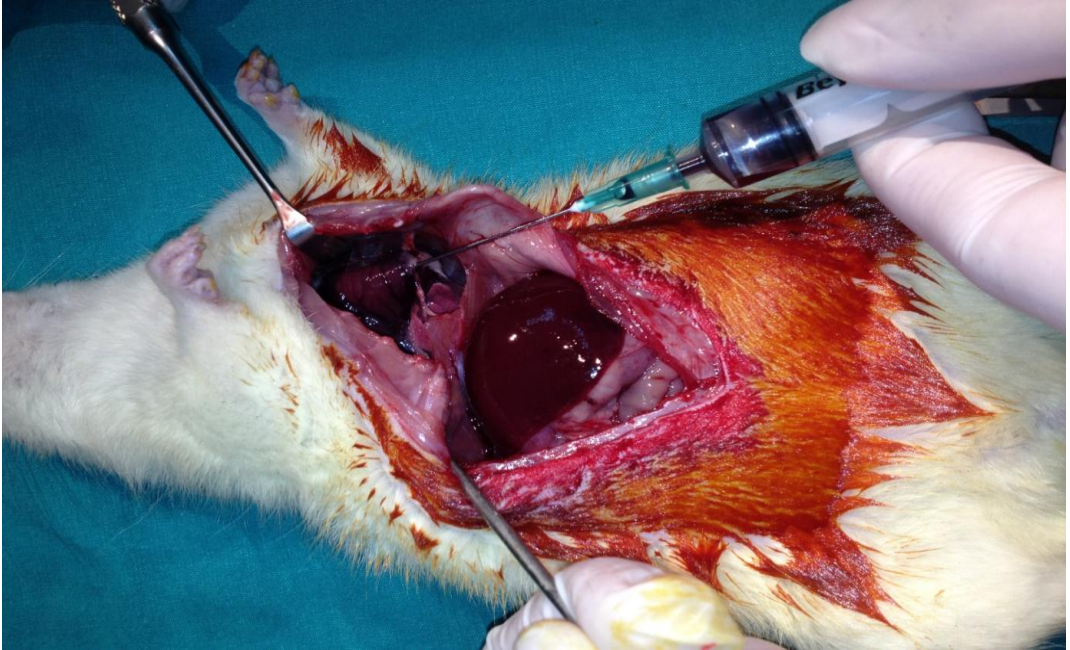
Resim 3: Pavidon iyod ile cilt antisepsisi



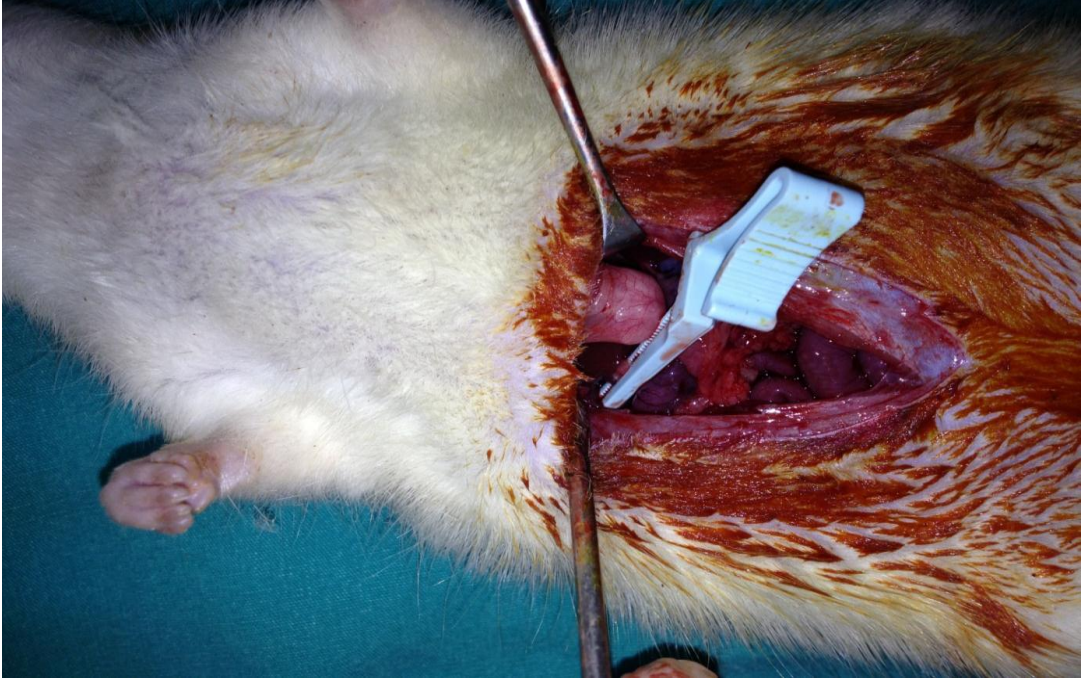
Resim 4: Laparotomi



Resim 5: Portal hilus eksplorasyonu



Resim 6: İntrakardiyak kan alınması



Resim 7: Portal hilus blokajı



Resim 8 : Batın kapama

3.2. Biyokimya

3.2.1 Dokularda Homojenizasyon İşlemleri

3.2.1.1 Dokularının Çıkarılarak Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması:

Jelli biyokimya tüpüne alınan kan örnekleri 4000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında oluşan serumlar daha sonra çalışılmak üzere -20 derecede saklandı. Serum örneklerinden AST, ALT ve LDH parametreleri Biyokimya otoanalizöründe (Cobas Integra 800, Roche) spektrofotometrik yöntem ile çalışıldı. Dokular hemen soğuk izotonik su ile yıkandı ve alüminyum folyeye sarılıp -85°C derin dondurucuda biyokimyasal testlerin yapılacağı zamana kadar saklandı.

3.2.1.2 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. Tüm çalışmalarda bu tampon kullanıldı.

3.2.1.3 Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin Hazırlanması:

Yaş ağırlıkları 0,5-0,9 gr olarak ayarlanan dokular, 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 15 katı olacak şekilde tampon ilave edildi. Tekrar homojenize edilerek süre 3 dakikaya tamamlandı. Homojenatın ısı artırılmadan ependorf tüplerine aktarıldı ve tüplerin üzeri numaralandı. Yaş doku ağırlığı ve ilave edilen tampon miktarları kaydedildi.

Homojenatlar 3220 rpm / 30 dakika +6 °C soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlardan CAT, GSH ve protein tayinleri yapıldı. Süpernatant 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) ile (158) vortexlenip cam tüpte 3220 rpm / 40 dakika +4°C' de santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından protein ve SOD enzim aktivite tayini yapıldı.

3.2.1.4. Ekstraksiyonlu ve Ekstraksiyonsuz numunelerde protein tayini (Lowry Metodu):

3.2.1.4.1. Deneyin Prensibi

Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşmaktadır. Bu kompleks 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 ilâve edilmeli ve vortekslenmelidir. Bu uygulama ile fosfomolibdat-fosfotungstat (folin) reaktifi parçalanmadan önce redüklenme olayı gerçekleşir.

3.2.1.4.2. Kullanılan Kimyasallar:

CuSO_4 , Na_3Sitr at, Na_2CO_3 , NaOH , Phenol-Folin-Ciocalteu reaktifi.

Kullanılan reaktifler:

A reaktifi: 0.5 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 1 gr Na_3Sitr at (susuz) 100 mL distile suda çözülür.

B reaktifi: 20.0 gr Na_2CO_3 ve 4 gr NaOH , 1 L distile suda çözülür.

C reaktifi: 50.0 mL B çözeltisine 1 mL A çözeltisi ilave edilir (Taze hazırlanmalıdır). A ve B reaktifleri hazırlandıktan sonra, numune sayısına göre C reaktifi hazırlanıp bekletilmeden kullanılmalıdır.

D reaktifi: (Phenol-Folin-Ciocalteu reaktifi): 1500 mL' lik bir balon jojeye 100 gr sodyum tungstat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 gr sodyum molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 700 mL distile su, 50 mL %85 fosforik asitve 100 mL konsantre hidroklorik asit (HCl) konulur. 10 saat geri soğutucu altında yavaşça ısıtılır.

Soğuduktan sonra üzerine 100 gr lityum sülfat, 50 mL distile su ve 5 damla brom ilave edilir (reaktifler asla teneffüs edilmemelidir). 15 dakika kaynatılarak bromun fazlası uçurulur (bu kaynatma havalandırılmalı bir yerde ağzı açık olarak yapılır). Karışım soğuduktan sonra 1 L' lik balon jøjeye aktarılır ve distile su ile 1 L' ye hacim tamamlanır.

