

T.C.
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

**HEPATİK İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE ADRENOMEDULLİN
VE ADRENOMEDULLİN BAĞLAYICI PROTEİN-1 KOMBİNASYONUNUN
AKUT AKCİĞER VE KARACİĞER HASARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. SERKAN BOZKURT

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. CELAL ÇERÇİ

2009-İSPARTA

T.C.
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

**HEPATİK İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE ADRENOMEDULLİN
VE ADRENOMEDULLİN BAĞLAYICI PROTEİN-1 KOMBİNASYONUNUN
AKUT AKCİĞER VE KARACİĞER HASARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. SERKAN BOZKURT

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. CELAL ÇERÇİ

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 1605-TU-08
proje numarası ile desteklenmiştir.**

2009-İSPARTA

ÖNSÖZ

Süleyman Demirel Üniversitesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Mahmut Bülbül başta olmak üzere, bu tezin planlanması ve çalışılmasında bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Nihat Kaymakçioğlu ve Yrd. Doç. Dr. Celal Çerçi'ye, asistanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Recep Çetin, Doç. Dr. H. Erol Eroğlu, Doç. Dr. Ömer Rıdvan Tahran ve Yrd. Doç. Dr. İbrahim Barut'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın tamamlanmasında katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Hüseyin Vural'a ve asistan arkadaşım Dr. H. Yusuf Kara'ya, Histoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Alparslan Gökçimen ve asistan arkadaşım Dr. Hakan Darıcı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlığım süresince beraber çalıştığım asistan arkadaşlarım, genel cerrahi hemşireleri ve personeline teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlığım süresince desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen anneme, babama ve eşime sevgi ve saygılarımı sunarım. Hayatıma anlam katan sevgili oğluma sevgilerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AM	Adrenomedullin
AMBP-1	Adrenomedullin Bağlayıcı Protein-1
ARDS	Ani solunum sıkıntısı sendromu
ATP	Adenozin Trifosfat
CGRP	Kalsitonin Geni İlişkili Peptit
Cu	Bakır
DNA	Deoksi-Ribonükleik Asid
ELAM-1	Endotel hücre lökosit adezyon molekülü
ET	Endotelin
E-Selektin	Endotelial selektin
Fe	Demir
ICAM-1	İntersellüler adezyon molekülü-1
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
INF- γ	İnterferon gama
L-NAME	NL'-nitro-L-arginin metil esterin
MAPK	Mitojen aktive edici protein kinaz
MCP	Monosit Kemoçekicisi
MDA	Malodialdehit
MIP	Makrofaj İnflamatuar Protein
Mn	Mangan
MOF	Çoklu Organ Hasarı
MPO	Myeloperoksidaz
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NK	Doğal öldürücü hücreler
NO	Nitrikoksit
NOS	Nitrikoksit sentetaz
OH	Hidroksil radikali

PAF	Trombosit aktive edici faktör
PAMP	Proadrenomedullin
PNL	Polimorf Nüveli Lökosit
ROT	Reaktif Oksijen Türevleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör- α
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekülü-1
Zn	Çinko

İÇİNDEKİLER

Önsöz	ii
Simgeler ve Kısaltmalar	iii
İçindekiler	iv
<u>1.GİRİŞ</u>	1
<u>2.GENEL BİLGİLER</u>	2
2.1 Karaciğer Anatomisi.....	2
2.1.1 Karaciğer Fonksiyonel Ünitesi	3
2.1.2 Karaciğer Dolaşımı ve Mikrosirkülasyonu	5
2.2 Karaciğer Histolojisi.....	6
2.2.1 Hepatosit	6
2.2.2 Endotelial Hücreler.....	7
2.2.3 Kupffer Hücreleri.....	7
2.2.4 Presinüzoidal Hücreler (İto Hücreleri).....	7
2.2.5 Karaciğer Sinüzoidleri ve Disse Aralığı.....	7
2.2.6 Karaciğer Lobları ve Segmentleri.....	8
2.2.7 Portal Sistem.....	9
2.2.8 Bilier Sistem.....	9
2.3 İskemi.....	10
2.4 Reperfüzyon.....	11

2.5 Karaciğer İskemi-Reperfüzyon Hasarı.....	12
2.5.1 Reaktif Oksijen Türevleri (Serbest Oksijen Radikalleri).....	12
2.5.2 Nitrik Oksit (NO) ve Endotelin.....	14
2.5.3 Sitokinler.....	15
2.5.4 Kemokinler.....	16
2.5.5 Adezyon Molekülleri.....	16
2.5.6 Lipid Mediatorler (Araşidonik Asit Metabolitleri).....	17
2.5.7 Nötrofiller.....	18
2.5.8 Kupffer hücreleri.....	18
2.6 Antioksidan Savunma Mekanizmaları.....	18
2.6.1 Süperoksit Dismutaz (SOD).....	19
2.6.2 Katalaz.....	19
2.6.3 Glutatyon Peroksidaz.....	20
2.6.4 Sitokrom Oksidaz.....	21
2.7 Myeloperoksidaz (MPO).....	21
2.8 Malondialdehit (MDA).....	21
2.9 Tümör Nekroz Faktör-α (TNF-α).....	21
2.10 İnterlökin-6.....	22
2.11 Adrenomedullin.....	22
2.12 Adrenomedullin Binding Protein-1.....	24

<u>3. MATERYAL ve METOD</u>	25
3.1 Hayvanlar.....	25
3.2 Gruplar.....	25
3.3 Anestezi ve Cerrahi Prosedür.....	26
3.4 Kullanılan Malzemeler ve Aletler.....	29
3.5 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	30
3.5.1 MPO tayinde kullanılan Elisa kiti.....	30
3.5.2 TNF- α tayininde kullanılan Elisa kiti.....	30
3.5.3 IL-6 tayininde kullanılan Elisa kiti.....	30
3.5.4 MDA tayininde kullanılan kimyasal maddeler.....	30
3.5.5 SOD tayininde kullanılan kimyasal maddeler.....	30
3.6 Kullanılan Çözeltiler.....	31
3.6.1 MDA tayininde kullanılan çözeltiler.....	31
3.6.2 SOD tayininde kullanılan çözeltiler.....	31
3.7 Yöntem.....	31
3.7.1 MPO aktivitesinin ölçümü.....	31
3.7.2 TNF- α seviyesinin ölçümü.....	32
3.7.3 IL-6 seviyesinin ölçümü.....	32
3.7.4 MDA seviyesinin ölçümü.....	33
3.7.5 SOD aktivitesinin ölçümü.....	34
3.8 Homojenizasyon.....	35

3.8.1 Akciğer ve Karaciğer dokusu homojenizasyonu.....	35
3.9 Doku Örneklerinin Histopatolojik İncelemesi.....	35
3.9.1 Doku örneklerinin hazırlanması.....	35
3.9.2 Doku örneklerinin değerlendirilmesi.....	36
3.9.3 Doku örneklerinin immunohistokimyasal hazırlanması.....	36
3.9.4 Doku örneklerinin immunohistokimyasal değerlendirilmesi.....	38
3.10 İstatistiksel Analiz.....	39
<u>4. BULGULAR.....</u>	40
<u>5.TARTIŞMA ve SONUÇ.....</u>	76
<u>6. ÖZET.....</u>	85
<u>7. SUMMARY.....</u>	86
<u>8.ŞEKİL, RESİM VE TABLOLAR.....</u>	88
<u>9. KAYNAKLAR.....</u>	90

1. GİRİŞ

İskemi ve iskemi sonrasında reperfüzyonun günümüzde çoğu hastalığın ve tedavi sonrası oluşan komplikasyonların temelinde yatan etmen olduğu araştırmalarla tespit edilmiştir. İskemi ve sonrasında reperfüzyon sonucu serbest radikal oluşumu bazı metabolik mekanizmalarla düzenlenmektedir.

Hücre membranındaki ATP(Adenozin trifosfat) bağımlı Na^{+2}/K^{+} ve Ca^{+2} pompalarının çalışmamasına bağlı hücre içi serbest Ca^{+2} , K^{+} , Na^{+2} artışı, fosfolipaz aktivasyonu, hücre membran hasarı ve miyelinizasyon, ATP azalması, mitokondrial disfonksiyon, lizozomal enzim aktivasyonu, karyolizis ve karyoreksis hücre hasarının temel mekanizmaları olarak ortaya konmuştur (1).

İskemi/reperfüzyon sürecinde hücre hasarında yukarıda anlatılan mekanizmaların hepsinin etkinliği olmakla birlikte temelde iskemi safhasındaki ATP eksikliğine bağlı gelişen zincirleme reaksiyonun sonucudurlar. Reperfüzyon sürecinde ise temel mekanizmalar ortama salınan yüksek O_2 konsantrasyonuyla birlikte oluşan ROT(Reaktif Oksijen Türevleri)'a bağlı lipid peroksidasyonu, membran hasarı, DNA(Deoksiribonukleik asid) hasarı, protein denatürasyonu ve mitokondrial hasara bağlıdır (1).

Hücre hasarını oluşturan mekanizmalar çeşitli mediatörlerle düzenlenmektedir. İnflamasyonun başlatılması, devam ettirilmesi ve sonlandırılması, bu mediatörler aracılığı ile sağlanır. Eikosanoidler, PAF(Trombosit aktive edici faktör), vazoaktif aminler, kemokinler, kompleman ve sitokinler bunlardan bazılarıdır (1).

İnflamasyonun başlangıç safhasında görevli olan, diğer mediatörleri ve inflamatuvar hücreleri tetikleyen maddeler sitokinlerdir. Bu grupta yer alan $TNF-\alpha$ (Tümör nekroz faktör-Alfa) ve $IL-1$ (İnterlökin-bir) proinflamatuvar, $IL-6$ (interlökin-altı) ise yardımcı inflamatuvar sitokinlerdir (2,3).

Bu çalışmadaki amacımız, özellikle inflamatuvar sitokinler üzerine baskılayıcı özelliği ortaya konmuş olan adrenomedullin ve adrenomedullin bağlayıcı protein-1 kombinasyonunun hepatik iskemi-reperfüzyon modelindeki hem yakın hem de uzak organ hasarı üzerine olan etkilerini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Karaciğer Anatomisi

Karaciğer anatomik olarak abdomende yer almaktadır. Yerleşim yeri abdominal kadranlardan sağ hipokondrium ve epigastriuma tekabül etmektedir. Sağda 7–11. kaburgalar arasında yer alır. Diafragma vasıtası ile torakstan ayrılmaktadır. Yaklaşık olarak 1.500 gr ağırlığındadır ve bu da vücut ağırlığının yaklaşık 1/35-40'ını oluşturmaktadır (4,7).

Karaciğer dokusu, portal ven ve hepatik ven ağacı arasında dallanan hepatositler, kupffer hücreleri, sinüzoidler, asinüsler, lobüller ve loblardan oluşmaktadır. Karaciğer vena cava inferior ile safra kesesi yatağı arasındaki düzlem (cantlie çizgisi) baz alınarak sağ ve sol lob olmak üzere 2 ana loba ayrılmaktadır. Her iki lob da 4 segment olmak üzere toplam 8 segmentten oluşmaktadır. Segmentler arteria hepatica, vena porta ve duktus hepaticusun dağılımına göre yapılmıştır. Arteria hepatica ve vena portanın her bir ana dalı bir segmenti beslemekte ve o segmentten bir safra kanalikülü çıkmaktadır (6,8). Karaciğerin büyük bir kısmı (area nuda dışındaki kısım) intraperitonealdir ve visseral peritonla kaplıdır (9). Ligamentum coronarium yardımı ile retroperitona tutunmuş şekilde diafragmaya asılı kalmaktadır. Her iki yanda da ligamentum triangulare ile diafragmaya kenarlardan tutunur (4).

Karaciğerin kan akımı 100–150 ml/kg/dk'dır. Karaciğer vena porta ve arteria hepatica ile beslenmektedir. Karaciğer dolaşımında vena portanın %75–80, arteria hepaticanın %20–25 payı bulunmaktadır (4). Arteria hepatica, trunkus çölyakus'un 3 ana dalından biridir. Vena porta da, vena mesenterika superior ve vena lienalis'in birleşmesi ile oluşmaktadır (5).

Karaciğerde fazla miktarda lenfatik sıvı üretilmektedir. Duktus torasikusta akan lenf sıvısının yaklaşık yarısı karaciğer kaynaklıdır. Karaciğerin lenf damarları yüzeysel ve derin olmak üzere 2 gruptan oluşmaktadır. Yüzeysel lenfatikler

karaciğerde subkapsüler yerleşimlidir. Derin lenfatikler ise portal sistemle hepatik venler arasındaki planda yer alan bağ dokusu içinde dağılım gösterir (5).

Karaciğer temel fizyolojik işlemlerde ve metabolizmada kilit rol oynamaktadır. Safra yapımı ve salgılanması, karbonhidrat metabolizması, lipid metabolizması, plazma lipoprotein sentezi ve salınımı, kolesterol metabolizması, temel proteinlerin ve albuminin yapım ve salgılanması, yağda eriyen vitaminlerin depolanması, pıhtılaşma faktörlerinden bazılarının sentezi, hematopoietik sistem elemanlarının kontrol ve eliminasyonu, ilaç ve toksinlerin detoksifiye edilmesi karaciğerin temel işlevlerindedir (7).

2.1.1 Karaciğer Fonksiyonel Ünitesi

İlk olarak 1954 yılında Rappaport tarafından tanımlanmıştır. Karaciğerin fonksiyonel ünitesi lobüllerdir ve lobüller birleşerek lobları oluşturmaktadır. Karaciğer lobüllerinin sınırlarını, hilustan organ içine giren ve parankimi odacıklar şeklinde bölen glisson kapsülü oluşturmaktadır. Segmentler ise içinde birden çok lobül barındıran, sınırlarını vasküler ana dalların belirlediği, cerrahi prosedür için önemli olan ve karaciğeri topoğrafik olarak alanlara bölen ünitelerdir (10).

Lobüller şekil itibari ile kesitsel olarak altıgen biçimli yapılardır. Altıgen şeklindeki lobülün hemen hemen her köşesinde portal triad adı verilen ve portal ven, hepatik arter ve safra kanalikülünden oluşan bir ünite bulunmaktadır. Dıştan glisson kapsülü ile sınırlıdır ve bu kapsülden merkeze doğru ışınal şekilde uzanım gösteren asinüslerle birbirinden ayrılmış hepatositlerden ibarettir. Asinüsler tek sıra endotel hücrelerinin oluşturduğu tüp şeklinde lümeni yapılarıdır. Merkezde vena centralis bulunmaktadır. Asinüslerin içleri portal ve hepatik arterden gelen kanla doludur ve vena centralise doğru yavaş bir akım halindedir (10).

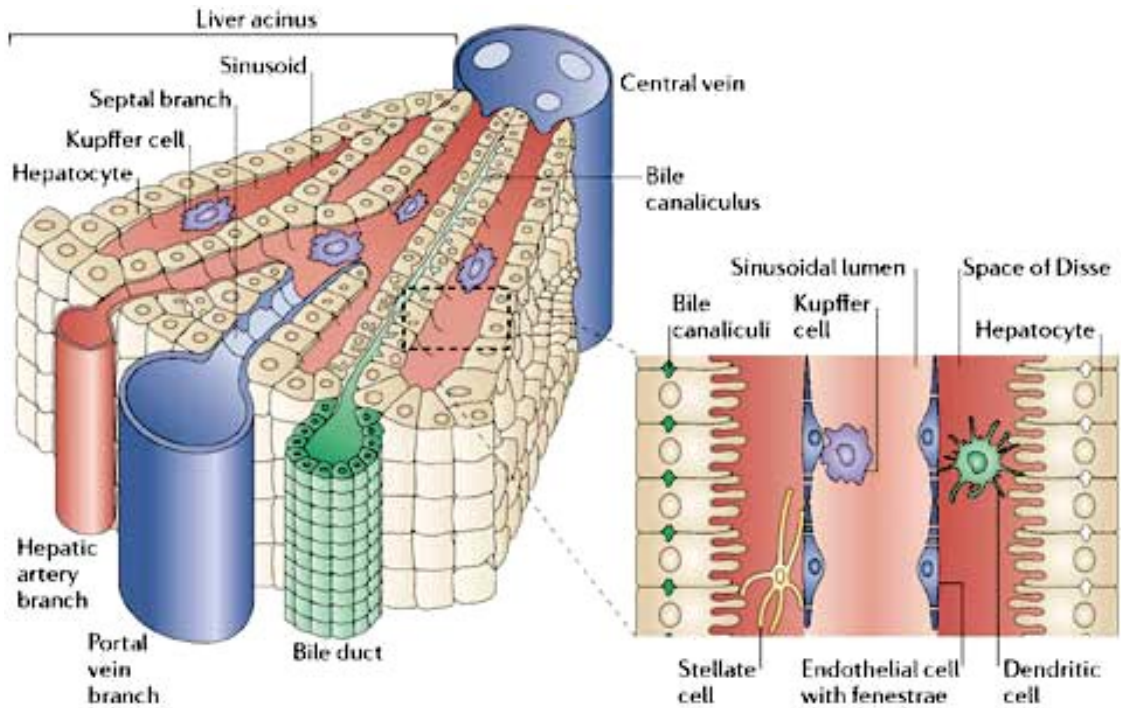
Hepatositlerin sinüzoidal olmayan yüzlerindeki komşu membranlarda sitoplazmaya doğru oluşan endozom benzeri çöküntü alanları mevcuttur ve bu alanlar karşı karşıya geldiklerinde tüp şeklini alırlar. Yan yana geldiklerinde, akım yönü portal triaddaki safra kanalına doğru olan bir safra kanalikülünü oluştururlar. Hepatositlerin safra kanalı oluşturan yüzlerinde endoplazmik retikulum ve golgi cisimcikleri yoğun olarak bulunmaktadır (12).

Karaciğer lobüllerini oluşturan hepatositlerin glikoz metabolizması, safra üretimi, detoksifikasyon ve protein sentezi gibi çeşitli fonksiyonları mevcuttur. Hepatositler ağırlıklı olarak yerine getirdikleri fonksiyonlara göre lobülün farklı alanlarında lokalize olmaktadır. Hepatositler bu özelliklerine göre periferden santrale doğru 3 zona ayrılmaktadır:

Zon-1; periferik zon olarak tanımlanır. Glisson kapsülünün altından başlar. Hepatik fonksiyonel ünitenin karşılama hücreleri olup toksinlere, oksijene, glukozu, lipid ve proteinlere en yüksek yoğunlukta maruz kalan hücrelerdir. Bu nedenle hücrelerde enzimatik faaliyetler yüksek seviyededir ve glikojen depoları ağırlıklı olarak bu zonda yer almaktadır.

Zon-2; periferik zon ile santral zon arasında yer alır ve geçiş zonu (intermediate zone) olarak tanımlanır.

Zon-3; santral zon olarak bilinir ve vena centralis etrafındaki hepatositlerden oluşmaktadır (11).



Şekil 1: Karaciğer sinüzoidi, portal triad ve karaciğer zonları (12).

2.1.2 Karaciğer Dolaşımı ve Mikrosirkülasyonu

Karaciğer vena porta ve arteria hepatica vasıtası ile kanlanmaktadır. Aynı zamanda çölyak trunkusun dalları ile karaciğer arasında da bazı küçük arterioller bulunabilmektedir. Vena porta karaciğer kan akımının %75-80'ini, arteria hepatica ise %20-25'ini karşılamaktadır. Karaciğer oksijenasyonunun %60-70'inden vena porta, %30-40'ından arteria hepatica sorumludur. Arteriel kanın oksijen saturasyonu normal insanda %96-98 civarında olmasına rağmen, debisinin vena portaya göre düşük olması sebebi ile karaciğer oksijenasyonundaki payı vena portaya göre düşüktür (5).

Vena porta basıncı yaklaşık olarak 6-10 mmHg, sinüzoidlerdeki basınç ise 2-4 mm Hg'dır. Karaciğerde kan akımı, basınç farkına göre devam etmektedir. Karaciğerdeki kan dolaşımı, tüm vücutta olduğu gibi hormonal faktörlerle ve nörolojik sistemle kontrol altında tutulmakta ve düzenlenmektedir (11).

Hepatik fonksiyonel ünitenin dolaşımında ana yollar portal triadlardaki arteria hepatica ve vena portanın dallarıdır. Glisson kapsülünün hemen altında sinüzoidlere dal verirler. Fonksiyonel ünitenin dolaşımı arteriel sfinkterler ve sinüzoidlerle düzenlenmektedir. Sinüzoidler tek sıra endotelial hücrelerin birbirleri arasındaki sıkı bağlantılarla oluşmaktadır ve bazal mebranı yoktur. Bu sebeple sinüzoidal endotelin geçirgenliği yüksektir. Sinüsoidal akım ve geçirgenlik endotelial ve satellit hücrelerin geçirgenliğine göre değişmektedir (10).

İto hücreleri olarak da bilinen satellit hücreler Disse aralığında yer almaktadır ve ekstrasellüler kollajen üretiminden sorumludur. Bu hücreler hepatit patolojisinde, karaciğer fibrozisinden sorumlu tutulmaktadır (11). Sitoplazmalarındaki yüksek yağ miktarı sebebiyle A vitamini deposu oldukları düşünülmektedir (7).

2.2 Karaciğer Histolojisi

2.2.1 Hepatosit

Hepatositler polihedral şekilli, 6–8 yüzeyle, yaklaşık olarak 20–30 µm çaplı hücrelerdir. Merkezinde 1 ya da 2 nukleolusa sahip olan merkezi yerleşimli nukleusu mevcuttur. Fonksiyonu itibarı ile bol miktarda endoplazmik retikuluma, ribozoma ve golgi cisimciğine sahiptir. Oldukça fazla sayıda mitokondri bulundurmaktadır. Endoplazmik retikulum, ribozom organelinin varlığı ya da yokluğuna göre granüllü ya da granülsüz olarak adlandırılmaktadır. Genel olarak granüllü formu protein sentezinden sorumludur. Granülsüz formu hepatositlerde özellikle safra yapımı, salgılanması ve toksik maddelerin detoksifikasyonundan sorumludur (11).

Hepatositler karaciğerin ana fonksiyonel hücreleridir. Karaciğer hücrelerinin %60-70'ini oluşturmaktadır. Bu hücreler, karaciğerin fonksiyonel ünitesi içerisinde periferden santrale doğru ışınal bir dizilim gösterirler. Bu dizilime 'remark kordonları' adı verilmektedir. Birbirine komşu hepatositler arasında fonksiyonuna göre 3 farklı bağlantı yüzü bulunmaktadır:

İlk ve en geniş yüzeye sahip olan membran, sinüzoidal membrandır. Disse aralığına bakan yüzüdür. Plazma sıvısının dolaştığı alandır. Hepatositlerin metabolizması için uzun mikrovillusları barındırır ve plazma sıvısından absorpsiyon için gerekli yüzeyi artırır (13).

İkinci önemli yüzü ise iki hepatosit arasında yer alan ve doğrultu olarak vena centralise dik seyreden bir dağılım izleyen ve portal triaddaki safra kanallarına dökülen safra kanaliküllerini oluşturan yüzüdür. Kanaliküler membran olarak anılmaktadır. Kanalikülleri zonula okludens adı verilen bağlantılar oluşturmaktadır. Güçlü bağlantılardır. Kanaliküler membranda da mikrovilluslar bulunmaktadır. Mikrovilluslar ATP bağımlı transport mekanizmaları ile lümene safra salgılamaktadırlar (13).

Son olarak da sırt sırta vermiş safra kanalları arasında sıkı bağlantı membranları bulunmaktadır. Sıkı bağlantılar gap-junction adı verilen bağlantılarla sağlanmaktadır. Dokunun iskeletini oluştururlar ve hücreler arası haberleşmeyi sağlarlar (11).

2.2.2 Endotelial Hücreler

Karaciğer hücrelerinin yaklaşık %20-30'unu oluşturmaktadır. Karaciğer fonksiyonel ünitesindeki sinüzoidler, endotel hücrelerinin bir araya gelerek bağlanmasıyla oluşturdukları tubuler yapılardır. Endotel hücrelerinin arasındaki bağlantılar geniş porlar içermektedir. Disse aralığına geçen mayi, endotel hücreleri arasından süzülerek ya da primer endotel hücrelerinin aktif transportu ile protein ve elektrolit transferiyle oluşturulmaktadır (1).

2.2.3 Kupffer Hücreleri

Vücudun retikuloendotelial sisteminin önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar. Karaciğerin doku makrofajlarıdır ve karaciğer sinüzoidlerinin yüzeyini döşemektedirler. Karaciğerin primer fagositer hücreleri olma özelliği ile dolaşımdan, barsaklardan ve kolonik floradan dolaşıma katılan bakteri, virüs ve endotoksinleri etkisiz hale getirmektedirler (2).

2.2.4 Presinüzoidal Hücreler (İto Hücreleri)

Sinüzoidleri oluşturan endotel hücrelerinin hemen altında yani ağırlıklı olarak zon-1'de yer almaktadırlar. Sinüzoidlerin kan akımının düzenlenmesine, kasılıp gevşeyerek katkıda bulunmaktadırlar. Yapılan mikroskopik bakılarda yağ vakuollerince zengin olduğu için A vitamini deposu oldukları düşünülmektedir. Bu hücreler aynı zamanda kollajen üretimi ve depolanmasından sorumludur. Bu sebeple hepatit zemininde gelişen fibrozisten sorumlu tutulmaktadır (10,11).

2.2.5 Karaciğer Sinüzoidleri ve Disse Aralığı

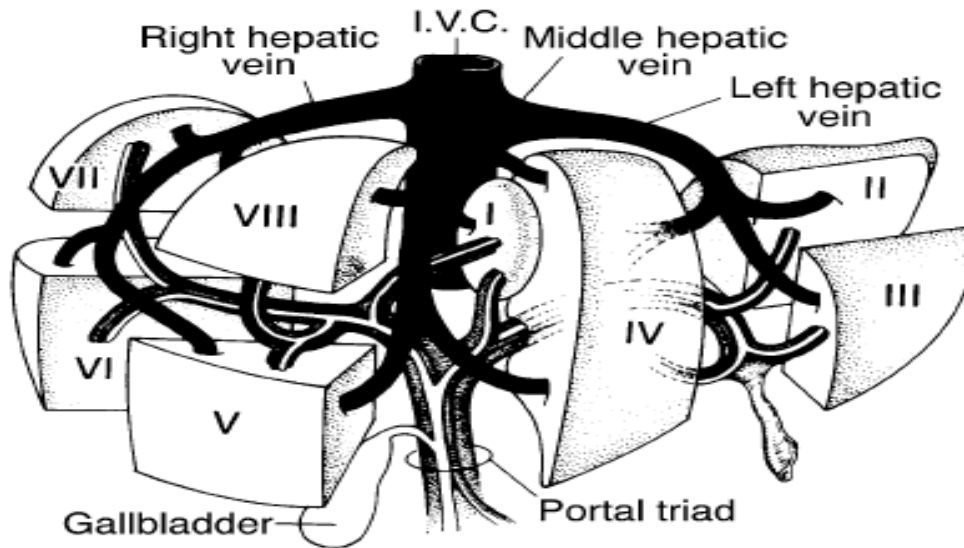
Sinüzoidleri oluşturan endotel hücreleri ile hepatik lobüldeki ışınal dizilimli hepatositler arasındaki interstisyel boşluğa disse aralığı adı verilmektedir. Sinüzoidlerden kanın geçişi esnasında disse aralığına plazma sıvısı akmaktadır. Hepatik lobül köşelerindeki bağ dokudan zengin olup içinde portal triadı bulunduran

ve kiernan aralığı adı verilen bölgede lenfatik damarlar mevcuttur (13,14). Disse aralığına geçen plazma sıvısı, hepatositlerin metabolik artıkları, yüksek molekül ağırlıklı proteinler, kolesterol ve yağ asitleri bu lenfatiklere drene olur.

2.2.6 Karaciğer Lobları ve Segmentleri

Karaciğer, arteria hepatica proprianın ve vena portanın sağ ve sol ana dallarının dağılımına göre 2 loba ayrılmıştır. Parankim, vena cava ile safra kesesi yatağı arasındaki hayali düzlemde (cantlie çizgisi) sağ ve sol loblara ayrılmaktadır. Her lob kendi içinde 4 segmente bölünmüştür ve bu segmentlerin de her birinin ana safra kanalı, portal dalı ve arteriyel dalı bulunmaktadır (8).

Couinaud sınıflamasına göre; sağ lob, transvers bir kesi ile ön ve arka olarak 2 bölüme ve sağ hepatic venden geçen horizontal bir düzlem ile de lateral ve medial olarak 2 bölüme ayrılır. Sol lob ise inferiorda ligamentum venosum, süperiorda ligamentum teres hepatis ve ligamentum falciformeden geçen horizontal bir düzlemle lateral ve medial olarak 2 bölüme ayrılmaktadır. Medialde anteriorda segment 4 ve posteriorda segment 1 bulunur. Lateralde ise süperiorda segment 2, inferiorda ise segment 3 yer almaktadır (7).



Şekil 2: Karaciğer segmentleri, portal ven ve hepatic ven ana dalları (5).

2.2.7 Portal Sistem

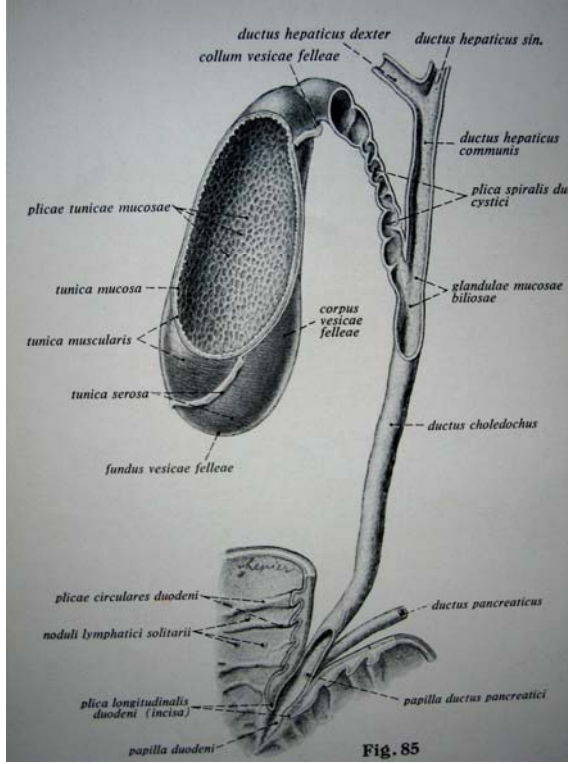
İntestinal dolaşımında vena mesenterika süperior ve vena splenikaya dökülen vena mesenterika inferior damarlarının pankreas kollumunun hemen arkasında birleşmesi ile vena porta oluşmaktadır. Özofagogastrik bileşke düzeyinde, umblikal düzeyde, hemoroidal venler düzeyinde kaval dolaşım ile kollateraller vasıtası ile bağlantı halindedir. Portal hipertansiyon durumlarında fizyolojik portakaval şantlar bu bölgelerde oluşmaktadır.

Vena porta karaciğer kanlanmasının yaklaşık %75-80'ini sağlamaktadır. Arteria hepatikanın %20-25 payı bulunmaktadır. Karaciğerin kan akımı 100-150 ml/kg/dk'dır. Karaciğer oksijenasyonunun da yaklaşık %50-60'ını karşılamaktadır (6.7.8).

2.2.8 Bilier Sistem

Bilier sistem, hepatositlerde sentezlenen bilirubinin konsantre edilerek depolanmasını sağlayan bir kese ve beslenme sırasında bilirubinin intestinal lümeneye salgılanmasını sağlayan kanallardan oluşan bir sistemdir. Safra kanalları kübik epitelle döşelidir. Koledokta silindirik epitele doğru değişir.

Safra sisteminin karaciğerdeki dallanması hemen hemen portal sistemle aynıdır ancak akım yönleri terstir. Işınsal dizilimli hepatositler arasındaki safra kanalı portal triaddaki ana safra kanalikülüne dökülmekte ve bu kanaliküllerde birleşerek duktus hepatikus dekster ve sinisteri oluştururlar. Bu kanallar hepatoduodenal ligament içinde duktus hepatikus kominisi oluşturur. Distale doğru duktus sistikus ile birleşir ve duktus koledokusu oluşturur (8).



Şekil 3: Safra yolları anatomisi (15).

2.3 İskemi

Herhangi bir doku ya da organın beslenme ve oksijenasyonunun geçici veya kalıcı olarak sağlanamaması durumuna doku ya da organ iskemisi adı verilmektedir. Bu süreç insan vücudunda çeşitli hastalıkların veya bazı tedavi yöntemlerinin sonucu olarak izlenebilmektedir. Örneğin şok, pankreatit, sepsis, yanık gibi hipovolemi ile seyreden hastalıklarda, miyokard infarktüsü, mezenterik tromboemboli, serebrovasküler infarkt, portal ven trombozu, Budd-Chiari sendromunda olduğu gibi tam oklüzyonla giden hastalıklarda ve transplant, rezeksiyon cerrahileri gibi cerrahilerde rezeksiyon prosedürünün gereği olarak görülebilmektedir. Bu süreç maruz kalınan süreye bağlı olarak geri dönüşümlü ya da dönüşümsüz doku ya da organ iskemisi ile sonuçlanabilmektedir (16).

İskemi sürecinde dokudaki oksijen bağımlı metabolik süreçler çalışmamakta ve oksidatif fosforilasyon yapılamamaktadır. Ayrıca mitokondrial elektron transport zinciri efektif çalışmamaktadır. Anaerobik mekanizmalarla glikoliz sürecinde ATP üretilmeye çalışılır ve laktik asit birikimi olur ve asidoz gelişir. Hücrenin canlılığını

koruması için gerekli enerji ATP ile sağlanmaktadır. ATP üretiminin yetersizliği ATP'nin adenin ve hipoksantine kadar yıkımı ile sonuçlanmaktadır. Bu yıkım beraberinde ROT (reaktif oksijen türevleri)'un oluşumu ile sonuçlanmaktadır. ATP'nin yetersizliği ve bunun sonucu oluşan ROT, hücre hasarını oluşturmaktadır (17,18,19,20).

Enerji yetersizliğine bağlı olarak hücre zarındaki ATP bağımlı aktif iyon transportu bozulur. Hücre içi Na, K, Cl düzeyleri değişir ve hücre hasarının ilk fazı olan hücre şişmesi gerçekleşir. Patoloji düzelmediği takdirde mitokondri fonksiyonları bozulur. Endoplazmik retikulumdan ribozomlar ayrılır ve endoplazmik retikulumda da şişme izlenir. Hücre sitoplazması içinde myelin şekiller görülür. Bu sürece ROT'un oluşturduğu hücre zarı hasarı ve lipid peroksidasyonunun da katkısı bulunur. İskemi süreci, hücrel ve humoral immunitenin de aktive olması ile ilerleyerek devam eder. Hücre zarındaki ATP bağımlı Ca^{+2} pompasının çalışmaması sonucu intrasellüler Ca^{+2} artar ve fosfolipazlar ile proteolitik enzimler aktive olur. Fosfolipaz aktivasyonu ile hücre zarındaki fosfolipidlerde yüksek miktarda bulunan araşidonik asit parçalanır ve inflamatuvar sürecin major mediatörlerinden olan, inflamasyona yön veren ve boyut kazandıran lökotrienler ve prostaglandinler sentezlenir. İskemi de hücre membranının ve mitokondrilerin parçalanması ile geri dönüşümsüz hücre hasarı oluşturmaktadır. Bundan sonraki süreçler lizozomal zarın parçalanması ile asid hidrolazların aktifleşmesi ve karyolizisin gerçekleşmesidir (1).

2.4 Reperfüzyon

Kelime anlamı olarak iskemi sürecinde sekteye uğrayan doku ya da organ dolaşımının tekrar sağlanması anlamına gelmektedir. Kanlanmanın tekrar sağlanmış olması dokunun ya da organın kurtarıldığı anlamına gelmemektedir. Geri dönüşümlü hücre hasarındaki sınır çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Karaciğer dokusu için bu süre 15–25 dk arasında bildirilmektedir (22). Yapılan ön koşullama çalışmaları ile bu sürenin daha da arttırılabileceği ortaya konmuştur. İskemi oluşturulduktan sonraki geri dönüşümlü hücre hasarı süresi geçildiği zaman doku ve hücre hasarı başlamıştır ve bu süreçten sonra sağlanan reperfüzyonun, kurtarıcı etkisi ile birlikte yıkıcı etkisi de görülmektedir (1).

Yapılan çalışmalarda reperfüzyon hasarında 2 evre ortaya konmuştur. Reperfüzyon sonrası ilk 1,5–2 saatlik süreçte temel patolojik ajan, ortamın tekrar oksijenasyonu sonucu oluşan ROT'lardır. Bu evreye başlangıç evresi adı verilir. Reperfüzyon sonrası 6. saat ile 2 gün arasında devam eden süreç ise geç evre olarak adlandırılmıştır ve bu süreçteki reperfüzyon hasarından humoral ve hücrel inflamatuvar ajanlar sorumlu tutulmaktadır (21).

2.5 Karaciğer İskemi-Reperfüzyon Hasarı

Temel patolojik süreçte iskemik periyotta ve reperfüzyon periyodunda farklı mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır. İskemik dönemde, temelde hücre canlılığını korumak için ATP parçalanır. Hipoksantini ürik asite çeviren ksantin dehidrogenaz enzimi ksantin oksidaza dönüştüğünden dolayı hipoksantin interstisyumda birikir. ATP azaldıkça ATP bağımlı aktif transport bozular, hücre içi Ca^{+2} ve Na^{+2} artar ve hücre şişmeye başlar.