Reaktif koyu renkli cam şişede 1-2 yıl oda ısısında muhafaza edilebilir. Elde edilen reaktifin rengi normalde sarı olur. Eğer yeşil renk oluşmuş ise reaktif bozulmuş demektir. Protein ölçümünde kullanılırken 1 / 1 (v / v) oranında distile su ile seyreltilmelidir. Bu metod biüre metodunun geliştirilmiş şekli olup daha hassastır. Buna Lowry metodu denilir.

3.2.1.4.3. Deneyin Yapılışı:

Ağzı kapanan mika 5 mL tüplere,

Tablo 2: Lowry metodu

Lowry Metodu	KÖR tüpü	NUMUNE tüpü
Numune (µL)	-	10
Distile su (µL)	500	490
C reaktifi (µL)	2500	2500
D reaktifi (µL)	250	250

Karıştırılır, 10 dakika beklenir.

Tüpler vortekslenir, 20-30 dakika oda ısısında inkübe edilir.

700 nm' de numunenin ve standardın absorbansı köre karşı okunur.

3.2.1.4.4. Hesabı

$$\text{Protein (mg/mL)} = \text{grafikten okunan değer} \times F$$

$$F (\text{faktör}) = \text{standart hacmi (0.5 mL)} / \text{numune hacmi (0.010mL)} = 50$$

Faktör, kullanılan numunenin miktarına göre değişir. Kullanılan numunenin miktar değişikliği, distile su hacminde azaltma yapılarak tüplere pipetlenir. Yani standart hacim (numune + distile su) 500 µL' dir.

3.2.1.4.5 Protein Standart Grafiğinin Çizimi

Tablo 3: Protein standart grafiğinin çizimi

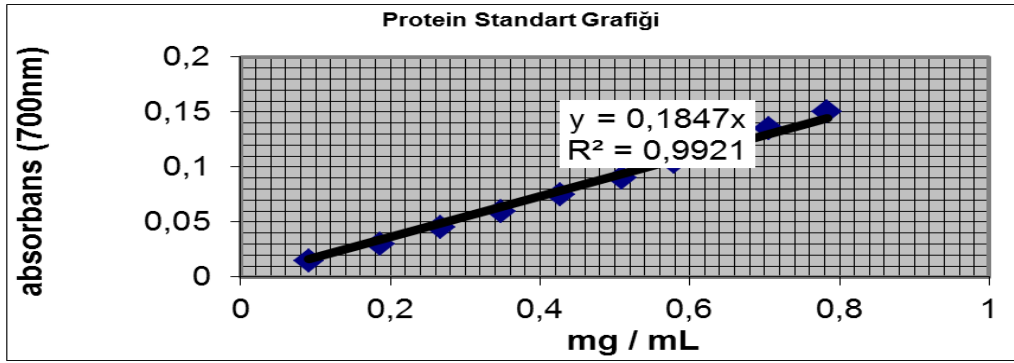
Tüp numaraları (proplen tüpler)	KÖ R	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Standart protein çözeltisi (mL)	-	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50
Distile su (mL)	0.50	0.45	0.40	0.35	0.30	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	-
C reaktifi (mL)	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
D reaktifi (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

Alt-üst ederek karıştırılır, 10 dakika oda ısısında beklenir.

Ağız kapalı olarak karıştırılır, 20-30 dakika 25 °C’ de bekletilir ve 700 nm’ de köre karşı okunur. Daha sonra OD – konsantrasyon (mg protein/mL) grafiği çizilir.

3.2.1.4.6 Protein Standart Grafiği

Şekil 2: Protein standart grafiği



3.2.2. Biokimyasal Analizler

3.2.2.1. Katalaz (CAT)

Katalaz düzeyinin saptanması için Aebi yöntemi kullanıldı (54). Hidrojen peroksit (H_2O_2) 240 nm’de maksimum düzeyde absorbans verir. Deney ortamına ilave edilen H_2O_2 , katalaz tarafından su ve oksijene parçalanmakta, bu ise kendini ultraviyole spektrumda absorbans azalması şeklinde kendini göstermektedir. Absorbanstaki bu azalma kendini katalaz enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Kullanılan reaktifler :

- Fosfat tamponu (Ph 7,50Mm)
- H_2O_2 çözeltisi : Absorbansı 0,500 nm’ye tampon ile ayarlanmış olan H_2O_2 ‘ li fosfat tamponu olup; yaklaşık 300 mL Ph 7,50 Mm olan fosfat tamponu renkli kaba aktarılır.

Spektrofotometre fosfat tamponuna göre sıfırlanıp, renkli kabdaki tampona 10-20 µL hacimlerle H₂O₂ ilâve edilir.

Optik Dansite (OD) 0.500 nm oluncaya kadar devam edilir ve aralarda karıştırılır.

Deneyin yapılışı :

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

Tablo 4: CAT enzim aktivitesi çalışılması

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

Numune ilâvesi ile quartz küvetin ağzı bekletilmeden kapatılır ve hemen küvet alt-üst edilip absorban okunur (içinizden 10 kadar sayarak standardize ediniz). Absorbans azalması her 15 sn' de bir defa olmak üzere 5 dakika süre ile kaydedilir (Aktivite hızlı ilerliyorsa 10 sn' de bir kayıt yapılır. Lineer azalma tespit edilirse okuma bitirilebilir). Hesaplama 1 dakikalık lineer absorban azalmasının en yüksek (OD₁) ve en düşük (OD₂) değerleri esas alınır.

Hesaplama

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

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

3.2.2.2. Glutatyon

Dokudaki glutatyon tayini için modifiye Paglia ve arkadaşlarının yöntemi kullanıldı. Doku örnekleri homojenize edilip sentrifüj edildikten sonra süpernatant, NAH_2PO_4 ve DTNB çözeltisi ile karıştırılıp, oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildikten sonra örneklerin absorbanansı spektrofotometrede köre karşı 340 nm dalga boyunda ölçüldü. Lineer aktivite azalışının olduğu absorbanans aralığının 1 dakikası esas alınarak hesap yapıldı.

3.2.2.3. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) aktivitesi; Sun ve arkadaşlarının metoduna (55) ve Durak ve arkadaşlarının tariflediği modifikasyona (56) göre tayin metodu: ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır. Oluşan süperoksit radikalleri (O_2^-) ortamdaki NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbanans 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. Enzim bulunmayan (Kör) değer ile enzim bulunan numune absorbanans değerleri hesaba katılır.

Hesaplama:

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

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar doku için; U/mg protein, eritrosit için; U/gr Hb, plazma için; U/mL olarak ifade edilir.

Süperoksit dismutaz aktivitesinin hesaplanması:

- % İnhibisyon = $[\text{Absorbans kör (AK)} - \text{Absorbans numune(AN)}] / (\text{AK}) \times 100$
- % 50'lik inhibisyona 1 Ü denildiği için;

- %50 inhibisyon = (% İnhibisyon / 50) x 1 / 0.1 = Ü / mL = (AK-AN)/AK x 20 = Spesifik aktivite (SA)

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.

Deneyin yapılışı tabloda gösterilmiştir.

Tablo 5: Total-SOD deney metodu

Total-SOD DENEY METODU

Yarım hacim çalışılırsa

	Kör (mL)	Numune (mL)	Kör (µL)	Numune (µL)
ASSAY reaktifi	2.85	2.85	1425	1425
Ekstrakt (Etanol fazı)	-	0.10	-	50
Bidistile su	0.10	-	50	-
167 U/L XO	0.05	0.05	25	25
0.08 mM/L CuCl ₂	1	1	500	500

Kör tüpüne enzim ilâvesi ile tüp altüst edilir ve inkübasyon süresi başlatılır. 25 °C' de 20 dakika inkübasyon sonu hemen; ilavesi ile reaksiyon durdurulur. Distile suya karşı körden başlanarak numuneler 560 nm.' de okunur.