Reperfüzyon periyodunda dokunun kanlanması ile birlikte ROT artar. Hücre içinde artan Ca^{+2} , fosfolipazları, hücre içi protein kinazları ve endonükleazları aktive eder. Böylece protein katabolizması başlar ve fosfolipazlar inflamatuvar mediatörleri (lökotrienler, tromboksanlar) sentezler (1). Vasküler endotelial hasar nedeniyle geçirgenlik artar ve interstisyuma geçen plazma ve proteinler ile doku ödemi oluşur (22). Doku ödemi vasküler yapıları daha da daraltır ve mikrosirkülasyon yavaşlar. İnflamatuvar hücrelerden ve endotelden salgılanan sitokinler ile birlikte vasküler ve endotelial adezyon molekülleri (ICAM-1, VCAM-1, E-selektin) sentezlenmeye başlar. Sonuç olarak, yavaşlayan akımın ve adezyon moleküllerinin sayesinde interstisyuma nötrofil adezyonu ve migrasyonu gerçekleşir. Süreç sonunda akımın yavaşlaması, sitokinlerin ve tromboksanların etkileri ile trombosit tıkaçlar oluşur (23,24,25).

2.5.1 Reaktif Oksijen Türevleri (Serbest Oksijen Radikalleri; ROT)

O_2^- (süperoksit), OH^- (hidroksil), H_2O_2 (hidrojen peroksit), $HOCl$ (hipoklorik asit) ve singlet oksijen reaktif oksijen türevleridir (24,25). Reaktif, kelime anlamı

olarak tepkin, tepgen anlamına gelmektedir. Biyokimyasal açıdan ise diğer moleküllerle çok kolay tepkimeye girebilen anlamında kullanılmaktadır. Kimyasal açıdan, reaktif moleküllerin substrat olarak buldukları tepkimelerde oldukça düşük hatta negatif aktivasyon enerjisi gereklidir. Serbest radikal ise molekülün, en dış yörüngede çiftlenmemiş dolayısı ile enerjisi dengelenmemiş serbest elektron barındırması anlamına gelmektedir. ROT'lar endojen veya ekzojen kaynaklı olabilir (26,27).

Endojen kaynaklar:

- 1-) Mitokondrial redoks zincirinde üretim
- 2-) Endoplazmik retikulum ve nükleer membran transport sistemi
- 3-) Peroksizomlar
- 4-) İnflamatuvar hücreler (makrofaj, nötrofil, NK hücreler)
- 5-) Ksantin oksidaz sistemi
- 6-) Fenton reaksiyonları

Ekzojen kaynaklar:

- 1-) Radyasyon
- 2-) Toksinler (CCl₄ gibi)
- 3-) Kemoterapötikler
- 4-) Hava kirliliği
- 5-) Sigara kullanımı
- 6-) Ultraviyole ışınları
- 7-) Stres (katekolamin metabolizması sırasında oluşur)
- 8-) Hiperbarik oksijen tedavileri

İskemi-Reperfüzyon hasarı sonrasında oluşan serbest radikaller, vücudun mevcut enerji üretim kaskadındaki oksidasyon-redüksiyon tepkimelerinin bir numaralı substratı olan O₂'nin radikalleridir. Metabolizmanın gereği olarak O₂ mitokondrilerde sitokrom oksidaz sistemi ile elektronları kaybederek H₂O ve CO₂ 'ye indirgenmektedir. Bu oksidatif metabolizma ile vücudun enerji ihtiyacı ATP'lerde depolanmaktadır. Bu reaksiyonlar sürecinde elektron kaçakları olabilmekte ve serbest radikaller fizyolojik süreçte de oluşabilmektedir (28). Mevcut antioksidan

enzimler fizyolojik süreçte detoksifikasyon için yeterlidirler ancak iskemi-reperfüzyon hasarı detoksifikasyon kapasitesini aştığı için ROT hasarı görülmektedir.

ROT oluşumunda diğer bir kaynak inflamatuvar hücrelerdir (nötrofil, NK hücre, makrofaj). İnflamatuvar hücreler bakteriyel ve virütik hücrelerin lizisinde bu radikalleri kullanır. Nötrofiller ROT sentezi için MPO (Myeloperoksidaz) aktivitesini kullanır.

ROT'lar hücelere 4 ana mekanizma ile zarar verirler:

- 1-) Membran lipid peroksidasyonu yaparak
- 2-) Nonperoksidatif mitokondrial hasar yaratarak
- 3-) DNA hasarı yaratarak
- 4-)Proteinlerde sülfidril çapraz bağlarını oluşturarak (1,29,30,31,55).

2.5.2 Nitrik Oksit (NO) ve Endotelin

Endotelin (ET) vasküler endotel kaynaklı 21 aminoasitten oluşan bir vazokonstrüktör polipeptiddir. Yapılan çalışmalarda ET'nin 3 izotipi tespit edilmiştir ve farklı dokularda farklı miktarlarda sentezlenmektedir. NO genellikle inflamasyon sürecinde nötrofiller, hepatositler, kupffer hücreleri gibi inflamatuvar hücrelerden sentezlenirler. Güçlü vazodilatatör moleküllerdir. NOS tarafından L-Arjinin'den sentezlenmektedir. Tip1 n-NOS (nöronal), tip2 i-NOS (indüklenebilen), tip3 e-NOS (endotelial) olmak üzere üç izotipi vardır. İskemi-reperfüzyon sürecinde etkin olan formu tip2 i-NOS'dur ve bunun sentezinin düzenlenmesinde NF- κ B etkilidir (32,33,34,35). Yapılan çalışmalarda hepatik iskemi ve reperfüzyon modellerinde dokudaki ve dolaşıma katılan ET ve NO düzeyleri ölçülmüştür. İskemi sonrasında yapılan sakrifikasyon sonrası doku bakılarında, hepatik iskemi ve reperfüzyon modellerinde, satellit hücrelerde kontraksiyon ve sinüzoidlerde vazokonstrüksiyon izlenmiştir. Reperfüzyonun erken dönemlerinde vazokonstrüksiyona, vasküler endotel hasarına sekonder salgılanan ET, lökotrienler ve tromboksanlar sebep olmaktadır (36). İskemi süresince ve reperfüzyonun da ilk 1-2 saati içinde NO düzeyleri düşük seyreder. Bunun sebebi NOS kofaktörleri olan NADPH ve O₂ düzeyinin düşük olmasıdır. İskemi-reperfüzyon sürecinde dokuda ROT hasarına bağlı aktive olan protein kinazlardan arjinaz sentezi artmaktadır. Arjinaz L-arjinini

yıkarak NO sentezini baskılamış olur. NO'nun reperfüzyon sonrası yüksek değerlere ulaşması 6–7 saati bulmaktadır (37,38).

2.5.3 Sitokinler

Hepatik iskemi-reperfüzyon modelinde sitokinler inflamatuvar yanıtı yönetir ve yönlendirirler. Bütün sitokinlerin otokrin, parakrin ve humoral etkileri mevcuttur (1). Sitokin salgılanması kendi kendini denetler ve düzenler. Sitokinler hedef hücrede membran reseptörlerine bağlanarak etki ederler. Sitokinler, inflamasyona verdikleri yöne göre proinflamatuvar ve antiinflamatuvar olarak iki ana gruba ayrılırlar. Proinflamatuvar sitokinler inflamasyonun başlangıcında salınırlar, inflamasyonu agra ve ederler, diğer yardımcı sitokinlerin salınımı arttırlar ve inflamatuvar hücreleri aktive ederler. İmmün cevabın başlaması ve sürdürülmesi için gereklidirler. İnsan immün cevabında temel proinflamatuvar sitokinler TNF- α ve IL-1'dir. Proinflamatuvar yardımcı sitokinler ise IL-6 ve IL-8'dir. Antiinflamatuvar sitokinler ise inflamasyonun daha sonraki evrelerinde ve iyileşme sürecinde salınırlar (39,40,41). Bunlar IL-4, IL-10, IL-11, IL-13'dür (40,42).

Sitokinler etkilerini, gen ekspresyonunu düzenleyerek gösterirler ve hücrede sentezlenen maddelere yön verirler. Kemik iliği üzerine hematopoietik etkileri vardır. İlk etapta hücre hasarı ile birlikte Kupffer hücrelerinin aktivasyonu ile TNF- α , IL-1 ve IL-6 sentezlenir (43,44). TNF- α ve IL-1, IL-8 sentezini uyarır ve adezyon molekülleri sentezini artırır (50,51,52,53). Yapılan çalışmalarda, ratların karaciğerinde iskemi-reperfüzyon sonrası TNF- α üretimi kontrol grubuna göre 5 kat fazla tespit edilmiştir (49). TNF- α iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası uzak organ hasarında rol alan en önemli sitokindir (51,53). TNF- α , IL-1 salınımını artırır ve IL-1 de nötrofillerden serbest radikal salınımını tetikler (56). IL-1 ile TNF- α 'nın inflamatuvar mekanizmalar üzerine sinerjistik etkileri vardır ve birbirlerinin etkilerini potansiyalize ederler. IL-1'in yarılanma ömrü 6 dakikadır ve kısa yarılanma ömrü kandaki tespitini zorlaştırmaktadır. Yarılanma ömrünün kısa olması otokrin etkinliğinin parakrin etkinliğe göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. IL-6 sinüzoidal endotel hücrelerinden ve Kupffer hücrelerinden salgılanmaktadır. IL-6 akut faz reaktanlarının salınımını düzenlemektedir (7). IL-6 iskemi-

reperfüzyon modelinde MOF(Çoklu Organ Hasarı) ve ARDS(Ani solunum sıkıntısı sendromu) gelişiminden sorumlu tutulmaktadır (57,58). IL-6 aynı zamanda B lenfosit diferansiyasyonunu ve immunglobulin salınımını arttırmaktadır (7). IL-12 iskemi-reperfüzyon döneminde hepatositlerden salgılanmaktadır ve TNF- α salınımını düzenlemektedir (63). IL-10 inflamasyonu baskılayan bir sitokindir. IL-10 salınımı NF- $\kappa\beta$ 'yı baskılayarak inflamatuvar medyatörlerin transkripsiyonunu engellemektedir (64). IL-10 makrofajlar ve PNL'ler tarafından yapılan ROT sentezini de baskılamaktadır (65).

PAF bir fosfolipid mediatördür. Trombosit kümelenmesini, vasküler permeabilitenin artmasını, lökosit adezyon ve migrasyonunun artmasını sağlamaktadır. PAF üretimi iskemi-reperfüzyon sonrasında reperfüzyon sonrası 24. saatte en yüksek değerine ulaşmaktadır (65). Ratlarda PAF reseptör antagonistleri ile reperfüzyondan önce tedavi yapılmasının TNF- α 'yı baskıladığı bildirilmiştir (66).

2.5.4 Kemokinler

Kemotaktik sitokinler kemokin olarak adlandırılmaktadır. Küçük molekül ağırlıklı (5-15 kD) bileşiklerdir. Akut ve kronik inflamasyonda sitokinlerin yardımıyla salgılanırlar. Anjiojenik özellikleri ile neovaskülarizasyona sebep olmaktadır. İnflamasyonun kronikleşmesi sürecinde oldukça fazla etkinliğe sahiptirler. Platelet faktör-4, CINC (sitokinle indüklenen nötrofil kemoçekicisi), MIP1-2 (makrofaj inhibitör protein), MCP-1.2.3 (monosit kemoçekicisi) bunlardan birkaçıdır (67).

2.5.5 Adezyon Molekülleri

İnflamasyon sürecinde adezyon; adezyon moleküllerinin sentezlenmesi, kan akımının yavaşlaması, lökositlerin vasküler endotel hücrelerine affinitelerinin artması ile oluşmaktadır. Bu aktivasyonda sitokinler, kemokinler, lipid mediatörler rol oynamaktadır (68). ICAM-1, ELAM-1, VCAM-1, selektinler, integrinler bunlardan bazılarıdır. ELAM-1 aktivasyonu TNF- α ve IL-1 salınımı ile artar. Adezyon moleküllerinin aktivasyonu, özellikle iskemi-reperfüzyon mekanizmasında,

uzak organ hasarının oluşmasında, trombosit kümelenmesini ve PNL göçünü sağlayarak etkili olmaktadır (54).

ICAM-1 iskemi reperfüzyon modelinde sinüzoidal endotel hücrelerinden sentez edilmektedir. Sentezleri, TNF- α ve IL-1 sitokinleri ile artar (69). İskemi-reperfüzyon sonrası doku mikrosirkülasyonu yavaşlar, inflamatuvar mediatörlerden ICAM-1'in nötrofildeki karşılığı olan L-Selektin lökosit membranından tomurcuklanır ve ICAM-1 ile birleşerek lökosit adezyon ve migrasyonunu gerçekleştirir (70). Selektin molekülünün 3 formu vardır: P-selektin (Platelet), E-selektin (Endotel), L-selektin (Lökosit)'den oluşmaktadır. Bu moleküller hücre zarlarındaki glikoproteinlerdir. İntegrin molekülü nötrofil membranında oluşturulur ve ICAM-1'e bağlanır.

2.5.6 Lipid Mediatörler (Araşidonik Asit Metabolitleri)

Araşidonik asit poliansatüre bir yağ asiti olup hücre membranındaki fosfolipidlerde bol miktarda bulunmaktadır. Hücre membran fosfolipidlerinden fosfolipazların aktivasyonu ile araşidonik asit sentezlenir ve lipooksijenaz ve siklooksijenaz ile katalizlenen iki ana yolağa yönelir (1,7).

Araşidonik asit siklooksijenaz yolağa girerse prostaglandin G₂ ve prostaglandin H₂ oluşmaktadır. PGH₂ çok labil bir bileşiktir ve hemen stabil formlara dönüşme eğilimindedir. PGH₂ bulunduğu dokuya göre farklı formlarda bulunabilir. Örneğin plateletlerde TXA₂, vasküler endotelial hücrelerde PGI₂ formunda bulunur (1,7). TXA₂ platelet agregasyonunu artırır ve vazokonstrüksiyona sebep olur (1). PGI₂ platelet agregasyonunu baskılar ve vazodilatasyon oluşturur. Bu iki mediatör dolaşımında denge halindedir (1). Siklooksijenaz yolak nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlarla baskılanabilmektedir (1). Lipooksijenaz yolak daha ziyade nötrofillerde kullanılmaktadır. Lipooksijenazların katalizlediği tepkime ile AA'ten 5-HPETE sentezlenmektedir. 5-HPETE'den de lökotrienler sentezlenmektedir. Lökotrienler güçlü kemotaktik ajanlardır, vazokonstrüktördürler ve vasküler permeabilityyi artırarak doku ödemeine sebep olurlar (1,7).

2.5.7 Nötrofiller

Lökositlerin %60–70'ini oluşturmaktadırlar. Enfeksiyon ve inflamasyon halinde bu oran %90–95'lere kadar yükselmektedir. Nötrofiller iskemi-reperfüzyon hasarında kilit rol oynarlar. Reperfüzyonun erken dönemlerinde sitokinler ve lipid mediatörlerle aktive olan nötrofiller hasara uğramış bölgelerde toplanır. Bu toplanma sitokin ve kemokinlerin tetiklediği adezyon moleküllerinin sentezindeki artışla sağlanmaktadır. Nötrofillerden salgılanan oksidazlar, elastazlar ve proteazlar doku ve endotel hücre hasarını daha da artırmaktadır (1). Nötrofillerdeki ROT sentezini myeloperoksidaz ve NADPH katalizlemektedir (7).

2.5.8 Kupffer Hücreleri

Retiküloendotelial sistemin karaciğerde bulunan hücreleridir. Dolaşımdaki monositlerden köken almaktadırlar. Karaciğerde fonksiyonel üniteye sinüzoidal endotelin hemen üstünde lümene bakar şekilde dizilmektedirler (12). Tipik doku makrofajlarıdır. Hepatik iskemi-reperfüzyon modelinde reperfüzyonla birlikte IL-1 ve TNF- α ilk Kupffer hücrelerinden salgılanmakta ve hasarı başlatmaktadır (2).

2.6 Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Organizmanın fizyolojik ya da patolojik süreçlerinde görülen, metabolizma dahilinde ya da patolojik safhada ürettiği ROT'u elimine etmeye yarayan savunma mekanizmalarıdır. İki ana grubu vardır. İlk grup serbest radikal oluşumunu engellemekte, ikinci grup ise oluşan serbest radikalleri detoksifiye etmektedir. İntrasellüler ya da ekstrasellüler olabilmektedirler. ROT oluşumunu önleyen antioksidanlar SOD, katalaz, mitokondrial sitokrom oksidaz, glutatyon peroksidazdan oluşmaktadır (3).

2.6.1 Süperoksit Dismutaz (SOD)

Patolojik ya da fizyolojik süreçte, metabolizma sırasında ya da hipoksi sonrasında, ortamdaki O₂ konsantrasyonundaki ani artışla birlikte O₂'den ksantin oksidaz enzimiyle süperoksit (O₂⁻) sentezlenmektedir. Süperoksit, süperoksit dismutaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla hidrojen peroksit (H₂O₂) üretmektedir.



SOD aktivitesi hücre ömrünün sonuna doğru azalmaya başlamaktadır. Bu sebeple apoptozis mekanizmasında rol oynadığı düşünülmektedir. SOD enzimi kofaktör olarak metal iyonu taşımaktadır ve bu metal iyonunun çeşidine göre 3 ana enzim tanımlanmıştır. İnsanda 2 tipi mevcuttur. Sitosolik ve mitokondrial tipleri bulunmaktadır. Sitosolik tipinin yapısında Cu ve Zn içeren dimerik bir form bulunmaktadır (Cu-Zn SOD). Mitokondrial tipinde de tetramerik formda Mn bulunur (MnSOD). Prokaryotlarda bulunan Fe içeren bir izomer daha tanımlanmıştır (71).

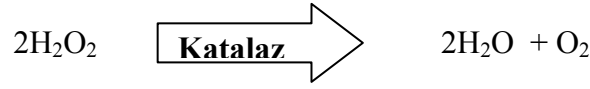
2.6.2 Katalaz

Dört adet hem grubu içeren hemoproteindir. Eritrositler katalaz enzimini yüksek miktarlarda bulundurmaktadır. Katalaz enzimi antioksidan etkinliğin %98'inden fazlasını karşılamaktadır. Hidrojen peroksidi suya ve oksijene indirger. Katalaz enzimi 2 ana mekanizma kullanır: Birincisi oksidatif stresin düşük olduğu dönemlerde peroksidatik reaksiyon, ikincisi ise oksidatif stresin yüksek olduğu dönemlerde katalitik reaksiyondur (72).

Peroksidatif mekanizma;

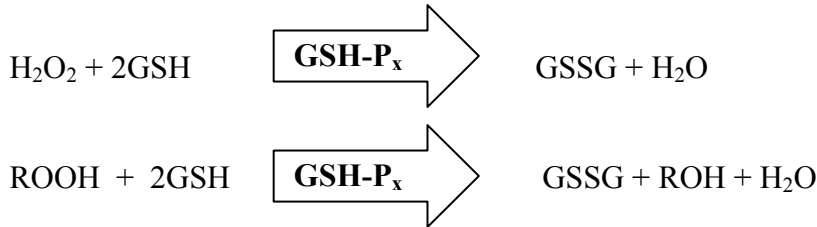


Katalitik mekanizma;



2.6.3 Glutasyon Peroksidaz

Hidrojen peroksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Tetramerik yapıdadır. Dört selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir. Tepkime sonucunda okside glutasyon (GSSG) oluşmaktadır. Enzim aktivitesinin %60-75'i hücrelerin sitoplazmasında, %25-40'ı ise mitokondridedir. Enzim aktivitesi eritrositler ve hepatositlerde çok yüksektir (73,74,75). İntrasellüler lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Ayrıca hücre membranında oluşan lipid peroksidasyonunda da etkilidir. ROT maruziyeti sonrası membranda fosfolipid hidroperoksitler oluşur ve bunları alkole indirgeyerek membran bütünlüğünü korur. Bu enzime de fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGSH-P_x) adı verilir (73,74,75).