3.3. İstatiksel Analiz

Çalışma sonrası elde edilen veriler SPSS® paket programı (SPSS® 11.0 for Windows®) kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirildi. Kaydedilen verilerin ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanıp Anova (Analysis of Variences), Turkey HSD ve Duncan testleri ile değerlendirildi. $P < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Biokimyasal Bulgular

4.1.1. AST Değeri

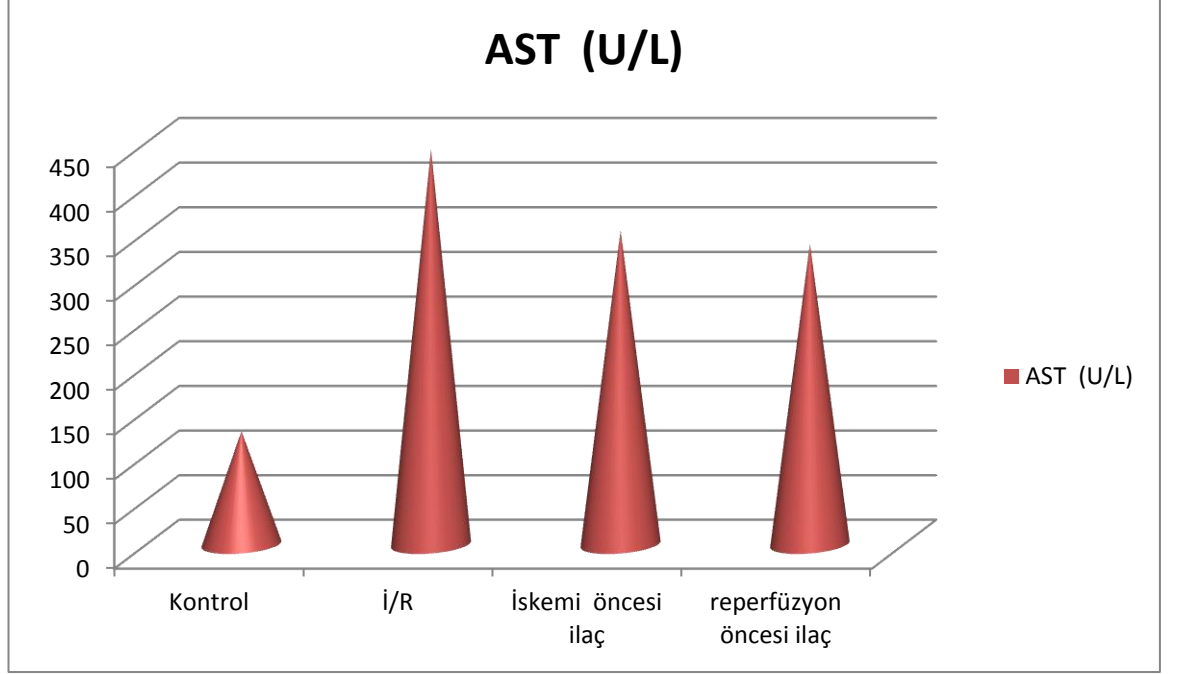
Gruplara ait AST sonuçları tablo ve grafikte gösterilmiştir.

Kontrol grubunda AST düzeyi 127 ± 28.75 U/L olarak çıktı. İR grubunda AST düzeyi artarak 443 ± 20.30 U/L, iskemi öncesi TH verilen grupta 352 ± 20.15 , reperfüzyon öncesi TH verilen grupta ise 337 ± 13.16 U/L olarak çıktı.

Tablo 6: Gruplara ait AST ortalama değerleri

RATLAR	AST (U/L)	STANDART SAPMA
Kontrol	127.25	± 28.75
İR	443.87	± 20.30
İskemi öncesi TH grubu	352.75	± 20.15
Reperfüzyon öncesi TH grubu	337.25	± 13.16

Şekil 3: Gruplara ait AST ortalama değerleri grafiği



İR grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p < 0.05$) bulunmuştur. İskemi öncesi ilaç verilen grupta AST düzeyi kontrol grubuna göre yüksek olmakla birlikte , İR grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel yönden anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır ($p < 0.05$). Aynı şekilde reperfüzyon öncesi ilaç verilen grupta AST değeri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. İR grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel yönden anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır ($p < 0.05$). İskemi öncesi ilaç verilen grup ile reperfüzyon öncesi ilaç verilen grup karşılaştırıldığında istatistiksel yönden anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$).

4.1.2. ALT Değeri

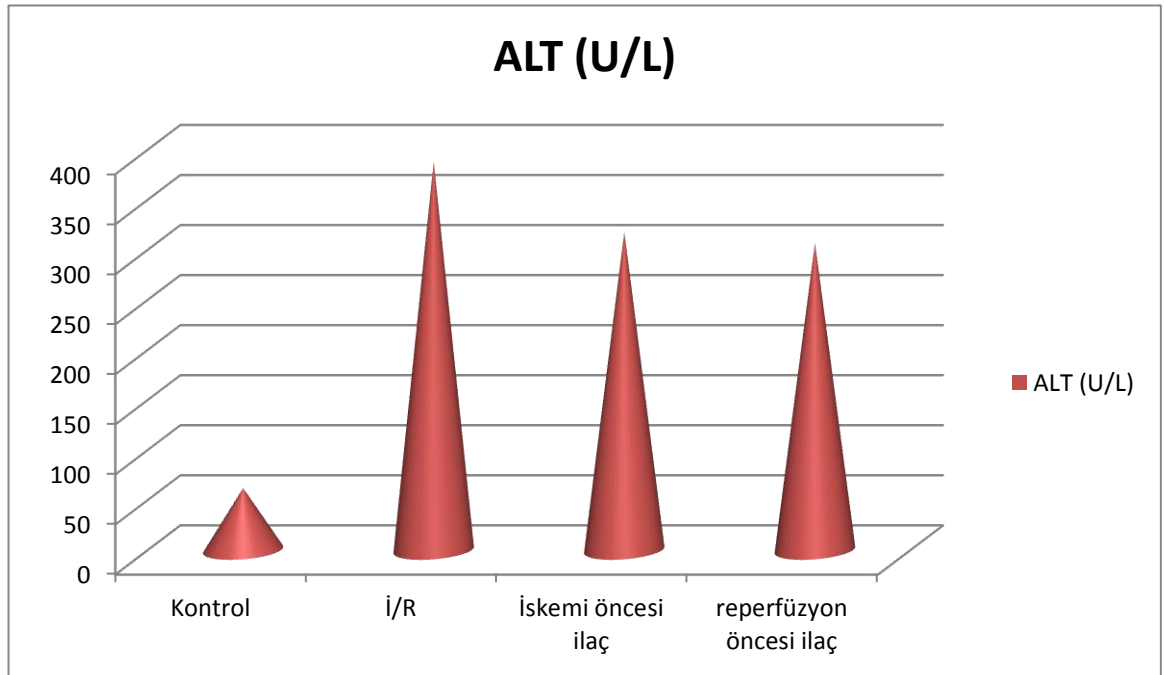
Gruplara ait ALT değeri tablo ve grafikte gösterilmiştir.

Kontrol grubunda ALT düzeyi 62 ± 10.08 U/L olarak ölçüldü. İR grubunda ALT düzeyi artarak 388 ± 20.38 U/L , iskemi öncesi ilaç verilen grupta 318 ± 20.39 U/L, reperfüzyon öncesi ilaç verilen grupta ise 307 ± 23.3 U/L olarak ölçüldü.

Tablo 7: Gruplara ait ALT ortalama değerleri

RATLAR	ALT (U/L)	STANDART SAPMA
Kontrol	62.50	\pm 10.08
İR	388.37	\pm 20.38
İskemi öncesi TH grubu	318.75	\pm 20.39
Reperfüzyon öncesi TH grubu	307.87	\pm 23.3

Şekil 4: Gruplara ait ALT ortalama değerleri grafiği



İskemi öncesi ilaç verilen grupta ALT düzeyi kontrol grubuna göre yüksek olmakla birlikte, İR grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel yönden anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır (p < 0.05). Aynı şekilde reperfüzyon öncesi ilaç verilen grupta ALT değeri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. İR grubu ile karşılaştırıldığında ALT düzeyi istatistiksel yönden anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır (p< 0.05). İskemi öncesi ilaç verilen grup ile reperfüzyon öncesi ilaç verilen grup karşılaştırıldığında istatistiksel yönden anlamlı bir fark bulunamamıştır (p> 0.05).

4.1.3. LDH Değeri

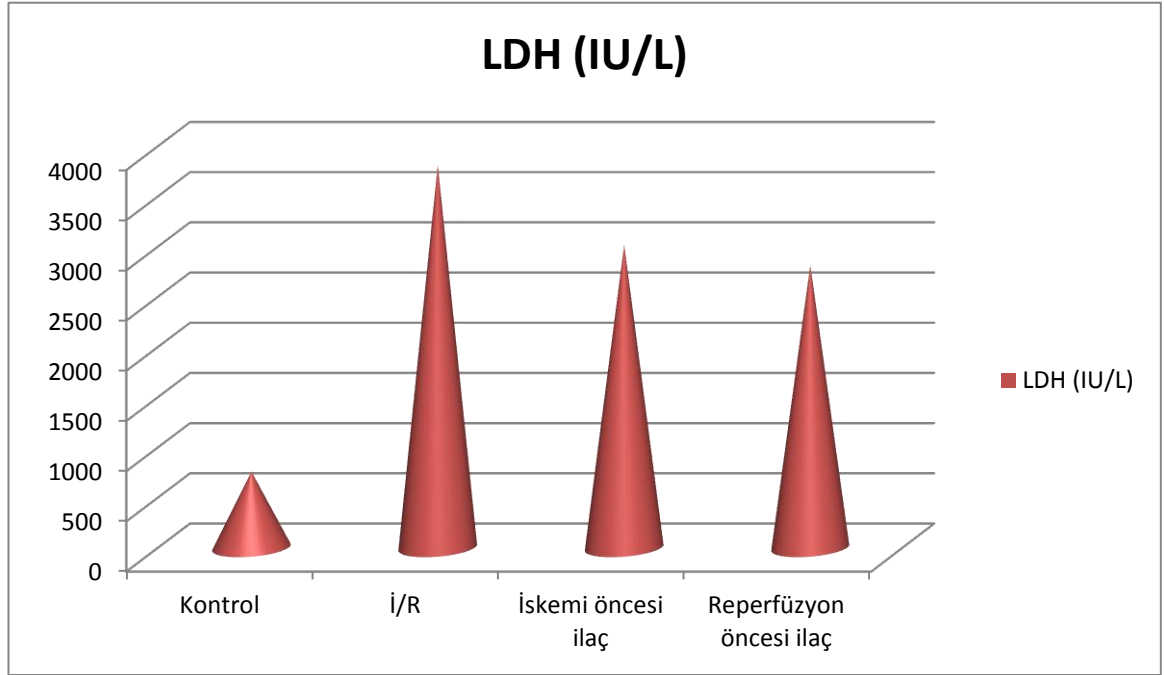
Gruplara ait LDH değerleri tablo ve grafikte gösterilmiştir.

Kontrol grubunda LDH düzeyi 760 ± 122.92 IU/L olarak ölçüldü. İR grubunda bu değer artarak 3812 ± 183.75 IU/L , iskemi öncesi ilaç verilen grupta 3017 ± 250.40 IU/L , reperfüzyon öncesi ilaç verilen grupta ise 2815 ± 244.07 IU/L olarak ölçüldü.

Tablo 8: Gruplara ait LDH ortalama değerleri

RATLAR	LDH (IU/L)	STANDART SAPMA
Kontrol	760.00	± 122.92
İR	3812.12	± 183.75
İskemi öncesi TH grubu	3017.62	± 250.40
Reperfüzyon öncesi TH grubu	2815.62	± 244.07

Şekil 5: Gruplara ait LDH ortalama değerleri grafiği



İskemi öncesi ilaç verilen grupta LDH düzeyi, kontrol grubuna göre yüksek olmakla birlikte İR grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel yönden anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). Aynı şekilde reperfüzyon öncesi ilaç verilen grupta LDH düzeyi kontrol grubuna göre yüksek olarak ölçüldü. Bu değer İR grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel yönden anlamlı olarak düşük saptanmıştır ($p < 0.05$). İskemi öncesi ilaç verilen grup ile reperfüzyon öncesi ilaç verilen grup karşılaştırıldığında, reperfüzyon öncesi ilaç verilen gruptaki LDH düzeyi daha düşük olmakla birlikte istatistiksel yönden anlamlı bir düşüklük saptanmamıştır ($p > 0.05$).

4.1.4. Katalaz Değeri

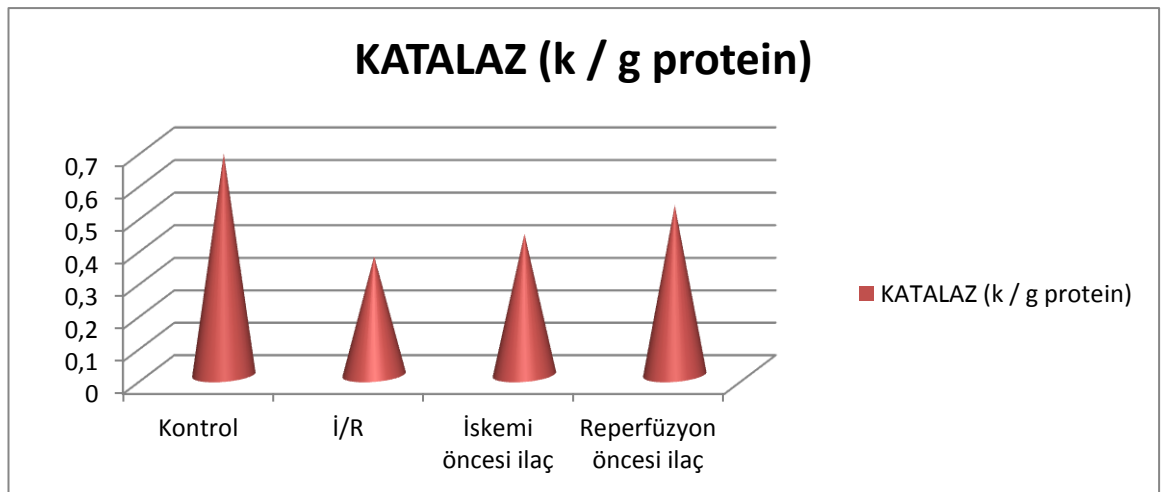
Gruplara ait katalaz değerleri tablo ve grafikte gösterilmiştir.

Kontrol grubunda katalaz düzeyi 0.681 ± 0.095 k/g protein, olarak ölçüldü. İR grubunda 0.365 ± 0.069 k/g protein iken, iskemi öncesi ilaç grubunda 0.434 ± 0.084 k/g protein, reperfüzyon öncesi ilaç grubunda ise 0.522 ± 0.078 k/g protein olarak ölçülmüştür.

Tablo 9: Gruplara ait katalaz ortalama değerleri

RATLAR	KATALAZ (k/g protein)	STANDART SAPMA
Kontrol	0.681	± 0.095
İR	0.365	± 0.069
İskemi öncesi TH grubu	0.434	± 0.084
Reperfüzyon öncesi TH grubu	0.522	± 0.078

Şekil 6: Gruplara ait katalaz ortalama değerleri grafiği



İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde; İR grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CAT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşme gözlenmiştir ($p<0.05$). Reperfüzyon öncesi TH verilen grup ile İR grubu karşılaştırıldığında; reperfüzyon öncesi TH grubunda CAT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme gözlenmiştir ($p<0.05$). İskemi öncesi TH verilen grup ile İR grubu karşılaştırıldığında; iskemi öncesi TH grubunda CAT değerlerinde yükselme gözlenmesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde saptanmamıştır ($p>0.05$).

4.1.5 Süperoksit Dismutaz Değeri

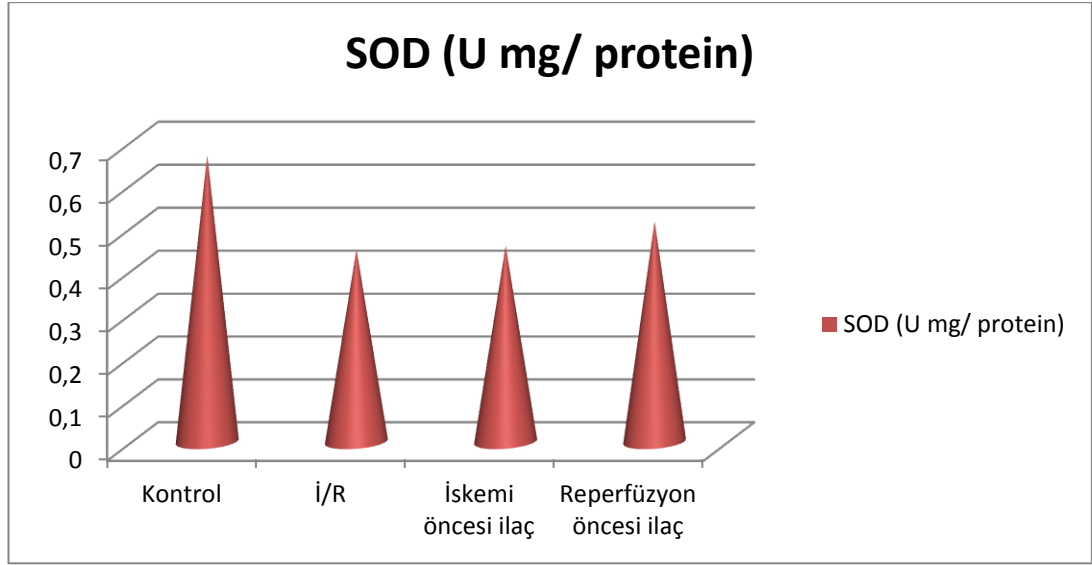
Gruplara ait SOD değeri tablo ve grafikte verilmiştir.

Kontrol grubunda SOD düzeyi 0.668 ± 0.131 U/mg protein olarak ölçüldü. İR grubunda 0.448 ± 0.061 U/mg protein iken, iskemi öncesi ilaç grubunda 0.457 ± 0.115 U/mg protein , reperfüzyon öncesi ilaç grubunda 0.514 ± 0.048 U/mg protein olarak ölçüldü.