Tepkime sonucunda oluşan okside glutasyon, glutasyon redüktazın (GSSG-R) etkisi ile tekrar glutasyona dönüşür.



2.6.4 Sitokrom Oksidaz

Oksidatif fosforilasyonun son basamağıdır ve elektron transport zincirinde bulunur. Bu mekanizma fizyolojik bir mekanizmadır ve ATP üretiminde etkindir (76,77,78).



2.7 Myeloperoksidaz (MPO)

İskemi-reperfüzyon modelinde oluşan PNL hasarının en önemli parametrelerinden biridir. Yapısında –hem- grubu ihtiva etmektedir. PNL'nin hasardaki etkinliği, sentezlediği süperoksit radikallerinden kaynaklanmaktadır. Myeloperoksidaz enzim aktivitesi de süperoksit radikali oluşumunu katalizleyen enzimdir ve NADP'yi kofaktör olarak kullanmaktadır. Yapılan diğer model çalışmalarda ve inflamasyonda MPO aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (79).

2.8 Malondialdehit (MDA)

ROT'un en önemli etkisi hücre zarı hasarıdır. Bu hasarı membran yapısında bulunan lipidleri peroksidederek göstermektedir. İlerleyici hasar sonrası savunma mekanizmaları yetersiz kaldığında hücre zarı parçalanır ve hücre ölümü gerçekleşir. Lipid peroksidasyonu lipid molekülleri arasındaki iki ansatüre bağ arasında yerleşmiş metilen grubundan H atomunun çıkarılması ile lipidlerin denatüre olmasıdır. Oluşan lipid peroksit, oksijen varlığında peroksit ve hidroperoksite, sonra da daha kararlı bir molekül olan malondialdehite kadar yıkılır. Malondialdehit lipid peroksidasyonunun en önemli göstergesidir (80).

2.9 Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α)

Sitokin ailesi içerisinde yer alan polipeptid moleküllerdir. İnflamasyonun en önemli mediatörlerindendir. İnflamasyon sürecinde mononükleer fagositlerden ve T-lenfositlerden sentez edilmektedir. Makrofajlardan sentezlenmesinde en kuvvetli uyaran lipopolisakkaritlerdir. T lenfositler ve doğal öldürücü (NK) hücreler, INF- γ salgılayarak TNF- α salınımı artırır. TNF- α , inflamasyon bölgesine fagositer hücreleri çeker ve IL-1 salınımını artırır. Endotel hücrelerinden adezyon molekülü sentezini artırır ve kemokin salınımını düzenler. Yarılanma ömrü 15–20 dk'dır.

Koagulan mekanizmaları aktive edici etkisi mevcuttur. Eikozanoidlerin ve PAF'ın salınımını artırır (2,7).

2.10 İnterlökin-6

Mononükleer fagositer hücreler, vasküler endotelial hücreler, fibroblastlar ve daha birçok hücre tarafından sentezlenir. Hepatik iskemi-reperfüzyon modelinde inflamasyon alanında hepatositlerden akut faz reaktanı salınımını tetikler. Myeloid seriyi uyararak lökosit yapımını arttırır. Sentez ve salınımı TNF- α ve IL-1 tarafından artırılmaktadır. IL-6, inflamasyon sürecinde PNL aktivasyonunu artırır ve PNL aktivasyonuna sekonder uzak organ hasarını artırır (7). IL-6 düzeyi yapılan çalışmalarda doku hasarı ile doğru orantılı olarak artış göstermektedir (6,7).

2.11 Adrenomedullin (AM)

Adrenomedullin (AM), ilk olarak 1993 yılında Kitamura ve arkadaşları tarafından bazı peptidlerin trombosit cAMP düzeyleri üzerine olan etkisi araştırılırken feokromasitoma hücrelerinden elde edilmiştir. Sonraki yıllarda birçok klinik durumda AM düzeyleri ölçülmüş, ilk AM reseptörleri tanımlanmış ve endokrinoloji başta olmak üzere tıbbın birçok alanında araştırmalar yapılmıştır (81,82,83). Moleküler yapısında 16. ve 21. karbonlarında birbirine tek disülfid bağıyla bağlı 52 aminoasitten oluşan bir polipeptittir. AM büyük bir öncül molekülün bir parçası olarak sentezlenir ve 185 aminoasitten oluşan bu yapıya proadrenomedullin (PAMP) adı verilmektedir.

AM yapısal olarak, güçlü bir hipotansif ve de vazodilatatör olan CGRP(Kalsitonin Geni İlişkili Peptit)'ye benzerlik göstermesi sebebi ile bu familyaya dahil edilmiştir ve aynı reseptörler üzerinden etkinlik göstermektedir (84,85,86).

AM kodlayan DNA lokusu rat ve insan hücrelerinde tespit edilmiştir (87). Vasküler düz kas ve vasküler endotel hücrelerinde mRNA düzeyi ölçülerek AM'nin diğer dokulara göre oldukça yüksek miktarda sentezlendiği bulunmuştur (88,89). İlk olarak adrenal medullada tespit edilmekle birlikte, kardiyak ventriküller, böbrekler,

akciğerler ve vasküler membranlarda da AM sentezlenmektedir. Buradan yola çıkarak bu peptidin, nitrik oksit (NO) ve endotelin gibi, vasküler endotel ve vasküler düz kas hücrelerinin salgısal bir ürünü olduğu düşünülmüştür (81,82,85).

Yapılan deneylerde insan vücudunda AM düzeyi 1–10 pM (pikomol) tespit edilmiş ancak Hata ve arkadaşları bu değerlerin çok çok üstünde değerler tespit etmişlerdir. Ayrıca yapılan çalışmalarda AM düzeyi yüksek bulunmasına rağmen plazma konsantrasyonunu düzenleyen faktörler tam olarak ortaya konamamıştır (90).

Yapılan çalışmalarda gebelik de dahil olmak üzere hipertansiyonla seyreden birçok hastalıkta ve sepsis, şok gibi sistemik hastalıklarda AM düzeyi artmış olarak tespit edilmiştir (91).

AM ilk tespit edildiğinde kardiyovasküler etkileri tanımlanmıştır ancak daha sonraki araştırmalar sadece vazodilatör olmadığını ve AM'nin hücre büyümesi ve farklılaşmasından, hormon sekresyonunun düzenlenmesine ve antibakteriyel etkilere varıncaya dek geniş bir çerçevede etkileri olduğunu göstermiştir. Yapılan deneyler çerçevesinde AM'nin oluşturduğu hipotansif etkinin NO üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir (81,82). AM'nin doz bağımlı olarak hipofiz bezinden ACTH salınımını, adrenal glanddan aldosteron salınımını baskıladığı gösterilmiştir (87).

AM uygulanması kalp hızı ve arteriyel kan basıncını etkilemeksizin, renal kan akımını, idrar çıkışını, glomerüler filtrasyon hızını, idrar sodyum atılımını doza bağımlı yolla artırır ki bu, preglomerüler ve postglomerüler arteriyolar etkisini göstermektedir. Doza bağlı olarak renal arteriollerde vazodilatasyon yapmaktadır (83,92).

AM'nin mezenkimal hücrelerini baskıladığı yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Mezenkimal hücre supresyonunu protein kinaz-A aktivasyonu ile cAMP seviyesini artırmak suretiyle yaptığı düşünülmektedir. MAPK(Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz) inhibisyonu ile birlikte, makrofaj aktivasyonunu, lökosit infiltrasyonunu, mezenkimal hücrelerde ROT üretimini azalttığı saptanmıştır. Doku mezenkimal hücrelerinin AM ile baskılanması sonucu proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IL-1 β 'nin sentezi ve salınımı baskılanmıştır. Sonuç olarak ROT üretimi azalmış ve ROT'a bağlı doku hasarı azalmıştır. İnflamasyonu başlatıcı ve düzenleyici etkileri ile iskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisinde öneme sahip olan sitokinleri baskılaması, AM'nin özellikle reperfüzyon hasarını azaltıcı etkinliğe sahip

olabileceğini düşündürmüştür (96). Ayrıca özellikle hepatik iskemi-reperfüzyon modellerinin patofizyolojisinde mikrosirkülasyonun bozulması, hasarı oluşturan önemli faktörlerden biridir. Vazokonstrüktör ve trombotik ajanlar tarafından mikrosirkülasyonun bozulması hasarı arttırmaktadır. Shimekake ve arkadaşları 1995 yılında, Lang-Rollin ve arkadaşları 2001 yılında AM'nin platelet agregasyonunu baskıladığını deneysel olarak tasarladıkları modellerde göstermişlerdir (94,95). AM'nin in vivo olarak endotelden NO salınımını artırarak platelet agregasyonunu inhibe ettiği düşünülmektedir çünkü NO oldukça güçlü bir antiagregandır. AM'nin vazodilatatör etkinliğine de NO'nun aracılık ettiği düşünülmektedir (94,95). AM'nin vazodilatatör etkisinin, doku mikrosirkülasyonundaki bozukluğu düzeltebileceği düşünülmüştür. Hipoksinin AM sekresyonunu artırdığı tespit edilmiştir (96).

Diabetes mellitusta plazma AM düzeyinin protein kinaz-c'ye bağlı mekanizmalarla artırıldığı tespit edilmiştir (97). AM'nin metabolizması ve klirensi halen tam olarak bilinmemekle birlikte plazma membran enzimlerinden metalloproteinazlar ve aminopeptidazlar tarafından metabolize edildiği düşünülmüştür (81,82,83).

2.12 Adrenomedullin Bağlayıcı Protein-1 (AMBP-1)

İlk olarak 1999 yılında AM'yi bağlayan protein olarak Elsasser ve arkadaşları tarafından bulunmuş ve AMBP-1 olarak adlandırılmıştır (100). Serum proteinleri içerisinde elektrofotometrik yöntemler kullanılarak 120 kDa ağırlığında bir protein olarak ayrıştırılmıştır. Kompleman faktör H ile hemen hemen aynı yapıdadır.

Kanser hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda AMBP-1 ile AM'nin cAMP aracılığı ile hücre proliferasyonunu artırdığı düşünülmüştür. AMBP-1 ekstrahepatik dokularda da sentez edilmekle birlikte temel kaynağının karaciğer olduğu düşünülmektedir (101,102).

AMBP-1'in AM ile birlikte kullanılmasının, AM'nin etkilerini artırdığı düşünülmektedir. AMBP-1 ve AM'nin kombine şekilde uygulandığı sepsis modellerinde proinflamatuvar sitokin oluşumunu baskılayarak sepsise bağlı mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir (102,103).

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Hayvanlar

Çalışmada kullanılacak olan hayvanlar Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edildi. Deneysel hayvanlar Wistar-albino cinsi, sağlıklı, erişkin, erkek, 200–250 gr ağırlığında ratlar kullanıldı. Ratlar deneysel hayvanları laboratuvarlarında ortam ısısı 20-26⁰C olacak şekilde ve 12 saat gece, 12 saat gündüz olan sirkadien ritimde tutuldular. Tüm ratların bakımı, Tıbbi Araştırmalar Ulusal Derneği tarafından biçimlendirilen 'Deneysel Hayvanlarının Bakım Prensipleri'ne ve Laboratuvar Hayvanı Kaynakları Enstitüsü tarafından hazırlanıp Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından yayınlanan (NIH basım NO.85–23,1985 revize edildi) 'Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı için Klavuz' prosedürüne uygun olarak yapıldı. Çalışmamızda Tarım Bakanlığı tarafından çıkarılan ve 16.5.2004 tarih ve 25464 sayılı RG'de yayınlanarak yürürlüğe giren 'Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Deneysel Hayvanlarının Korunması, Deneysel Hayvanlarının Üretim Yerleri İle Deneysel Yapacak Olan Laboratuvarların Kuruluş, Çalışma, Denetleme, Usul Ve Esaslarına Dair Yönetmelik'e ve 5199 sayılı Hayvanları Koruma Kanunu'na uyuldu.

Çalışma protokolü ve deneysel metod Süleyman Demirel Üniversitesi Etik Kurul tarafından onaylandı (Proje No 1605–tu–08).

Çalışmamızda 30 adet rat randomize olarak 3 gruba ayrıldı (n=10).

3.2 Gruplar

Çalışma grupları 3 gruptan oluşmakta idi ve gruplar randomize olarak şöyle belirlendi:

Grup I (Sham Grubu): Bu gruptaki hayvanlara genel anestezi altında sadece laparotomi yapıldı ve 60 dk iskemi, 270 dk'lık reperfüzyon süresi göz önüne alındı ve laparotomi sonrası 5,5 saat sonra sakrifiye edildi. Bu süre zarfında iskemi reperfüzyon uygulanmadı.

Grup II (İ/R, Salin Grubu): Bu gruptaki hayvanlara genel anestezi altında laparotomi yapıldı ve 60 dk iskemi sonrası, 270 dk reperfüzyona alındı. Reperfüzyonun ilk 30 dakikasında salin infüzyonu uygulandı. Süre sonunda hayvanlar sakrifiye edildi.

Grup III (İ/R, AM+AMBP-1 Kom. Grubu): Bu gruptaki hayvanlara genel anestezi altında laparotomi yapıldı ve 60 dk iskemi sonrası, 270 dk reperfüzyona alındı. Reperfüzyonun ilk 30 dakikasında AM ve AMBP-1 kombinasyonu infüzyonu uygulandı. Süre sonunda hayvanlar sakrifiye edildi.

3.3 Anestezi ve Cerrahi Prosedür

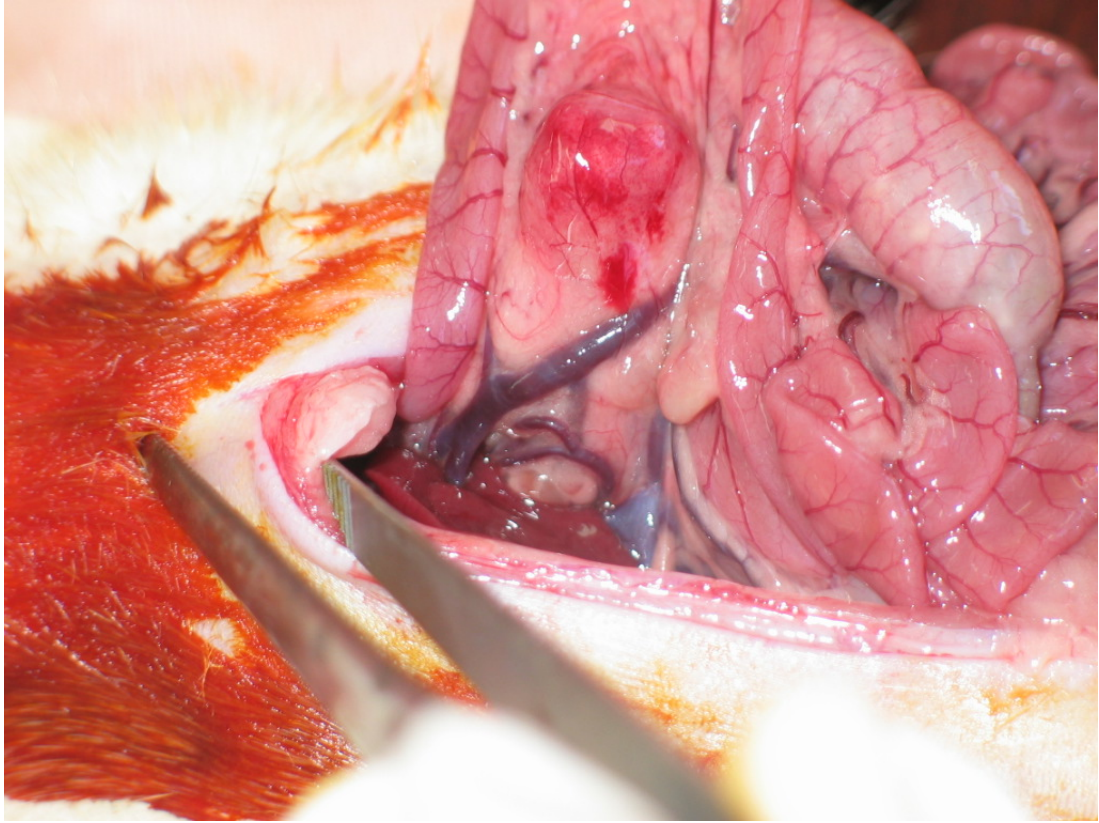
Deney, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretimi & Deneysel Araştırma Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi.

Deneyde kullanılan Wistar-Albino cinsi erkek ratlara cerrahi işlemler, iskemi/reperfüzyon ve sakrifikasyon esnasında genel anestezi uygulandı.

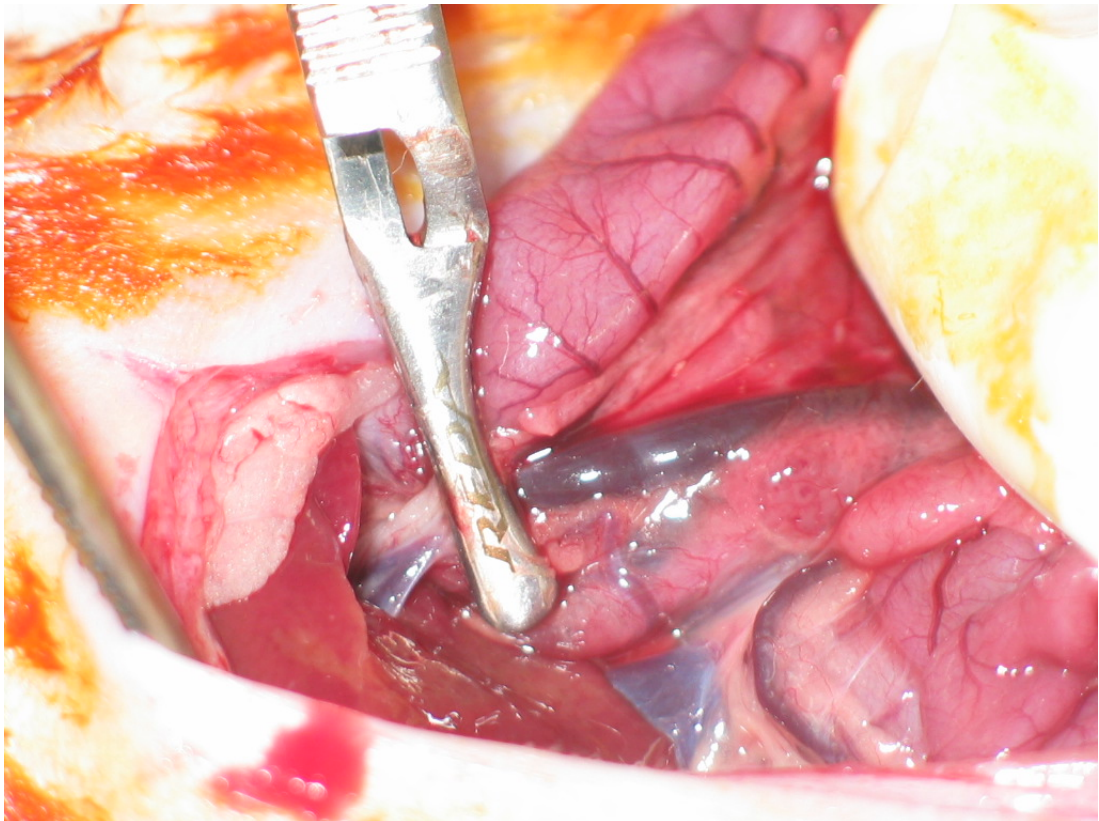
Anestezi protokolünde intraperitoneal olarak 90 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar) ve 10 mg/kg xylazin (Rompun) kombinasyonu kullanıldı. Deney süresi uzun olduğu için başlangıç dozunun 1/3'ü 1 saat aralarla idame olarak tekrarlandı.