Tablo 10: Gruplara ait SOD değerleri

RATLAR	SOD (U/mg protein)	STANDART SAPMA
Kontrol	0.668	± 0.131
İR	0.448	± 0.061
İskemi öncesi TH grubu	0.457	± 0.115
Reperfüzyon öncesi TH grubu	0.514	± 0.048

Şekil 7: Gruplara ait SOD ortalama değerleri grafiği



İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde; İR grubu ile kontrol grubu değerlendirildiğinde SOD değerlerinde İR grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p < 0.05$). Reperfüzyon öncesi TH verilen grup ile İR grubu karşılaştırıldığında, reperfüzyon öncesi ilaç grubunda SOD değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme gözlenmiştir ($p < 0.05$). İskemi öncesi ilaç verilen grup İR grubu ile karşılaştırıldığında SOD değerlerinde yükselme gözlenmekle beraber, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$).

4.1.6. Glutatyon Değeri

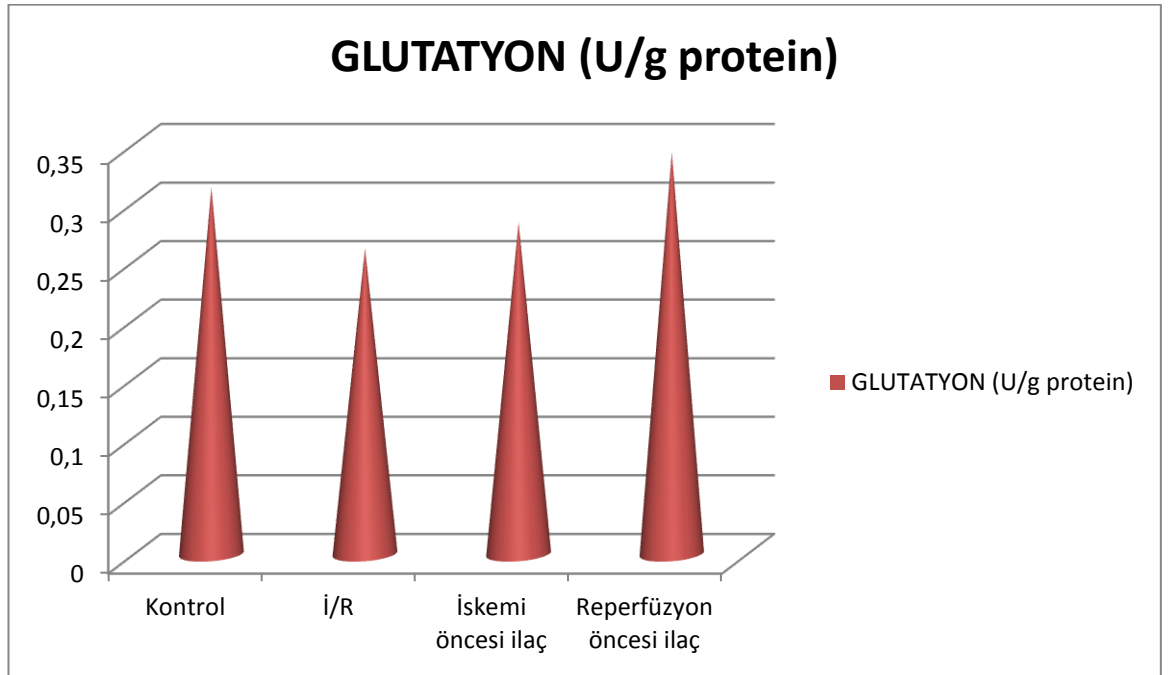
Gruplara ait GSH değerleri tablo ve grafikte gösterilmiştir.

Kontrol grubunda GSH düzeyi 0.313 ± 0.005 U/g protein olarak ölçüldü. İR grubunda GSH düzeyi 0.261 ± 0.003 iken U/g protein, iskemi öncesi ilaç grubunda 0.283 ± 0.001 U/g protein, reperfüzyon öncesi ilaç grubunda ise 0.343 ± 0.001 U/g protein olarak ölçüldü.

Tablo 11: Gruplara ait Glutasyon ortalama değerleri

RATLAR	GSH (U/g protein)	STANDART SAPMA
Kontrol	0.313	± 0.005
İR	0.261	± 0.003
İskemi öncesi TH grubu	0.283	± 0.001
Reperfüzyon öncesi TH grubu	0.343	± 0.001

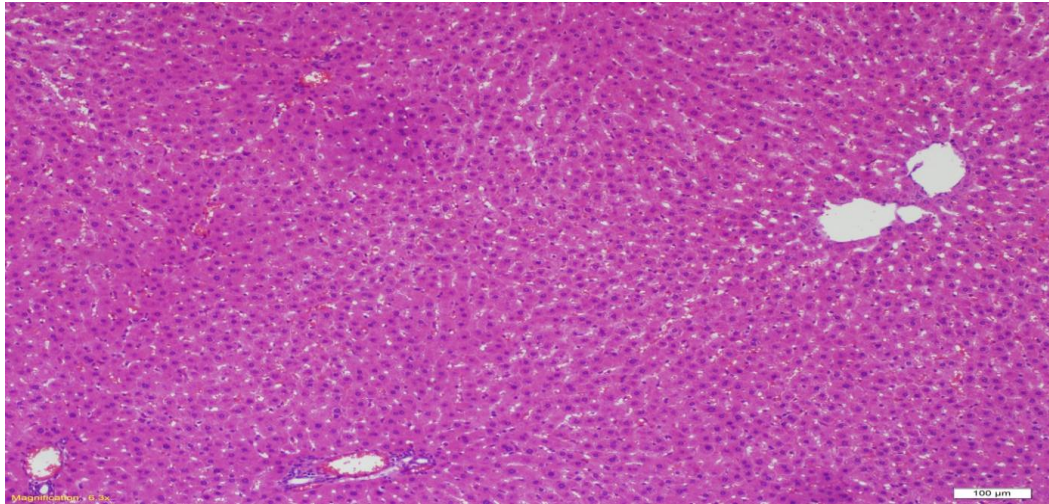
Şekil 8: Gruplara ait Glutasyon ortalama değerleri grafiği



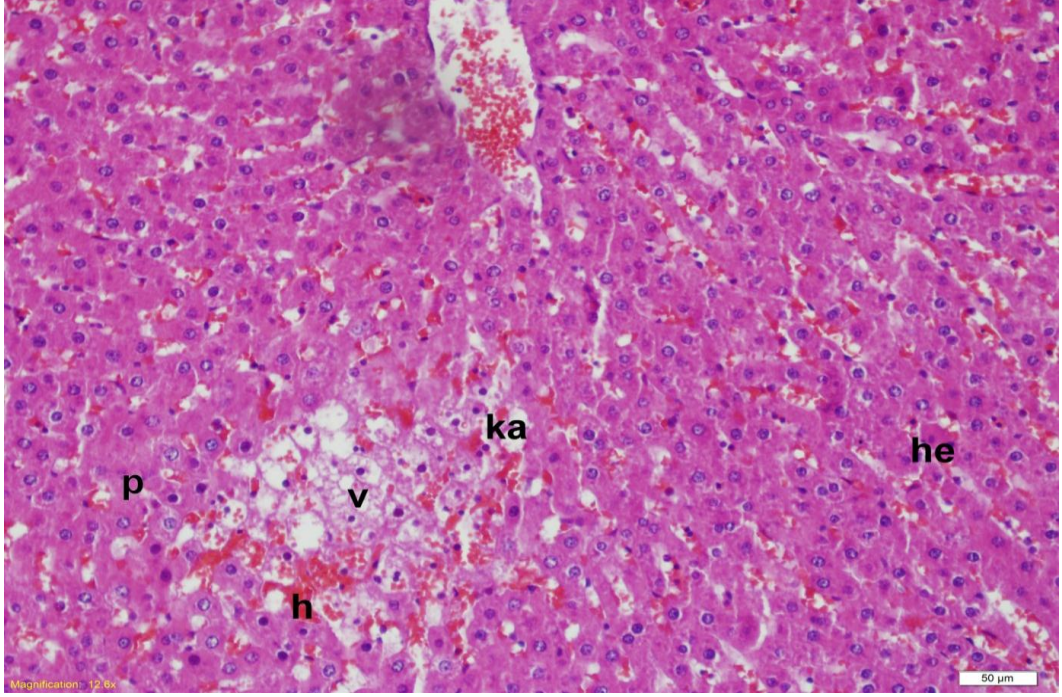
İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde; İR grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GSH değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0.05$). Reperfüzyon öncesi TH verilen grup ile İR grubu karşılaştırıldığında, GSH değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme gözlenmiştir ($p<0.05$). İskemi öncesi TH verilen grup ile İR grubu karşılaştırıldığında GSH değerlerinde artma gözlenmekle beraber, istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. ($p>0.05$). Reperfüzyon öncesi TH verilen gruptaki GSH yükselmesi, iskemi öncesi TH verilen grubu göre istatistiksel olarak daha anlamlıdır ($p<0.05$).

4.2. Histopatolojik Bulgular

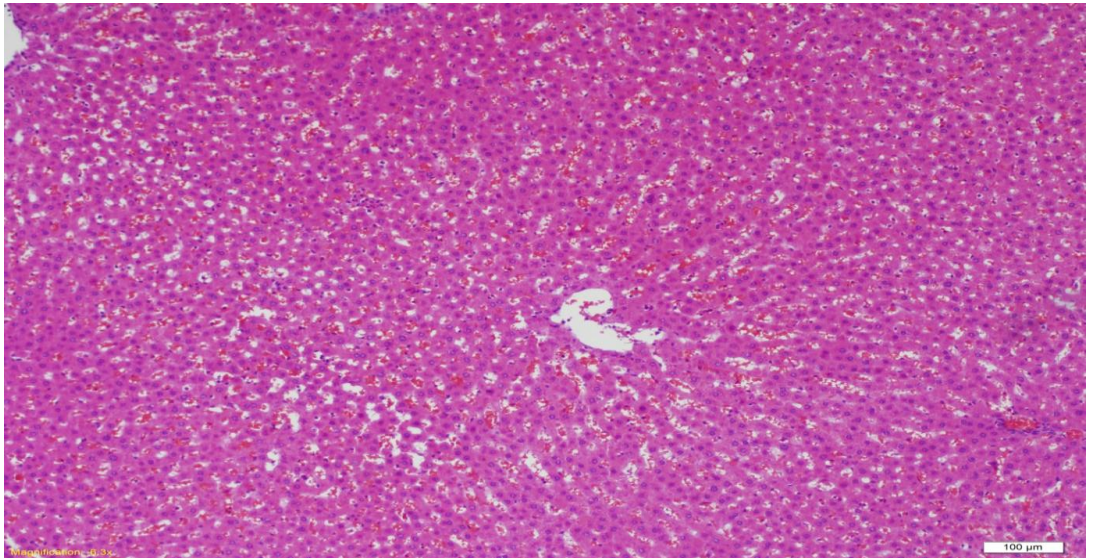
Kontrol grubunun histopatolojik incelemesinde hepatositlerin intakt ve sinuzoid ile karaciğer parankiminin normal morfolojik yapıda olduğu görüldü (Resim 9). İR grubunda hepatositlerde vakoulik dejenerasyon, hepatik kordonlarda ayrılma, hemoraji, belirgin hipereozinofili ve piknozis saptandı (Resim 10). İskemi öncesi ilaç verilen grup ile reperfüzyon öncesi ilaç verilen grupta azalmış hasar bulgularına rastlandı (Resim 11-12).



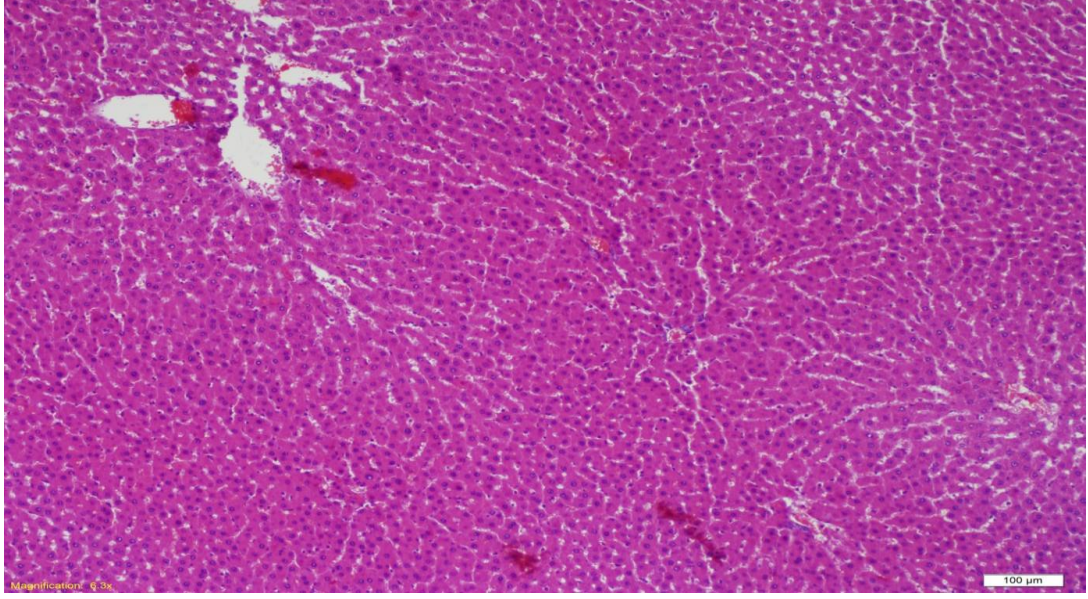
Resim 9: Kontrol grubu; hepatositler normal morfolojik yapıda (Hematoksilen&Eozinx100).



Resim 10: İR grubu; hepatositlerde vakuolik dejenerasyon(v), piknoz (p), hepatik kordonlarda ayrılma (ka), hemoraji (h), hipereozinofili (he) (Hematoksilen&Eozinx200)



Resim 11 : İskemi öncesi Tirofiban Hidroklorid verilen grupta azalmış hasar bulguları (Hematoksilen&Eozinx100).



Resim 12: Reperfüzyon öncesi tirofiban hidroklorid verilen grupta azalmış hasar bulguları (Hematoksilen&Eozinx100)

Tablo 12: Hepatik hasar skorlaması

RAT	0 Hasar yok	1 Hafif hasar	2 Orta-ağır	3 ağır
Kontrol	8 %100			
İR		2 (%25)	6 (%75)	
İskemi öncesi TH grubu	3 (%37.5)	5 (%62.5)		
Reperfüzyon öncesi TH grubu		6 (%75)	2 (%25)	

- İR grubunda 6 karaciğer dokusunda (%75) orta-ağır hasar, 2 karaciğer dokusunda (%25) hafif hasar oluştu. İskemi öncesi ilaç verilen grupta, 5 karaciğer dokusunda (%62.5) hafif hasar, 3 karaciğer dokusunda (%37.5) hasar oluşmamıştır. İstatiksel olarak iskemi- reperfüzyon grubu, iskemi öncesi ilaç verilen gruba göre anlamlı derecede patolojiktir ($p = 0.003$).
- İR grubunda 6 karaciğer dokusunda (%75) orta-ağır hasar, 2 karaciğer dokusunda (%25) hafif hasar oluştu. Reperfüzyon öncesi ilaç verilen grupta 2 karaciğer dokusunda (%25) orta-ağır hasar, 6 karaciğer dokusunda (%75) hafif hasar oluştu. İstatiksel olarak iskemi reperfüzyon grubu anlamlı derecede patolojik bulundu ($p=0,046$).
- İskemi öncesi ilaç verilen grupta 5 karaciğer dokusunda (%62.5) hafif hasar, 3 karaciğer dokusunda (%37.5) hasar saptanmadı. Reperfüzyon öncesi ilaç verilen grupta 2 karaciğer dokusunda (%25) orta-ağır hasar, 6 karaciğer dokusunda (%75) hafif hasar oluştu.

İstatiksel olarak perfüzyon öncesi grup, iskemi öncesi ilaç grubundan farklıdır ($p=0,029$).

Sonuç olarak, TH verilen gruplarda İR grubuna göre, iskemik hasarda anlamlı olarak azalma sağlanmıştır.

5. TARTIŞMA

Dokuya giden kan akımını geçici olarak kesilmesi ve sonrasında kan akımının yeniden sağlanması ile karakterize olan İR hasarı enflamatuvar bir cevabın başlamasıyla karakterizdir.

Hücrede ölüm veya organda fonksiyon bozukluğu şeklinde sonlanan bu durum, bir takım patolojik hadiseler serisi sonucu ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda esas rolün reperfüzyon sonucu oluşan mekanizmalarda olduğu gösterilmiştir. Karaciğerde iskemiye enden olan olayların başında karaciğer rezeksiyonu, travmaya bağlı hasar, ve hemorajik şok gelmektedir. Major karaciğer cerrahisi esnasında kan kaybı mortalite ve morbidite hızı açısından önemli olduğundan, karaciğerin vasküler izolasyonu ile kan kaybı en aza indirilmelidir. İR hasarının mekanizması komplekstir ve karaciğer hasarında oksijenden türeyen serbest radikallerin bu değişikliklerin ana nedeni olduğu düşünülmektedir (57). Jeaschke ve ark. karaciğer İR hasarının iki fazdan oluştuğunu belirtmişlerdir (58-60).