Bu çalışma esnasında hayvanlar genel anestezi ile uyutulduktan sonra karın ön duvarındaki tüyleri traş edildi. Traş sonrasında cilt %10'luk povidon-iyot solüsyonu ile temizlendi. Orta hat insizyonu ile cilt ve cilt-altı dokular geçildi ve laparatomisi tamamlandı. Grup I'deki cerrahi işlem sadece laparatomiyi içermekte idi ve laparotomi sonrası 5,5 saat beklendi ve ratlar sakrifiye edildi.

Grup II ve Grup III'de laparotomi sonrasında çekum, hayvanın sol ön ayağına doğru çekilip barsak batın dışına alınacak şekilde traksiyon uygulandı ve karaciğer inferiorunda ve ince barsak mezosunun retroperiton bağlantısının olduğu bölgede portal ven eksplore edildi. Portal ven ve hepatic arter total olarak buldog klempler yardımı ile klempe edildi.

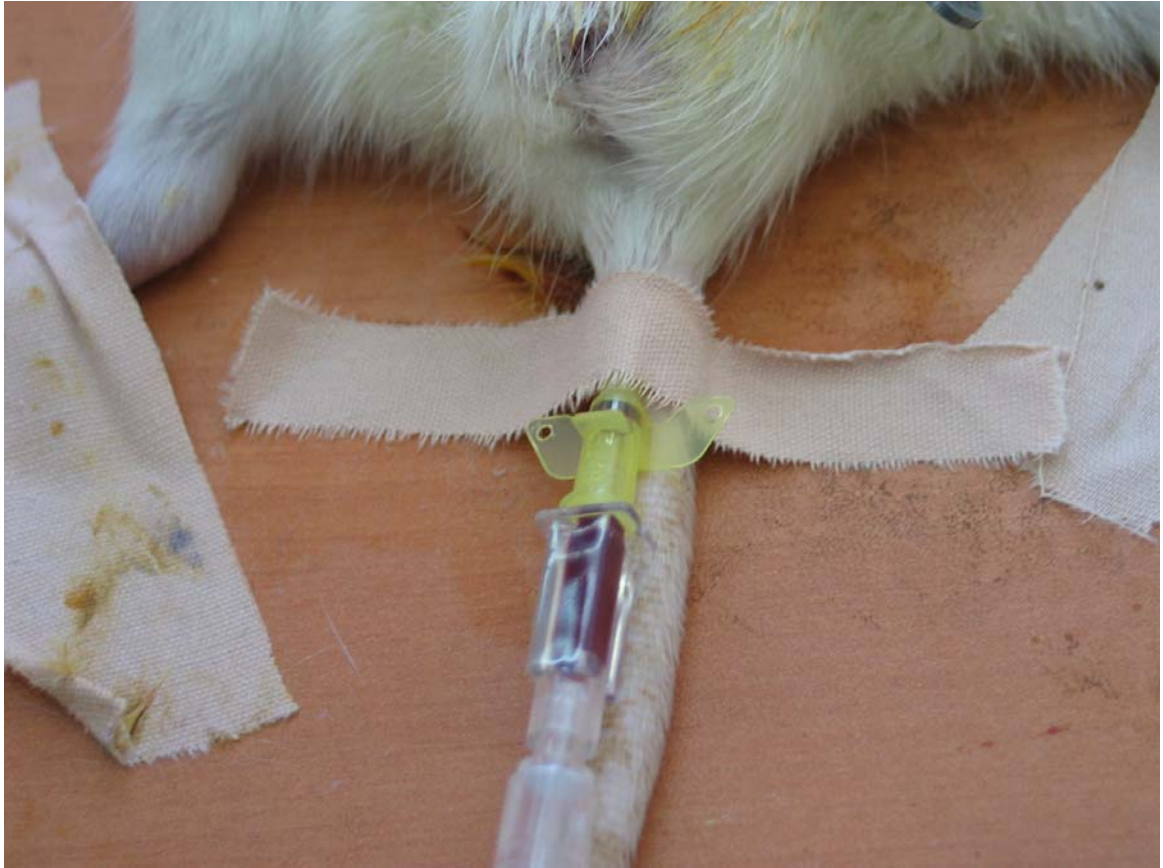


Resim 1: Portal ven ve hepatik arter



Resim 2: Buldog klemple klempe edilen portal ven ve hepatik arter

Grup II ve Grup III'de genel anestezi uygulandıktan sonra iskemi prosedürü uygulanmadan önce hayvanların kateterizasyon işlemi gerçekleştirildi. Cerrahi tahtasında tespit edilmiş hayvanların kuyruk venleri eksplore edildi ve kuyruk cildindeki keratinize doku bistüri ile kürete edildikten sonra kuyruk 40⁰C sıcak su içinde 2 dk bekletildi. Sıcak tatbiki ile dilate edilen kuyruk venleri B-Cat iv 24 G branül ile kateterize edildi.



Resim 3: Ratın kuyruk veni kateterizasyonu

Grup II'de laparotomi yapıp buldog klepler vasıtası ile 60 dk'lık hepatik iskemi tamamlandıktan sonra portal vendeki buldog klemp açıldı. Kuyruk veninden takılan kateter vasıtası ile 2 ml SF perfüzyatör yardımı ile 30 dk süreyle infüze edildi. SF infüzyonundan sonra 4 saat süreyle reperfüzyona devam edildi. Reperfüzyonun 270. dk'sında hayvanlar sakrifiye edildi.

Grup III'de laparotomi yapıp buldog klepler vasıtası ile 60 dk'lık hepatik iskemi tamamlandıktan sonra portal vendeki buldog klemp açıldı. Kuyruk veninden takılan kateter vasıtası ile AM ve AMBP-1 kombinasyonu, AM (12 µg/kg) ve AMBP-1 (40 µg/kg) olacak şekilde SF ile sulandırılarak hazırlanan 2 ml solüsyon 30

dk boyunca infüze edildi. İnfüzyon sonrası 4 saat reperfüzyonda tutulan ratlar 4. saat sonunda sakrifiye edildi.

Tüm gruptaki hayvanlarda sakrifikasyon esnasında laparotomiye torakotomi de eklendi. Çıkan aorta kesildi ve ratların hemorajiden ölmesi sağlandı. Tüm gruptaki toplam 30 hayvanın akciğer ve karaciğer dokuları total çıkarıldı.

Alınan dokular cam deney tüplerine tampon fosfat solüsyonu eşliğinde konuldu ve biyokimya laboratuvarlarında incelenene kadar -80°C 'de saklandı.

Histolojik inceleme için sakrifikasyonda çıkarılan akciğer ve karaciğer dokularının geri kalan kısmı SF ile yıkandıktan sonra 3–4 mm'lik kesitler alınarak %10'luk formaldehit ile dolu cam deney tüplerine alındı.

3.4 Kullanılan Malzemeler ve Aletler

1- Soğutmalı santrifüj:	Eppendorf MR 5415 (Almanya)
2- Santrifüj:	Jouan B4İ (Fransa)
3- Derin Dondurucu:	Uğur (Türkiye)
4- Hassas Terazisi:	Scaltec SPB 33 (İsviçre)
5- Vorteks:	Nüve NM 100 (Türkiye)
6- Otomatik Pipetler:	Eppendorf (Almanya), Gilson(Fransa)
7- Spektrofotometre:	Shimadzu UV 1601 (Japonya)
8- Sonikatör:	Bandelin Sonoplus (Almanya)
9- Ph metre:	Hanna Instruments (Portekiz)
10- Manyetik karıştırıcı:	Nüve (Türkiye)
11- Eliza Cihazı:	Biotek Instruments (A.B.D.)
12-Homojenizatör:	Ultra Turrax T25 (Almanya)
13- Biyokimya Analizatörü:	Olympus AU2700 (Japonya)
14- İnfüzyon Pompası:	Fresenius Kabi (Almanya)
15- Deneysel Cerrahi Seti:	Tekno (Almanya)
16- Buldog Klemp:	Reda
17- İnfüzyon seti:	Bıçakcılar (Türkiye)

3.5 Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.5.1 MPO Tayininde Kullanılan Elisa Kiti

MPO tayini için Hycult Biotechnology b.v. Rat MPO elisa kit (Netherlands) kullanıldı. Katalog no: HK105, Lot number:3318K19. MPO ölçümü için birim olarak ng/ml kabul edildi.

3.5.2 TNF- α Tayininde Kullanılan Elisa Kiti

TNF- α tayini için Biosource İnvitrogen İmmunoassay Rat TNF- α elisa kit (USA) kullanıldı. Katalog no: KRC3011, Lot Number: 400051A. TNF- α ölçümü için birim pg/ml kabul edildi.

3.5.3 IL-6 Tayininde Kullanılan Elisa Kiti

IL-6 tayini için Biosource İnvitrogen İmmunoassay Rat IL-6 elisa kit (USA) kullanıldı. Katalog no: KRC 0061, Lot number: 372633E. IL-6 ölçümü için birim pg/ml kabul edildi.

3.5.4 MDA Tayininde Kullanılan Kimyasal Maddeler

- | | |
|------------------------------|------------------|
| 1- Triklorasetik asit (TCA) | MERCK (Almanya) |
| 2- Tiyobarbitürik asit (TBA) | MERCK (Almanya) |

3.5.5 SOD Tayininde Kullanılan Kimyasal Maddeler

- | | |
|--------------------------------------|-----------------|
| 1- Potasyum dihidrojen fosfat | Merck (Almanya) |
| 2- Disodyum hidrojen fosfat dihidrat | Merck (Almanya) |
| 3- CAPS | Sigma (Almanya) |
| 4- Iodonitrotetrazolyum violet | Sigma (Almanya) |
| 5- Ksantin | Merck (Almanya) |

6- Ksantin oksidaz	Sigma (Almanya)
7- Titripleks III	Merck (Almanya)

3.6 Kullanılan Çözeltiler

3.6.1 MDA Tayininde Kullanılan Çözeltiler

1- TCA çözeltisi (% 10): 10 gr TCA tartılıp, distile suda çözündürülür ve miktar yine distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

2- TBA çözeltisi (% 67): 0.67 gr TBA tartılıp, bir miktar distile suda eritilir ve son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

3.6.2 SOD Tayininde Kullanılan Çözeltiler

1- Kümen hidroperoksit çözeltisi (0.18 mM): Kümen hidroperoksitten 1.62 µl alınır, 50 ml distile su ile seyreltilir. Çözelti günlük hazırlanır.

2- Glutasyon çözeltisi (4 mM): 0,0614 gr glutasyon tartılır ve hacmi 50 mM fosfat tamponu (pH: 7,2 olan ve 4,3 mM EDTA içeren) ile 50 ml'ye tamamlanır.

3- Glutasyon redüktaz ($\geq 0,5$ U/L): 10 µl glutasyon redüktaz alınır, 10 ml distile su ile seyreltilir. Bundan 50 µl çekilip, 50 mM fosfat tamponu (4,3 mM EDTA içeren ve pH: 7,2 olan) ile 50 ml'ye seyreltilir. Çözelti günlük hazırlanır.

4- β - NADPH çözeltisi (0,34 mM): 0,0116 gr β -NADPH tartılıp hacmi 50 mM tamponu (pH: 7,2 olan ve 4,3 mM EDTA içeren) ile 50 ml'ye tamamlanır.

3.7 Yöntem

3.7.1 MPO Aktivitesinin Ölçümü

Kalibratör, kontrol ve örnekler için yeterli sayıda mikroplate hazırlandı. Mikroplate üzerindeki kuyucuklara 100'er µl kalibratör ve örnek pipetlendi. Altmış dakika süresince oda ısısında enkübe edildi. Bütün kuyucuklar 200 µl yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Her kuyucuğa 100 µl tracer eklendi. Altmış dakika

süresince oda ısısında enkübe edildi. Tekrar kuyucuklar 200 µl yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Kuyucuklara 100 µl streptavidin-peroxidase conjugate eklendi. 60 dk oda ısısında enkübe edildikten sonra tekrar kuyucuklar 200 µl yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı ve 100 µl TBM substrat eklendi ve 25 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 100 µl stop solüsyonu eklendi. Daha sonra 450 nm'de elisa okuyucusunda (ELX 808 ultramicroplate reader BİOTEK INSTRUMENTS, A.B.D) optik dansitesi okutularak sonuçlar ng/ml olarak elde edildi. Elde edilen sonuçlar doku protein düzeyine bölünerek ng/mg protein olarak hesaplandı.

3.7.2 TNF- α Seviyesinin Ölçümü

Kalibratör, kontrol ve örnekler için yeterli sayıda örnekler hazırlandı. Tüm kuyucuklara 50 µl inkubasyon buffer eklendi. Yüz µl standart, kontrol ve örnek pipetlendi. Elli µl TNF- α biyotin konjugate, 90 dk oda ısısında konjuge edildi. Kuyucuklar 400 µl yıkama solüsyonu ile 4 kere yıkandı. Yıkamadan sonra 100 µl streptavidine-HRP solüsyonu eklendi. 45 dk oda ısısında enkübe edildi. Kuyucuklar 400 µl yıkama solüsyonu ile 4 kere tekrar yıkandı. Yıkama sonrasında 100 µl stabilized chromogen eklendi. Kit 30 dk karanlıkta ve oda ısısında bekletildikten sonra 100 µl stop solüsyonu eklendi. Örnekler 450 nm'de elisa cihazında okutuldu.

3.7.3 IL-6 Seviyesinin Ölçümü

Elisa kiti için kalibratör, kontrol ve örnekler yeterli sayıda hazırlandı. Bütün kuyucuklara 100 µl standart diluent buffer eklendikten sonra 100 µl kalibratör, kontrol ve örnek pipetlendi. Kit 120 dk süresince ve 37⁰C'de enkübe edildi. Kuyucuklar 400 µl yıkama solüsyonu ile 4 kere yıkandı. Yıkama sonrası bütün kuyucuklara 100 µl IL-6 biyotin konjugate eklendi. Kit 60 dk oda ısısında enkübe edildi. Enkübasyon sonrası kuyucuklar tekrar 400 µl yıkama solüsyonu ile 4 kere yıkandı. Yıkamadan sonra 100 µl streptavidine-HRP solüsyonu eklendi. Otuz dk oda ısısında enkübe edildi. Kit tekrar 400 µl yıkama solüsyonu ile 4 kere yıkandı. Yıkamadan sonra 100 µl stabilized chromogen eklendi ve 30 dk karanlıkta ve oda

ısısında bekletildikten sonra 100 µl stop solüsyonu eklendi ve 450 nm'de elisa cihazında okutuldu.

3.7.4 MDA Seviyesinin Ölçümü

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA, Draper ve Hadley'in çift kaynatmalı tiyobarbitürik asit reaktivitesi metodu kullanılarak ölçüldü.

Deneyin Prensipleri:

Yağ asidi peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, TBA ile reaksiyona girerek, 532 nm'de maksimum absorbanı veren renkli bir kompleks oluşturur.

Deneyin Yapılışı:

0,5 ml serum üzerine 2,5 ml %10'luk TCA eklenerek karıştırıldı. 15 dk kaynatılıp soğutuldu. 5000 devir/dk'da 10 dk santrifüj edildi. 2 ml süpernatant alınıp, üzerine 1 ml %0,67'lik TBA eklendi. Tüpler karıştırıldıktan sonra 15 dk kaynatıldı ve hemen soğutuldu. 532 nm'de absorbanları, numune yerine distile su konularak hazırlanan köre karşı okundu.

Sonuçlar, MDA-TBA kompleksinin 532 nm'deki ekstinsiyon katsayısından ($1,56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) yararlanılarak nanomol/mg protein olarak hesaplandı:

$$A = a \times b \times c$$

$$c = A / a \times b$$

$$c = \frac{A \text{ mol cm} \times 1 \times 10^9 \text{ nmol} \times \text{L}}{1,56 \times 10^5 \text{ L cm mol } 10^3 \text{ ml}}$$

$$c \text{ (nmol/ml)} = A \times 57,69$$

$$c \text{ (nmol/ml)} = A \times 57,69$$

A= Absorbans

A= Eksitasyon katsayısı

b= Işık yolu

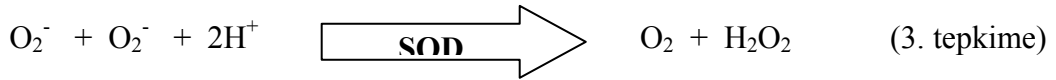
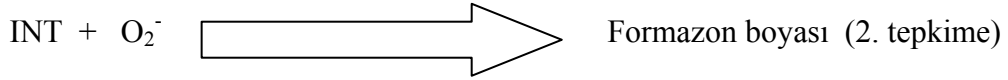
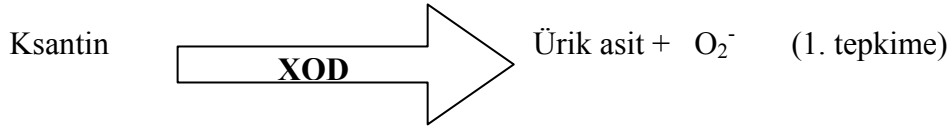
c= Konsatrasyon

3.7.5 SOD Aktivitesinin Ölçümü

Deneyin prensibi Sun ve arkadaşlarının metoduna dayanmaktadır.

Deneyin Prensibi:

Süperoksit radikali çeşitli mekanizmalarla fizyolojik ya da patolojik yollarla hücre düzeyinde üretilmektedir. Oluşan süperoksit radikali SOD yardımı ile H_2O_2 'ye indirgenmektedir (3. tepkime). Ksantin-ksantin oksidaz (XOD) sistemi tarafından üretilen O_2^- radikalinin (1. tepkime), 2-(4-iyodofenil)-3-(4-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorit (INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazon boyasının (2. tepkime), 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyona dayanan optik dansitedeki azalmadan yararlanarak, reaksiyonun % inhibisyonu belirlendi.



Deneyin Yapılışı:

RANDOX-RANSOD hazır kitin Olympus AU2700 Otoanalizatörüne uplike edilmesine çalışıldı. Sonuçlar U/ml olarak elde edildi.