Başlangıç fazı; kupffer hücrelerinin rol oynadığı oksidatif strese oluşur ve reperfüzyonun ilk iki saatinde gerçekleşir. Enflamatuvar cevabın başlaması nötrofilleri aktive ederek, SOR salınımına aracılık eder. Dawson ve ark. hücre içinde, mitokondrinin en önemli SOR kaynağı olduğunu belirtmişlerdir (61). Serbest oksijen radikalleri, polimorf nüveli lökositler (PMNL), kompleman sistemi ve endotel hücreleri hasar mekanizmasından sorumlu faktörlerdir.

Doku hasarının tetikleme ile gelişen biyokimyasal olaylarda, antioksidan sistem yetersiz kalmaktadır. İskemik dokuda, oksidantlara bağlı olarak iskemi süresince glutasyon miktarının azaldığı ve SOD, CAT gibi enzimlerin inaktivasyonunun

hızlandığı ve buna bağlı olarak hücrelerin, reperfüzyon sonucu oluşan SOR etkilerine karşı daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir (62).

KC transplantasyonunda, rezeksiyonda kanama kontrolü sağlamada pringle manevrası sık kullanılmaktadır. Oluşan KC hasarını önleme konusunda bir çok ajan denenmiş ve koruyucu etkileri saptanmıştır.

Çalışmamızda karaciğer hilus blokajı (pringle manevrası) yapılarak İR hasarı oluşturuldu. Glikoprotein Iİb/IIIa inhibisyonu yaparak platelet agregasyonunu azaltan TH' in, bu hasar üzerindeki olası koruyucu etkileri incelenmiştir.

İskemi gelişiminde akut trombotik lezyonlar önemli bir yer tutar. Trombüs oluşması için mevcut bir aterosklerotik plağın rüptüre olması veya endoteliumun erode olması gerekmektedir. Trombosit adezyonu ve agregasyonu trombüs oluşumunda ilk basamaktır (63).

Glikoprotein Iİb/IIIa reseptörleri, trombositlerin membranlarında bulunur. Aktive trombositlerin yüzey reseptörleri aracılığıyla fibrine bağlanarak oluşturdukları trombosit-fibrin kompleksi normal hemostazın sağlanması için gereklidir. Bununla beraber pro-agregan ve pro-trombotik unsurların varlığında tromboz olarak adlandırılan intravasküler trombüs oluşumuna neden olurlar (64).

GP Iİb/IIIa inhibitörleri, güçlü bir trombosit inhibitörü grubudur. GP Iİb/IIIa inhibitörlerinin temel etki mekanizması trombositten zengin arteriyel trombüs içinde trombosit agregasyonunu durdurarak trombüsün ilerlemesini önlemesi ve trombosit tıkaçının ayrışmasını sağlamasıdır (64).

Klinikte Tirofiban Hidroklorid, koroner arter hastalığında, antikoagulan olarak infüzyon şeklinde kullanılmaktadır. Özellikle stent trombozunda etkin olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Literatürde Tirofiban Hidroklorid'in İR hasarı üzerindeki etkinliğini gösteren sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Kardiyoloji kliniklerinde intravenöz infüzyon şeklinde kullanılan TH'in, özellikle iskemi hasarında kullanılabilecek optimal dozu hakkında literatürde yeterli bilgi mevcut değildir. Biz intraperitoneal olarak 0.25 mg/ cc dozu intraperitoneal olarak etkinliğini göstermeye çalıştık.

İR hasarı sonrası karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmek için farklı teknikler kullanılmıştır. Güncel olarak en çok kullanılan AST, ALT ve LDH tayinidir.

Yabe ve ark. (65) İR uygulanmış karaciğer üzerinde yaptıkları bir çalışmada serum AST ve ALT değerlerinin arttığı ve bu artışın iskemi reperfüzyon sonucu oluşan serbest radikallerin dokuda oluşturduğu hasara bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Inglot ve ark. (66) karaciğer üzerindeki İR çalışmasında hepatositlerde nekroz, sinuzoidal genişleme ve PMNL infiltrasyonu gözlemişlerdir. Yine aynı seride serum AST ve ALT değerlerinde artma gözlemişlerdir.

Yıldırım ve ark. (67) ise, ratlarda KC IR sonrası serum AST ve ALT değerlerinde artma gözlemişlerdir.

Çalışmamızda, karaciğer hasarının göstergeleri olan AST, ALT ve LDH düzeylerinin, TH verilen gruplarda anlamlı olarak düşük çıktığı görülmüştür. Bu durum bize TH' in karaciğer doku hasarını anlamlı olarak azalttığını göstermektedir.

KC İR hasarında yapılan histopatolojik incelemelerde hepatositlerde vakoulik dejenerasyon, hepatik kordonlarda ayrılma, hemoraji, belirgin hipereozinofili piknozis, nekroz, sinuzoidlerde genişleme gözlenir.

Crockett ve ark.ları' nın (68) yaptığı bir çalışmada karaciğer İR uygulanmış grupta sinuzoidal konjesyon, hepatosellüler nekroz, sitoplazmik vakuolizasyon ve nötrofil infiltrasyonu gözlenmiştir.

Çalışmamızda, kontrol grubunun doku örnekleri histopatolojik olarak incelendiğinde, hepsinin normal morfolojik yapıda olduğu görüldü. İR grubunda yapılan incelemede literatüre benzer şekilde hepatositlerde vakoulik dejenerasyon, hepatik kordonlarda ayrılma, hemoraji, belirgin hipereozinofili ve piknozis saptandı. TH verilen gruplarda, karaciğer doku örneklerinde, İR ile oluşan hasarın, TH uygulaması ile belirgin olarak azaldığı görüldü.

Yüksek GSH düzeyi hücrede canlılığın bir belirteci olarak kabul edilir. GSH düzeyinin düşmesi fonksiyon bozukluğu ve mitokondrial hasarın göstergesi olarak

kabul edilir. Karaciğer İR hasarı boyunca doku GSH seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. Bu durum GSH' un reaktif oksijen moleküllerinin nötralize edilmesi için kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Bir çok çalışmada eksojen verilen GSH'un hücre içi GSH seviyelerini artırdığı ve oksidatif hasarı engellediği gösterilmiştir. Glutasyon oksidatif yaralanmalarda major koruyucu etkilidir (69).

Zaidi ve ark. (70) sıçanların immobilizasyonunun beyinde oksidatif strese neden olduğunu, bunun ise SOD aktivitesindeki ve GSH düzeyindeki azalış ve lipit peroksidasyonundaki artış ile gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda İR grubunda GSH düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşme gözlenmiştir. Reperfüzyon öncesi TH verilen grupta, GSH değerlerinin anlamlı olarak tekrar yükseldiği gözlenmiştir. İskemi öncesi TH uygulanan grupta ise, GSH düzeyinde yükselme sağlanmakla beraber istatistiksel olarak anlam kaydedilmemiştir. Reperfüzyon öncesi TH uygulamasının, GSH seviyesini anlamlı olarak artırması, dokuyu iskemik hasardan daha etkin olarak koruduğu şeklinde yorumlandı.

Somuncu S ve ark. (71) tavşan over modeli üzerinde yaptıkları İR hasarında, CAT ve SOD enzim düzeylerinde azalma kaydetmişlerdir.

Çalışmamızda İR grubunda doku SOD düzeylerinde, kontrol grubuna göre literatüre paralel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Reperfüzyon öncesi TH uygulanan gruplarda SOD düzeyinde İR grubuna göre anlamlı bir artma gözlenmiştir. İskemi öncesi TH uygulamasının SOD seviyelerini yükselttiği ancak bu yüksekliğin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

Reperfüzyon öncesi TH uygulamasının, SOD düzeyini anlamlı olarak yükseltmesi, dokuda reperfüzyon sonrası oluşan SOR miktarını azaltarak, tüketilmesi gereken antioksidan düzeyini, iskemi öncesi TH uygulanan gruba göre daha anlamlı olarak arttırdığı, şeklinde yorumlanmıştır.

Çalışmamızda İR grubunda CAT değerlerinde, kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Literatür çalışmaları bu azalmayı destekler niteliktedir. Reperfüzyon öncesi TH uygulanan gruplarda CAT düzeyinde İR grubuna göre

anlamli bir artma gözlenmiştir. GSH ve SOD değerlerinde olduğu gibi, iskemi ncesi TH verilen grupta CAT değerlerinde İR grubuna göre artma gözlenmiştir. Ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamli olmadığı saptanmıştır.

6. SONUÇ

Karaciğer dokusunda oluşan İR hasarında serum biyokimyasal parametrelerden AST, ALT ve LDH değerlerinde doku zedelenmesine bağlı olarak artma meydana gelmektedir.

İskemiden önce ve reperfüzyondan önce TH uygulanması , dokuda oluşan hasarı azaltarak, AST,ALT ve LDH değerlerinde azalma sağlamaktadır.