3.8 Homojenizasyon

3.8.1 Akciğer ve Karaciğer Dokusu Homojenizasyonu

Ratların donmuş akciğer örnekleri 500 mg tartıldıktan sonra 4,5 ml pH 7,4'deki %0,05 sodyum azid içeren 100 mmol/L'lik fosfat tamponunda homojenizatörle (Ultra-Turrax T '%, Almanya) 1 dk süreyle buz banyosu içerisinde homojenize edildi. İşlem sonunda elde edilen %10'luk homojenatlar 30 sn süreyle buz banyosu içerisinde sonike edildi (Bandelin Sonoplus UW 2070, Almanya). Örnekler daha sonra 3500 devirde, +4 °C'de soğutmalı santrifüjde (Eppendorf MR 5415, Almanya) 10 dk süreyle santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Süpernatantların protein miktarı Lowry metoduna göre ölçüldü. Daha sonra süpernatantlardan MPO, TNF- α , IL-6, MDA, SOD düzeyleri ölçüldü.

3.9 Doku Örneklerinin Histopatolojik İncelemesi

3.9.1 Doku Örneklerinin Hazırlanması

%4'lük paraformaldehit solüsyonunda, immersiyon fiksasyon yöntemi uygulanan doku örnekleri tespitten sonra bir gece akan suda yıkama işlemine tabi tutulduktan sonra aşağıda gösterilen işlemlerden geçirildi.

A) Dehidratasyon

<u>Alkol derecesi</u>	<u>Süre</u>
%70	1 gece
%80	1 saat
%90	1 saat
%96	1 saat
%100	1 saat
%100	1 saat

B) Şeffaflandırma

<u>Alkol</u>	<u>Süre</u>
Ksilol	1/2 saat
Ksilol	1/2 saat

C) Emdirme

Ksilol+parafin (60 °C etüvde)	15 dakika
Parafin (60 °C etüvde)	4 saat

D) Gömme

4 saatin ardından doku örnekleri parafin bloklara gömüldü.

3.9.2 Doku Örneklerinin Değerlendirmesi

Hazırlanan parafin bloklardan, Leica tipi kızaklı mikrotom kullanılarak 4–5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Histolojik değerlendirme için preparatlar Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Boyanan örnekler Olympus BX50 tipi binoküler mikroskopta incelendi ve fotoğraflar elde edilerek değerlendirildi.

Değerlendirmede hasarı belirlemek için skorlama sistemi kullanıldı. Elde edilen dokular hiperemi ve konjesyon, nötrofil marjinasyonu ve doku infiltrasyonu, doku içi hemoraji ve debris, sellüler hiperplazi olmak üzere 4 ana patoloji ele alınarak değerlendirildi. Değerlendirmede her bir preparata yukarıdaki sözü edilen parametreler doğrultusunda (yok, hafif, orta ve şiddetli olmak üzere) sırasıyla 0'dan 3'e kadar puanlandı ve doku hasarı skorlandı (105).

3.9.3 Doku Örneklerinin İmmünohistokimyasal Hazırlanması

İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü:

Parafin bloklara gömülü örneklerden Poly-L-Lisin kaplı lamlara 4–5 µ'luk kesitler alındı. Bir gece oda ısısında kurumaya bırakılan kesitlere aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. Ksilol 5 dk x 3 kez
2. Alkol %100'lük 3 dk

- | | |
|------------------|------|
| 3. Alkol %96'lık | 3 dk |
| 4. Alkol %90'lık | 3 dk |
| 5. Alkol %80'lik | 3 dk |
| 6. Alkol %70'lik | 3 dk |
| 7. Distile su | 5 dk |

Dokudaki maskelenmiş antijenlerin açığa çıkartılması için kesitler pH'ı 6,0'a ayarlanmış Sodyum Sitrata tamponunda 600 W'a ayarlı mikrodalga fırında 1 dk ısıtıldı. Oda ısısında 20 dk soğumaya bırakılan kesitler ardından üç kez birer dk boyunca PBS'de bekletildi. Kullanılan PBS solüsyonları her aşamada yenilendi.

Endojen peroksidaz aktivitesinin önlenmesi için kesitler %3'lük Hidrojen peroksitte oda ısısında 10 dk bekletildi. Sonrasında yine üç kez birer dk boyunca PBS'te yıkandı.

Lam üzerindeki kesitlerin çevresi Pap Pen ile çevrilerek kimyasalların birbirine karışması engellendi. Bu işlem sonraki aşamalarda gerek oldukça tekrarlandı.

Fon boyanmasını engellemek için kesitlerin üzerine Ultra V Block (Labvision) damlatılarak 5 dk bekletildi. Solüsyon kurutma kağıdı ile dokulardan uzaklaştırılıp yıkama yapılmadan primer antikor ile boyamaya geçildi.

Kesitler üzerine 1:600 oranında dilüe edilmiş Rabbit anti-Adrenomedullin antikor (Peninsula Laboratories, LLC) damlatıldı. Kontrol amacıyla her lam üzerindeki bir örneğe de primer antikor yerine aynı ölçüde dilüe edilmiş sekonder antikor damlatıldı. Kesitler +4 °C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün PBS'te üç kez üçer dk boyunca yıkama yapıldı.

Kesitlere 1:200 oranında dilüe edilmiş biyotin bağlı goat anti-rabbit (Santa Cruz) antikor damlatılarak primere tutunması sağlandı. 10 dk sonra kesitler yine üç kez üçer dk boyunca PBS ile yıkandı.

Biyotinli sekonder antikora tutunması için kesitlere Sterptavidin Horseradish Peroksidaz (Labvision) solüsyonu damlatılarak 10 dk bekletildi. Yine PBS'te üç kez üçer dk boyunca yıkama yapıldı.

Antikoru görünür kılmak için örnekler DAB solüsyonu (Labvision) damlatılarak 10 dk beklendi. PBS ile yeniden aynı şekilde yıkama yapıldı.

Zıt boyama için örnekler Mayer Hematoksilen (J.T. Baker) ile 30 sn boyanarak önce bir dk için PBS'e ardından iki kez üçer dk çeşme suyunda yıkamaya alındı.

Sırasıyla %70'lik, %80'lik, %90'lık, %96'lık ve %100'lük alkollere batırılıp çıkarılan örnekler iki kez ksilolden geçirilerek entellan ile kapatıldı.

3.9.4 Doku Örneklerinin İmmünohistokimyasal Değerlendirmesi

Sham, AM+AMBP-1 ve salin gruplarında yapılan immünohistokimyasal boyamalar sonucunda akciğer ve karaciğer dokularında AM'nin bulunduğu bölgeler belirlendi. Boyamalar incelenirken aynı lam üzerindeki primer antikora damlatılmadan aynı işlemlerden geçirilen kontrol kesitleri temel alınarak inceleme yapıldı. Karaciğer ve akciğer yoğun kan akışı bulunan organlar olduğundan, özellikle kan hücrelerinde yoğun olarak gözlenen endojen peroksidaz aktivitesinden dolayı eritrositlerde meydana gelen pozitif boyanmalar inceleme sırasında dikkate alınmadı. Boyanma sonuçları doku tipine göre aşağıda özetlenmiştir.

Akciğer dokusunda; bronş ve bronşiyol epitelinde, özellikle epitel hücrelerinin apikal yüzeyinde yoğunlaşmış şekilde pozitif boyanma görüldü. Ayrıca alveollerde, pneumositlerin de pozitif boyandığı belirlendi. Gerek alveoller gerekse bronş ve bronşiyollere ait interstisyel bağ dokusunda boyanma gözlenmedi. Ancak, geniş çaplı damarların adventisyasında pozitif boyanma görüldü. Deney grupları arasında istatistiksel değerlendirme yapılmamasına rağmen genel gözlem sonucunda kontrol grubunun çoğunlukla (+), AM+AMBP-1 gruplarında (++), salin grubunda ise genelde (+++) boyanma yoğunluğu tespit edilmiştir.

Karaciğerde yapılan incelemelerde hem santral venlerde hem de portal alanlarda boyanma gözlenmiştir. Boyanma, portal alanlarda arter ve venlerin adventisyası ile santral venlerin adventisyası olarak belirlenmiştir. Bağ dokuda boyanmanın gözlendiği bölgeler yalnızca damar adventisyası ile sınırlı kalmış, bunun dışında gerek bağ doku artışı gözlenen bölgelerde gerekse inflamasyonun gözlendiği bölgelerde pozitif boyanma saptanmamıştır. Deney grupları arasında boyanma

yoğunluğu açısından herhangi bir fark gözlenmemiş, istatistiksel değerlendirme de yapılmamıştır.

3.10 İstatistiksel Analiz

Oluşturmuş olduğumuz iskemi-reperfüzyon modelinde yapılan çalışmalar sonucu elde edilen biyokimyasal parametreler ile histopatolojik olarak puanlanmış doku hasar skorları “SPSS 15 for Windows” paket programı kullanılarak incelendi. Biyokimyasal parametreler Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Histopatolojik doku hasar skorları Independent-Samples T testi kullanılarak yapıldı. Her iki testte de $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Oluşturmuş olduğumuz karaciğerde iskemi-reperfüzyon modelinde elde edilen doku örnekleri biyokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirildi. Rat modelinde oluşturulmuş olan iskemi-reperfüzyon hasarında beş farklı biyokimyasal hasar parametresi akciğer ve karaciğer dokusunda ayrı ayrı ölçüldü. Tüm grupların karaciğer dokusunda hasar parametrelerinin düzeyi Tablo 1’de sunuldu.

Tablo 1: IL-6, TNF- α , MPO, MDA ve SOD'nin Grup 1 (Sham grubu), Grup 2 (İ-R/Salin) ve Grup 3 (İ-R/AM+AMBP-1)'de karaciğer dokularındaki düzeyleri.

Gruplar		IL-6	TNF- α	MPO	MDA	SOD
G1	Sham 1	480,908	622,566	408,029	0,107	6,35
G1	Sham 2	374,012	793,265	330,03	0,156	7,29
G1	Sham 3	321,442	890,975	389,966	0,238	7,601
G1	Sham 4	454,966	956,697	289,069	0,165	6,742
G1	Sham 5	433,762	793,364	272,198	0,134	7,054
G1	Sham 6	333,327	566,691	253,878	0,154	6,965
G1	Sham 7	364,399	914,731	308,702	0,139	6,935
G1	Sham 8	497,65	826,169	526,77	0,16	6,019
G1	Sham 9	324,382	715,172	496,824	0,158	6,316
G1	Sham 10	228,933	515,505	382,592	0,189	6,01
G2	İ-R / Salin 1	1146,205	1452,84	531,05	0,131	7,009
G2	İ-R / Salin 2	1036,361	995,886	676,173	0,377	6,823
G2	İ-R / Salin 3	949,134	1066,281	604,567	0,611	6,399
G2	İ-R / Salin 4	743,972	1048,082	370,122	0,45	7,117
G2	İ-R / Salin 5	805,467	1050,422	391,839	0,241	6,344
G2	İ-R / Salin 6	1240,272	1673,701	655,534	0,944	6,68
G2	İ-R / Salin 7	979,507	1243,637	601,405	0,627	6,866
G2	İ-R / Salin 8	927,788	1128,67	692,712	0,228	6,139
G2	İ-R / Salin 9	951,719	1356,478	772,076	0,325	6,751
G2	İ-R / Salin 10	971,936	1194,377	551,52	0,45	8,033
G3	İ-R / AM+AMBP-1 Kom.1	811,243	1109,525	522,072	0,286	7,029
G3	İ-R / AM+AMBP-1 Kom.2	891,483	1156,168	478,615	0,126	5,998
G3	İ-R / AM+AMBP-1 Kom.3	704,721	1054,714	346,167	0,173	7,985
G3	İ-R / AM+AMBP-1 Kom.4	745,612	1039,1	512,533	0,258	6,131
G3	İ-R / AM+AMBP-1 Kom.5	544,921	1101,106	358,861	0,266	5,873
G3	İ-R / AM+AMBP-1 Kom.6	815,854	1071,233	487,462	0,288	5,852
G3	İ-R / AM+AMBP-1 Kom.7	834,677	1133,693	549,156	0,247	7,053
G3	İ-R / AM+AMBP-1 Kom.8	816,098	1254,528	587,555	0,403	7,374
G3	İ-R / AM+AMBP-1 Kom.9	689,267	980,944	476,464	0,337	6,914
G3	İ-R / AM+AMBP-1 Kom.10	699,155	1109,632	636,815	0,376	7,322

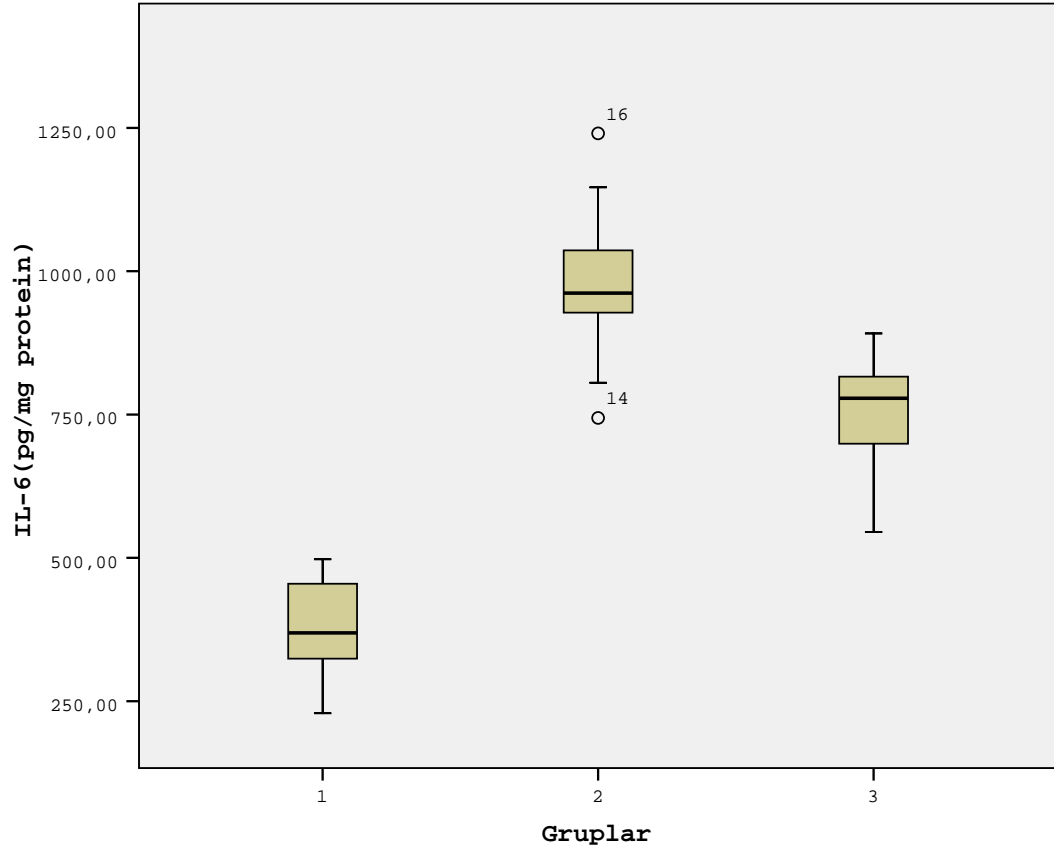
Tüm grupların akciğer dokusunda hasar parametrelerinin düzeyi Tablo 2’de sunuldu.

Tablo 2: IL-6, TNF- α , MPO, MDA ve SOD’nin Grup 1 (Sham grubu), Grup 2 (İ-R/Salin) ve Grup 3 (İ-R/AM+AMBP-1)’ün akciğer dokularındaki düzeyleri.

	Grup	IL-6	TNF- α	MPO	MDA	SOD
G1	Sham 1	121,754	103,703	908,051	1,379	7,34
G1	Sham 2	95,938	112,095	874,881	1,496	4,117
G1	Sham 3	104,375	72,469	1016,296	1,202	3,331
G1	Sham 4	99,517	67,875	920,501	1,378	3,729
G1	Sham 5	90,499	61,333	1020,663	1,358	4,569
G1	Sham 6	102,246	57,952	900,546	1,083	5,002
G1	Sham 7	92,598	57,734	947,801	0,726	4,369
G1	Sham 8	76,909	48,352	820,839	0,669	8,214
G1	Sham 9	78,698	69,066	1199,453	0,878	4,913
G1	Sham 10	97,621	118,394	978,667	1,221	3,706
G2	İ-R / Salin 1	227,902	278,44	2283,364	2,748	8,854
G2	İ-R / Salin 2	211,228	198,294	1844,599	1,916	7,754
G2	İ-R / Salin 3	169,936	112,063	1666,343	1,631	5,398
G2	İ-R / Salin 4	230,277	151,733	2189,13	2,019	7,575
G2	İ-R / Salin 5	205,599	172,293	2132,595	2,038	6,568
G2	İ-R / Salin 6	240,723	151,704	2129,661	2,186	9,433
G2	İ-R / Salin 7	218,901	169,802	2243,265	1,737	7,605
G2	İ-R / Salin 8	169,894	107,534	2150,02	2,935	7,284
G2	İ-R / Salin 9	182,605	97,757	2424,982	2,695	7,848
G2	İ-R / Salin 10	168,144	118,686	2162,889	2,173	7,667
G3	İ-R / AM +AMBP-1 Kom.1	191,263	156,729	1573,466	1,782	7,199
G3	İ-R / AM +AMBP-1 Kom.2	217,287	209,981	1910,68	2,339	9,883
G3	İ-R / AM +AMBP-1 Kom.3	143,496	94,792	2165,204	2,406	10,117
G3	İ-R / AM +AMBP-1 Kom.4	124,252	125,578	1733,873	1,716	8,936
G3	İ-R / AM +AMBP-1 Kom.5	144,9	88,909	2127,368	1,679	9,625
G3	İ-R / AM +AMBP-1 Kom.6	187,06	74,615	2010,095	1,79	5,811
G3	İ-R / AM +AMBP-1 Kom.7	131,41	105,657	1809,982	1,318	5,39
G3	İ-R / AM +AMBP-1 Kom.8	157,302	89,736	1681,827	1,649	5,324
G3	İ-R / AM +AMBP-1 Kom.9	214,393	75,593	1896,517	1,682	6,388
G3	İ-R / AM +AMBP-1 Kom.10	170,809	70,807	2172,964	1,371	7,09

İnterlökin-6 (IL-6):

Karaciğer dokusunda her üç grupta da ölçülen median IL-6 düzeyleri şekil 4’de gösterildi.



Şekil 4: Grupların karaciğer dokusundaki median IL-6 düzeylerinin boksör torbası grafiğinde gösterilmesi. Yatay çizgiler doksanıncı, yetmişbeşinci, ellinci (median) ve onuncu pörsentilleri göstermektedir.

Karaciğer dokusunda her üç grubun da karşılaştırmalı Mann-Whitney U testinde grupların ortalama IL-6 değerleri tespit edildi ve tablo 3’de sunuldu.