İskemiden önce ve reperfüzyondan önce TH uygulaması, oluşan hasarı azaltmakta ve SOR yıkımı için kullanılacak olan GSH, CAT ve SOD seviyelerini arttırmaktadır.

Tirofiban Hidroklorid klinkte trombosit agregasyon inhibitörü olarak kullanılmakla beraber; karaciğer hücrelerini, İR hasarına karşı koruduğu, çalışmamızda gösterilmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Majino G, Jorris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of the cell death. *Am. J. Pathol.* 1995; 146: 3-9.
2. Parks D. A, Granger D. N. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesions formation. *Am. J. Physiol.* 1986; 250: G749-53
3. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992; 72: 65-83.
4. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* 1990; 137:1-53.
5. Mitsuoka H, Schmid-Schonbein GW: Mechanisms for blockade of in vivo activator production in the ischemic intestine and multi-organ failure. *Shock.* 2000; 14:522-7.
6. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* 1991; 42: 225-46.
7. Green CJ, Gower JD, Healing G, Cotterill LA, Fuller BJ, Simpkin S. The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free Radic Res Commun* 1989; 7: 255-64.
8. Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol* 1992; 32 Suppl: S33-42.
9. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ. Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 14: 195-203.
10. Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fundam Clin Pharmacol* 2001; 15: 293-306.

11. Acworth IN, Bailey B. Reactive Oxygen Species. In: The handbook of oxidative metabolism. Massachusetts: ESA Inc., 1997, p. 1-1 to 4-4.
12. Cuzzocrea S., Riley D. P., Caputi A. P., Salvemini D.: Antioxidant Therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol. Rev.* 2001; 53: 135-59.
13. Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russel GI. Differential effect of ischemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Exp Nephrol* 1995; 3: 348-54.
14. Beckman JS, Chen , Conger Carl: The importance of superoxide in nitric oxide dependent cerebral ischemic injury: Cerebrovascular disease. Moskowitz MA, Caplan LR (eds) Butterworth-Heinemann, Newton MA. 1995, S:25-37.
15. Chan PH: Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27:1124-1129, 1996.
16. Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41/12: 1819-28.
17. Free oxygen and Thiyl radicals (online). 2006 (cited 03.09.2008) Available from: URL: <http://www.cyberlipid.org/perox/oxid0003.htm>.
18. Deby C, Goutier R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem Pharmacol* 1990; 39: 399-405.
19. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201: 875-880.
20. McCord JM. Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function of erythrocyte protein (hemocyanin). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-55.
21. Murray RK., Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Herper Biyokimya. Dikmen N, Özgünen T (çev). Asım, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi 2004.
22. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006; 52: 4: 601-23.
23. Jaeschke H. Mechanism oxidant stress induced acute tissue injury *PSEBM*. 1995; 209: 104- 11.
24. Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpasa Tıp Dergisi: cilt/sayı:35/4,2004*
25. Philips JW: A radical view of cerebral ischemic injury. *Prog Neurobiol* 1994; 42: 441- 8
26. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 2000; 39:1529-42.
27. Ertan T, Soran A, Kılıc M, Aşlar AK, Koc M, Cengiz O. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi. *Cerrahi Tıp Bulteni* 2001, 2; 4: 154-67.

28. Huang HY, Helzlsouer KJ, Appel LJ. The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: Results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2000; 9: 647-52.
29. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21;3:361-70.
30. Lopez-Neblina F, Paez-Rollos AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanism of Protection of Verapamil by Preventing Neutrophil Infiltration in the Ischemic Rat Kidney. *J Surg Res* 1996; 61: 469-72.
31. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* 2004; 70: 71-86.
32. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost.* 2007; 97: 738-47.
33. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2514-23.
33. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21: 1376-86.
34. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia—reperfusion injury. *Br J Surg* 1996; 83: 162-70.
35. Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Med Hypotheses* 2007; 68: 1363-70.
36. Suzuki M, Asako H, Kubes P, Jennings S, Grisham MB, Granger DN. Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc Res* 1991; 42: 125-38.
37. Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol* 1999; 101:148-60.
38. García-Villalón AL, Amezquita YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol.* 2008; 48: 109-14.
39. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 1995; 9: 526-33.
40. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 2007;115:81-103.

41. Cherubini A, Ruggiero C, Morand C, Lattanzio F, Dell'aquila G, Zuliani G, Di Iorio A, Andres-Lacueva C. Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. *Curr Med Chem*. 2008; 15: 1236-48.
42. 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.
43. Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 375-429.
44. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
45. Şehirli AO. Renal İskemi/Reperfüzyon Hasarında Melatonin'in Koruyucu Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. T.C. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2001.
46. Akkuş İ, 1995. Serbest Radikaller ve Fiziopatolojik Etkileri. 1. Baskı, Mimoza Yayınları, s.1-60.
47. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36: 1-9.
48. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995; 18: 1-11.
49. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *Journal of Pathology*. 2000; 190:25-26.
50. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995; 18: 1-11.
51. Dangas G, Colombo A: Platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists in percutaneous coronary revascularization. *Am Heart J* 1999; 138: 16-23.
52. PRISM-PLUS: Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 338: 1488-97.
53. Sözen S, Kısakürek M, Yıldız F, Gönültaş M, Dinçel A S. The effects of glutamine on hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *HIPPOKRATIA* 2011, 15, 2: 161-66.
54. Aebi H. Catalase In: Bergmeyer U, ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York and London Academic Press. 1974, 673-77.

55. 158. Sun Y, Oberley LW, Ying L: A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
56. 160. Durak I, Yurtaslan 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.
57. Hasselgren P. O.: Prevention and treatment of ischemia of the liver. *Surg Gynecol Obstet* 1987; 164: 187-96.
58. Jaeschke H.: Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem. Biol. Interact.* 1991; 79: 115-36.
59. Jaeschke H., Smith C. W., Mitchell J. R.: Reactive oxygen species during ischemia-reperfusion injury in isolated perfused rat liver. *J. Clin. Invest.* 1988; 81: 1240-45.
60. Jaeschke H., Farhood A.: Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am. J. Physiol.* , 1991; 260: 355-62
61. Dawson T. L., Gores G. J., Nieminen A. L., Herman B., Lesmasters J. J.: Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 1993; 264: 961-67.
62. (Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med* 1994; 42: 632-39.
63. Ruggeri ZM: Platelets in atherothrombosis. *Nature Med* 2002; 8: 1227-31
64. Kong DF, Califf RM. Et al. Clinical outcome of therapeutic agents that block the platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin in ischemic heart disease. *Circulation* 1998; 98: 2829-34.
65. Yabe Y., Kobayashi N., Nishihashi T., Takahashi R., Nishikawa M., Takakura Y., Hashida M.: Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia-reperfusion injury by Superoxide dismutase and Catalase derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001; 298: 894- 99.
66. Inglott S. Ferdinand, Virlos T Loannis, Habib A Nagy, Williamson CN, Robin et al. Adenosine preconditioning, attenuates hepatic reperfusion injury in the rat by preventing the down regulation of endothelial nitric oxide synthase *BMC Gastroenterology* 2002, 2;22:1-6
67. Yildirim S, Tok H, Koksall H, et al. Allopurinol plus pentoxifylline in hepatic ischaemia/reperfusion injury. *Asian J Surg* 2002;25:149.
68. Crockett ET, Galligan JJ, Uhal BD, Harkema J, Roth R, Pandya K. Protection of early phase hepatic ischemia-reperfusion injury by cholinergic agonists. *BMC Clin Pathol* 2006;6:3.

69. Mandel G. L.: ARDS, neutrophils and pentoxifylline, *Am.Rev.Respir. Dis.* (1998) 138.
70. Zaidi SM, Al-Qirim TM, Banu N. Effects of antioxidant vitamins on glutathione depletion and lipid peroxidation induced by restraint stress in the rat liver. *Drugs R D* 2005; 6(3): 157-65.
71. Somuncu S, Cakmak M, Dikmen G, et al: Ischemia-reperfusion injury of rabbit ovary and protective effect of trapidil. An experimental study. *Pediatr Surg Int.* , 2008; 24:315-18.

ÖZGEÇMİŞ

29 Temmuz 1977 yılında Antakya' da doğdum. İlköğretim ve lise eğitimimi 1984-1994 yılları arasında Antakya' da tamamladım. 1994 yılında Antakya Harbiye Lise' den mezun olduktan sonra 1996 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi' ni kazandım. 2002 yılında mezun olarak, 2007 yılına kadar kamu kuruluşlarında pratisyen hekimlik yaptım ve askerlik hizmetimi tamamladım. 02 Ağustos 2007 tarihinde Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı' nda asistan doktor olarak göreve başlamış olup halen bu görevimi sürdürmekteyim.

Dr. İlhan PALTACI