Tablo3: Her 3 grubun karaciğer dokusunda IL-6 düzeyleri

Gruplar	IL-6 düzeyleri	Birim
Grup 1	381.378±84.535	pg/mg protein
Grup 2	975.236±144.925	pg/mg protein
Grup 3	755.303±99,868	pg/mg protein

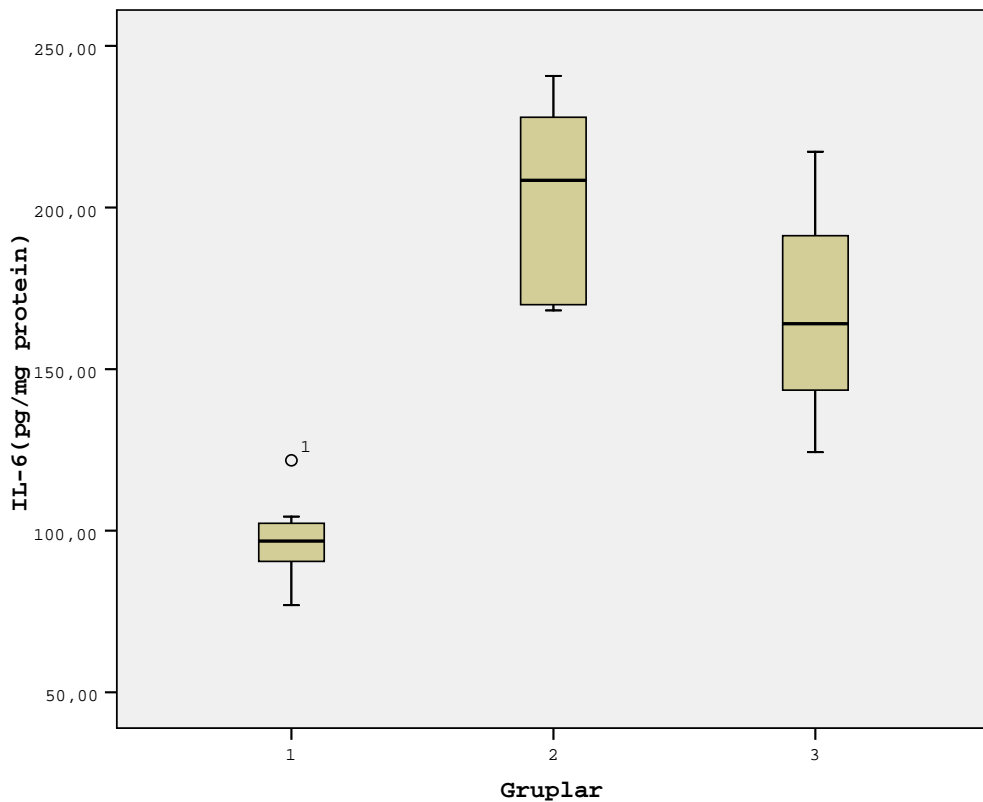
Gruplar arası karşılaştırmalarda ($p < 0,05$) anlamlı kabul edildi.

Grup 1 ile grup 2 karşılaştırıldığında ($p = 0.000^a$) grup 2’de IL-6 düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edildi.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p = 0.002^a$) grup 3’te IL-6 düzeyinde grup 2’ye göre anlamlı bir düşüş tespit edildi.

Grup 1 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p = 0.000^a$) grup 3’te IL-6 düzeyinde grup 1’e göre anlamlı bir artış tespit edildi.

Akciğer dokusunda her üç grupta da ölçülen median IL-6 düzeyleri şekil 5’de gösterildi.



Şekil 5: Grupların akciğer dokusundaki median IL-6 düzeylerinin boksör torbasi grafiğinde gösterilmesi. Yatay çizgiler doksanıncı, yetmişbeşinci, ellinci (median) ve onuncu pörsentilleri göstermektedir.

Akciğer dokusunda her üç grubunda karşılaştırmalı Mann-Whitney U testinde grupların ortalama IL-6 değerleri tespit edildi ve tablo 4’de sunuldu.

Tablo 4: Her 3 grubun akciğer dokusunda IL-6 düzeyleri

Gruplar	IL-6 düzeyleri	Birim
Grup 1	96.015±12.880	pg/mg protein
Grup 2	202.520±27753	pg/mg protein
Grup 3	168.217±33.324	pg/mg protein

Gruplar arası karşılaştırmalarda ($p<0,05$) anlamlı kabul edildi.

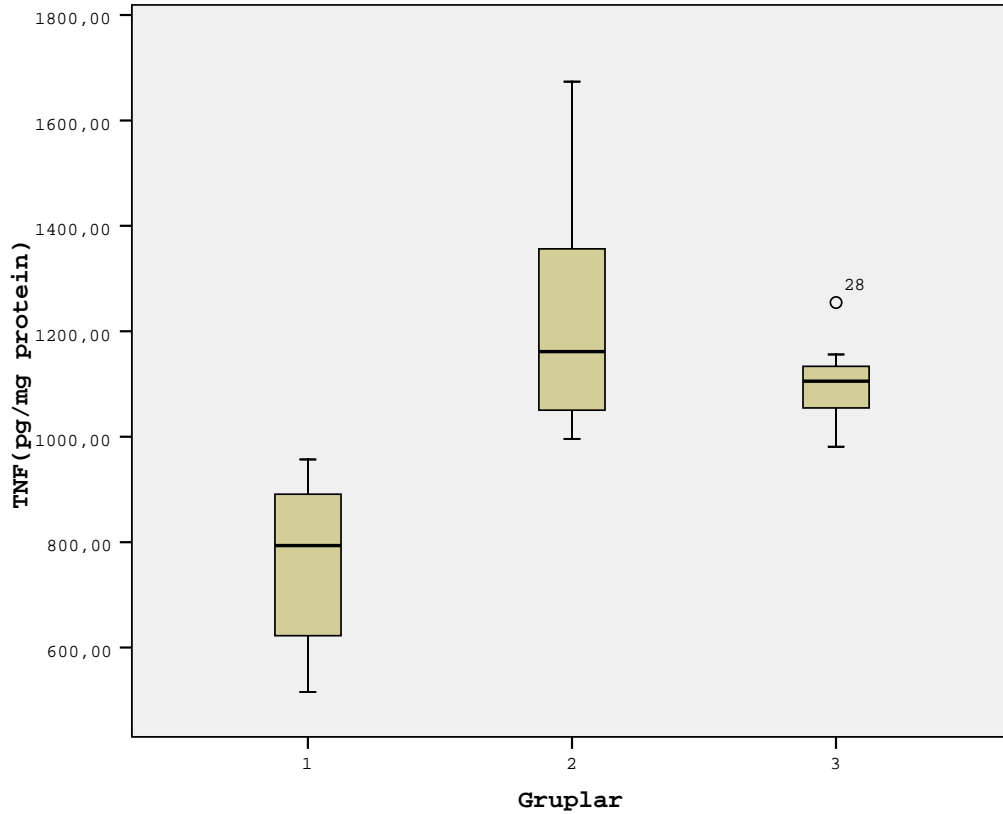
Grup 1 ile grup 2 karşılaştırıldığında ($p=0.000^a$) grup 2’de IL-6 düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edildi.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.043^a$) grup 3’te IL-6 düzeyinde grup 2’ye göre anlamlı bir düşüş tespit edildi.

Grup 1 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.000^a$) grup 3’te IL-6 düzeyinde grup 1’e göre anlamlı bir artış tespit edildi.

Tümör Nekroz Faktör-alfa (TNF- α):

Karaciğer dokusunda her üç grupta ölçülen TNF- α düzeyleri şekil 6'da gösterildi.



Şekil 6: Grupların karaciğer dokusundaki median TNF- α düzeylerinin boksör torbası grafiğinde gösterilmesi. Yatay çizgiler doksanıncı, yetmişbeşinci, ellinci (median) ve onuncu pörsentilleri göstermektedir.

Karaciğer dokusunda her üç grubun da karşılaştırmalı Mann-Whitney U testinde grupların ortalama TNF- α değerleri tespit edildi ve tablo 5'te sunuldu.

Tablo 5: Her 3 grubun karaciğer dokusunda TNF- α düzeyleri

Gruplar	TNF- α düzeyleri	Birim
Grup 1	759.513 \pm 150711	pg/mg protein
Grup 2	1221.037 \pm 216.127	pg/mg protein
Grup 3	1101.064 \pm 73.864	pg/mg protein

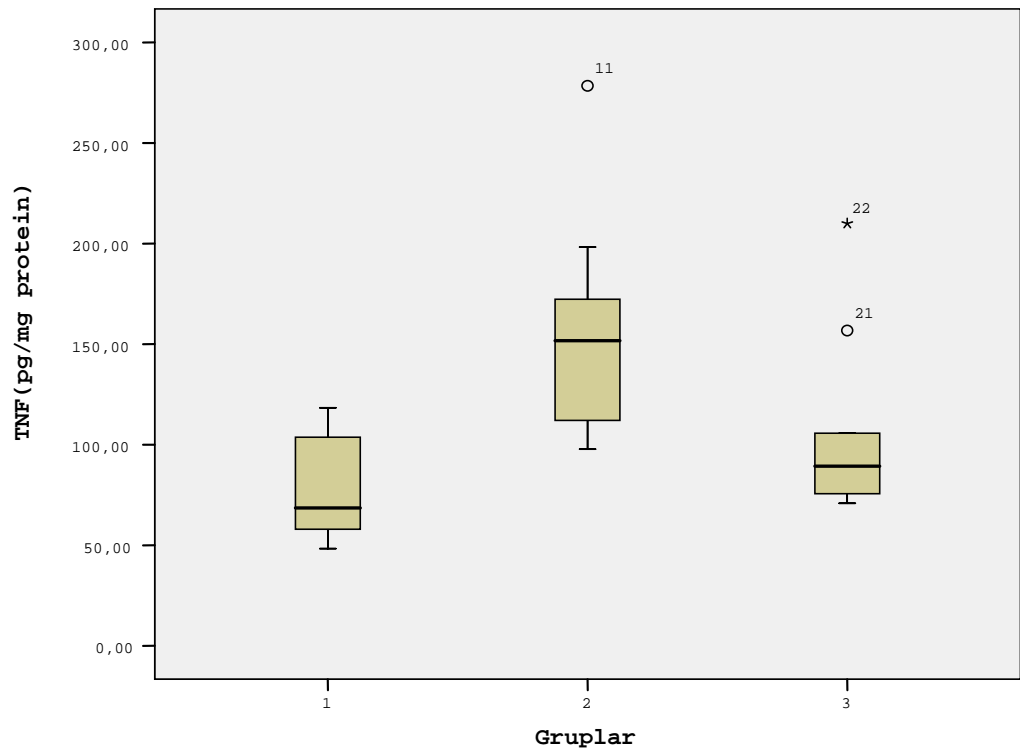
Gruplar arası karşılaştırmalarda ($p < 0,05$) anlamlı kabul edildi.

Grup 1 ile grup 2 karşılaştırıldığında ($p = 0.000^a$) grup 2’de TNF- α düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edildi.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p = 0.353^a$) grup 3’te TNF- α düzeyinde grup 2’ye göre anlamlı bir düşüş tespit edilmedi.

Grup 1 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p = 0.000^a$) grup 3’te TNF- α düzeyinde grup 1’e göre anlamlı bir artış tespit edildi.

Akciğer dokusunda her üç grupta da ölçülen ortalama TNF- α düzeyleri şekil 7’de gösterildi.



Şekil 7: Grupların akciğer dokusundaki ortalama TNF- α düzeylerinin boksör torbası grafiğinde gösterilmesi. Yatay çizgiler doksanıncı, yetmişbeşinci, ellinci (median) ve onuncu pörsentilleri göstermektedir.

Akciğer dokusunda her üç grubun da karşılaştırmalı Mann-Whitney U testinde grupların ortalama TNF- α değerleri tespit edildi ve tablo 6'da sunuldu.

Tablo 6: Her 3 grubun akciğer dokusunda TNF- α düzeyleri

Gruplar	TNF-α düzeyleri	Birim
Grup 1	76.897 \pm 25.000	pg/mg protein
Grup 2	155.830 \pm 54.095	pg/mg protein
Grup 3	113.989 \pm 52.832	pg/mg protein

Gruplar arası karşılaştırmalarda ($p < 0,05$) anlamlı kabul edildi.

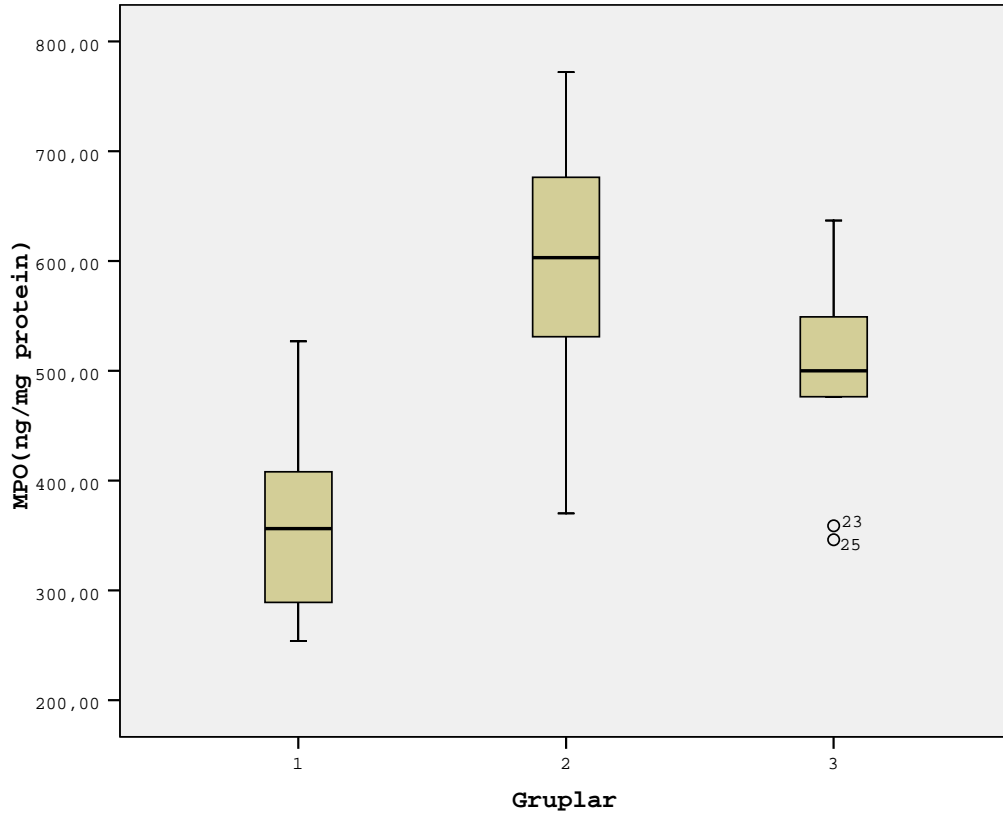
Grup 1 ile grup 2 karşılaştırıldığında ($p = 0.000^a$) grup 2'de TNF- α düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edildi.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p = 0.023^a$) grup 3'te TNF- α düzeyinde grup 2'ye göre anlamlı bir düşüş tespit edildi.

Grup 1 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p = 0.029^a$) grup 3'te TNF- α düzeyinde grup 1'e göre anlamlı bir artış tespit edildi.

Miyeloperoksidaz (MPO):

Karaciğer dokusunda her üç grupta ölçülen MPO düzeyleri şekil 8’de gösterildi.



Şekil 8: Grupların karaciğer dokusundaki median MPO düzeylerinin boksör torbası grafiğinde gösterilmesi. Yatay çizgiler doksanıncı, yetmişbeşinci, ellinci (median) ve onuncu pörsentilleri göstermektedir.

Karaciğer dokusunda her üç grubunda karşılaştırmalı Mann-Whitney U testinde grupların ortalama MPO değerleri tespit edildi ve tablo 7’de sunuldu.

Tablo 7: Her 3 grubun karaciğer dokusunda MPO düzeyleri

Gruplar	MPO düzeyleri	Birim
Grup 1	365.805±92.761	ng/mg protein
Grup 2	584.699±128.258	ng/mg protein
Grup 3	495.569±90.677	ng/mg protein

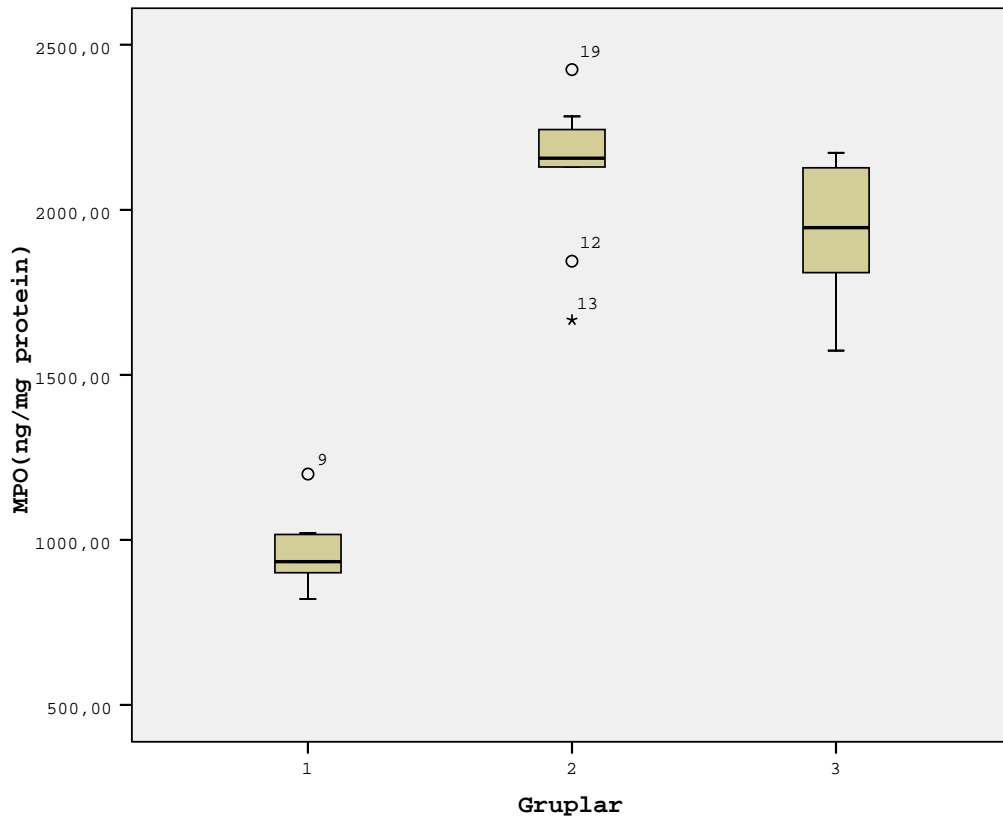
Gruplar arası karşılaştırmalarda ($p < 0,05$) anlamlı kabul edildi.

Grup 1 ile grup 2 karşılaştırıldığında ($p = 0.001^a$) grup 2 de MPO düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edildi.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p = 0.043^a$) grup 3 de MPO düzeyinde grup 2 ye göre anlamlı bir düşüş tespit edildi.

Grup 1 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p = 0.015^a$) grup 3 de MPO düzeyinde grup 1 e göre anlamlı bir artış tespit edildi.

Akciğer dokusunda her üç grupta da ölçülen median MPO düzeyleri şekil 9'de gösterildi.



Şekil 9: Grupların akciğer dokusundaki median MPO düzeylerinin boksör torbası grafiğinde gösterilmesi. Yatay çizgiler doksanıncı, yetmişbeşinci, ellinci (median) ve onuncu pörsentilleri göstermektedir.

Akciğer dokusunda her üç grubunda karşılaştırmalı Mann-Whitney U testinde grupların median değerleri tespit edildi ve tablo 8'de sunuldu.

Tablo 8: Her 3 grubun akciğer dokusunda MPO düzeyleri

Gruplar	MPO düzeyleri	Birim
Grup 1	958.769±104919	ng/mg protein
Grup 2	2122.685±217.113	ng/mg protein
Grup 3	1908.197±210.301	ng/mg protein

Gruplar arası karşılaştırmalarda ($p<0,05$) anlamlı kabul edildi.

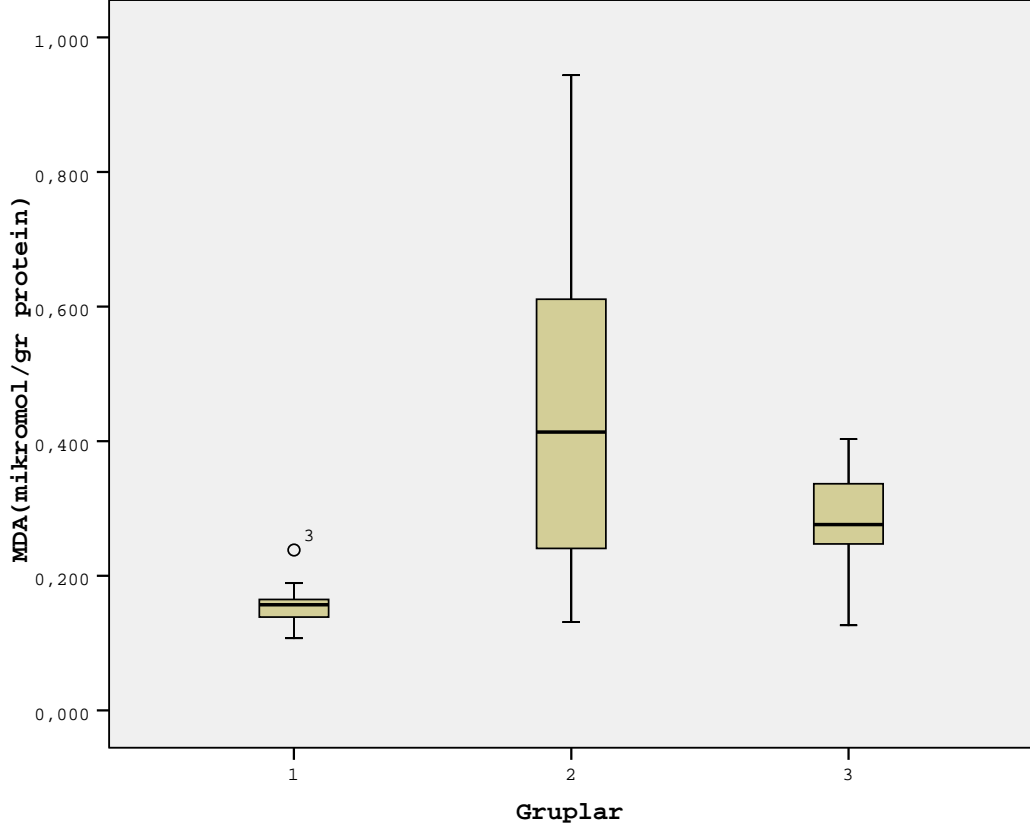
Grup 1 ile grup 2 karşılaştırıldığında ($p=0.000^a$) grup 2 de MPO düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edildi.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.043^a$) grup 3 de MPO düzeyinde grup 2 ye göre anlamlı bir düşüş tespit edilmedi.

Grup 1 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.000^a$) grup 3 de MPO düzeyinde grup 1 e göre anlamlı bir artış tespit edildi.

Malondialdehit (MDA):

Karaciğer dokusunda her üç grupta ölçülen MDA düzeyleri şekil 10'de gösterildi.



Şekil 10: Grupların karaciğer dokusunun median MDA düzeylerinin boksör torbasi grafiğinde gösterilmesi. Yatay çizgiler doksanıncı, yetmişbeşinci, ellinci (median) ve onuncu pörsentilleri göstermektedir.

Karaciğer dokusunda her üç grubun da karşılaştırmalı Mann-Whitney U testinde grupların ortalama MDA değerleri tespit edildi ve tablo 9'de sunuldu.

Tablo 9: Her 3 grubun karaciğer dokusunda MDA düzeyleri

Gruplar	MDA düzeyleri	Birim
Grup 1	0.159±0.034	Mikromol/gr protein
Grup 2	0.438±0.239	Mikromol/gr protein
Grup 3	0.276±0.084	Mikromol/gr protein

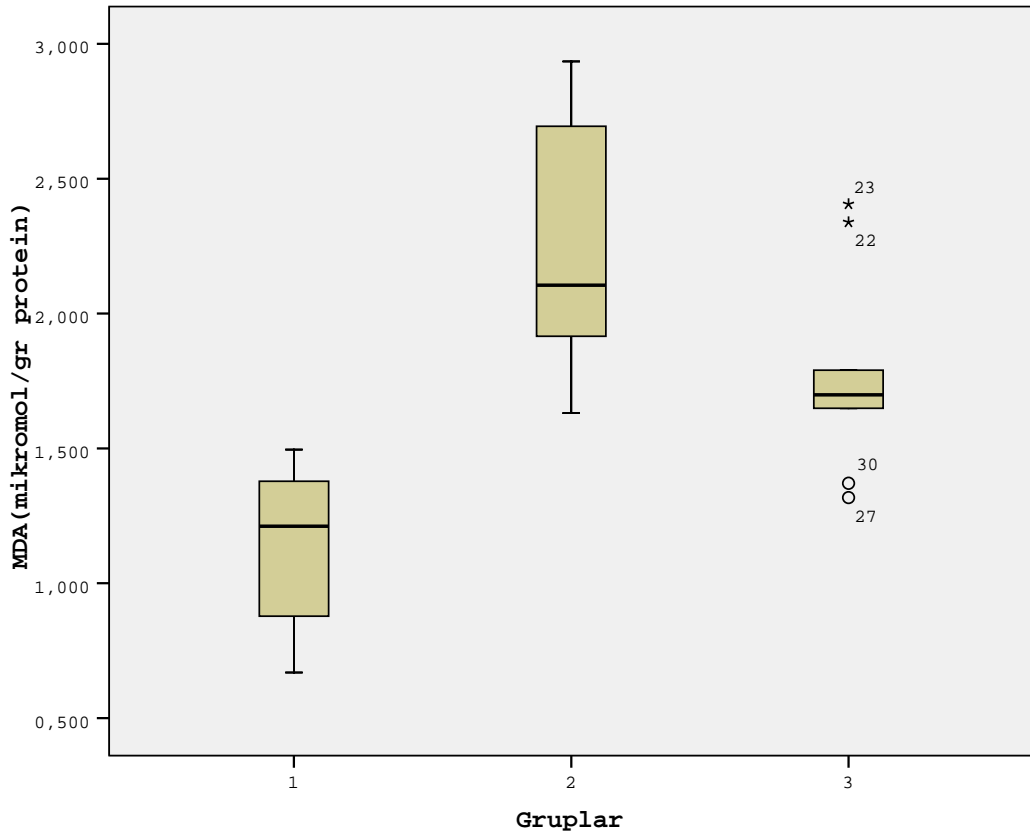
Gruplar arası karşılaştırmalarda ($p < 0,05$) anlamlı kabul edildi.

Grup 1 ile grup 2 karşılaştırıldığında ($p = 0,002^a$) grup 2’de MDA düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edildi.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p = 0,123^a$) grup 3’te MDA düzeyinde grup 2’ye göre anlamlı bir düşüş tespit edilmedi.

Grup 1 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p = 0,002^a$) grup 3’te MDA düzeyinde grup 1’e göre anlamlı bir artış tespit edildi.

Akciğer dokusunda her üç grupta da ölçülen median MDA düzeyleri şekil 11’de gösterildi.



Şekil 11: Grupların akciğer dokusunun median MDA düzeylerinin boksör torbası grafiğinde gösterilmesi. Yatay çizgiler doksanıncı, yetmişbeşinci, ellinci (median) ve onuncu pörsentilleri göstermektedir.

Akciğer dokusunda her üç grubun da karşılaştırmalı Mann-Whitney U testinde grupların ortalama MDA değerleri tespit edildi ve tablo 10’da sunuldu.

Tablo 10: Her 3 grubun akciğer dokusunda MDA düzeyleri

Gruplar	MDA düzeyleri	Birim
Grup 1	1,138±0.291	Mikromol/gr protein
Grup 2	2.207±0442	Mikromol/gr protein
Grup 3	1.773±0.353	Mikromol/gr protein

Gruplar arası karşılaştırmalarda ($p<0,05$) anlamlı kabul edildi.

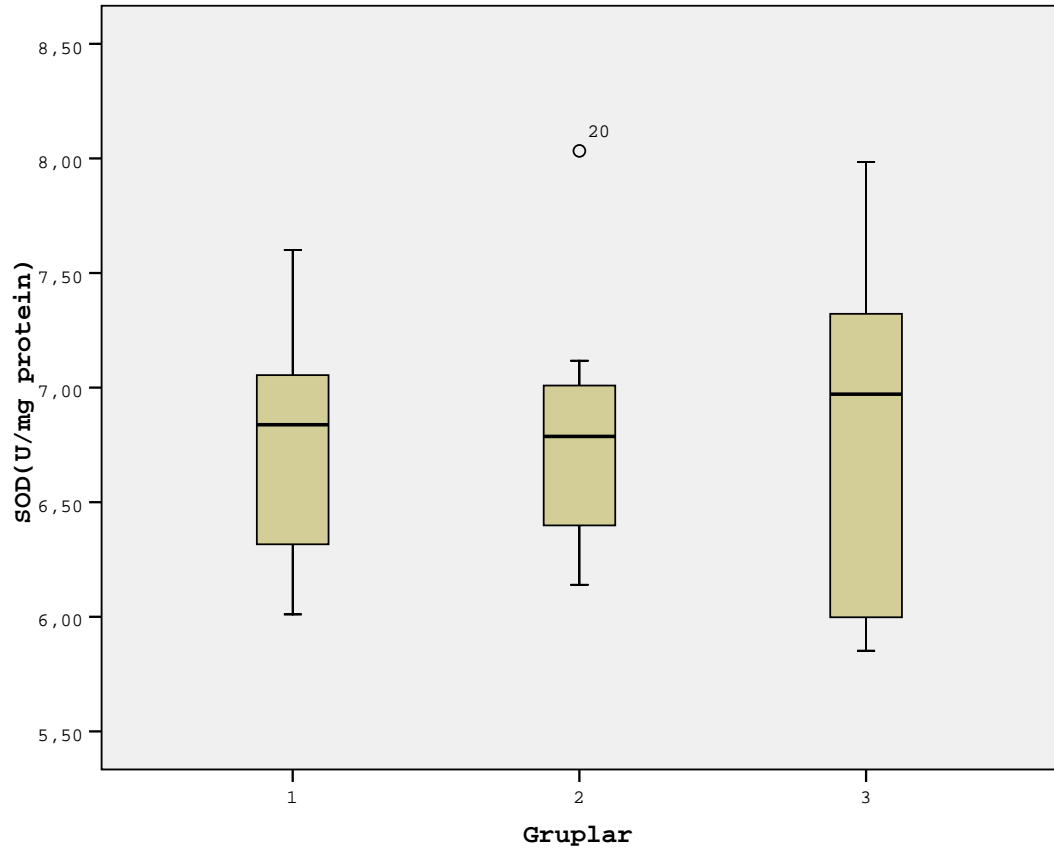
Grup 1 ile grup 2 karşılaştırıldığında ($p=0.000^a$) grup 2’de MDA düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edildi.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.035^a$) grup 3’te MDA düzeyinde grup 2’ye göre anlamlı bir düşüş tespit edildi.

Grup 1 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.000^a$) grup 3’te MDA düzeyinde grup 1’e göre anlamlı bir artış tespit edildi.

Süperoksit Dismutaz (SOD):

Karaciğer dokusunda her üç grupta ölçülen SOD düzeyleri şekil 12’de gösterildi.



Şekil 12: Grupların karaciğer dokusunun median SOD düzeylerinin boksör torbasi grafiğinde gösterilmesi. Yatay çizgiler doksanıncı, yetmişbeşinci, ellinci (median) ve onuncu pörsentilleri göstermektedir.

Karaciğer dokusunda her üç grubun da karşılaştırmalı Mann-Whitney U testinde grupların ortalama SOD değerleri tespit edildi ve tablo 11’de sunuldu.

Tablo 11: Her 3 grubun karaciğer dokusunda SOD düzeyleri

Gruplar	SOD düzeyleri	Birim
Grup 1	6.728±0.538	U/mg protein
Grup 2	6.816±0.525	U/mg protein
Grup 3	6.753±0.742	U/mg protein

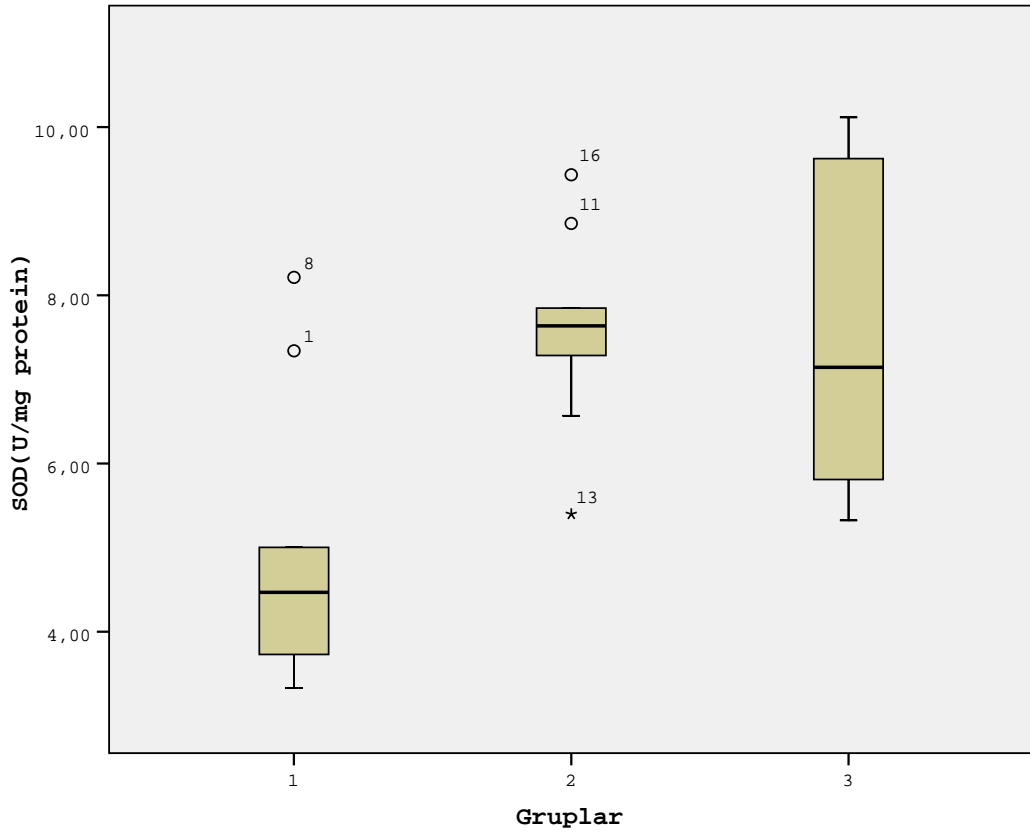
Gruplar arası karşılaştırmalarda ($p < 0,05$) anlamlı kabul edildi.

Grup 1 ile grup 2 karşılaştırıldığında ($p = 0,853^a$) grup 2’de SOD düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edilmedi.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p = 1,000^a$) grup 3’te SOD düzeyinde grup 2’ye göre anlamlı bir düşüş tespit edilmedi.

Grup 1 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p = 0,971^a$) grup 3’te SOD düzeyinde grup 1’e göre anlamlı bir artış tespit edilmedi.

Akciğer dokusunda her üç grupta da ölçülen median SOD düzeyleri şekil 13’de gösterildi.



Şekil 13: Grupların akciğer dokusunu median SOD düzeylerinin boksör torbası grafiğinde gösterilmesi. Yatay çizgiler doksanıncı, yetmişbeşinci, ellinci (median) ve onuncu pörsentilleri göstermektedir.

Akciğer dokusunda, her üç grubun da karşılaştırmalı Mann-Whitney U testinde grupların ortalama SOD değerleri tespit edildi ve tablo 12’de sunuldu.

Tablo 12: Her 3 grubun akciğer dokusunda SOD düzeyleri

Gruplar	SOD düzeyleri	Birim
Grup 1	4.928±1.625	U/mg protein
Grup 2	7.598±1.107	U/mg protein
Grup 3	7.576±1.902	U/mg protein

Gruplar arası karşılaştırmalarda ($p<0,05$) anlamlı kabul edildi.

Grup 1 ile grup 2 karşılaştırıldığında ($p=0.002^a$) grup 2’de SOD düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edildi.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.739^a$) grup 3’te SOD düzeyinde grup 2’ye göre anlamlı bir düşüş tespit edilmedi.

Grup 1 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.003^a$) grup 3’te SOD düzeyinde grup 1’e göre anlamlı bir artış tespit edildi.

Histopatolojik Bulgular:

Oluşturulan hepatik iskemi-reperfüzyon modelinde histopatolojik olarak değerlendirilecek akciğer ve karaciğer dokularından hazırlanan parafin bloklardan 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Boyanan dokular Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Karaciğer dokusunun histopatolojik hasar skorlaması farklı iki karaciğer lobundan hazırlanmış parafin bloklardan alınan iki örnekle yapıldı. Akciğer dokusunun histopatolojik değerlendirmesinde de karaciğer dokusunda yapıldığı gibi farklı akciğer loblarından hazırlanmış iki örnekle yapıldı. Akciğer ve karaciğer dokularından hazırlanan preparatlardan her bir gruba ait örnek resimler alındı.

Her üç grubun da akciğer ve karaciğer dokularındaki hasar aşağıdaki şekilde skorlandı.

Hasar	Yok	Hafif	Orta	Şiddetli
Hiperemi ve konjesyon	0	1	2	3
Nötrofil marjinasyonu ve doku infiltrasyonu	0	1	2	3
Doku içi hemoraji ve debris	0	1	2	3
Sellüler hiperplazi	0	1	2	3

Yapılan hasar skorlaması doğrultusunda grupların skorları aşağıdaki tablolarda sunuldu.

Tablo 13: G 1 (Sham Grubu), Akciğer kesitleri skor tablosu

Hayvanlar	Hiperemi ve konjesyon	Nötrofil marjinasyonu ve doku infiltrasyonu	Doku içi hemoraji ve debris	Sellüler hiperplazi
1	1	0	0	0
1	1	0	1	0
2	0	0	0	0
2	1	1	2	1
3	2	3	1	2
3	1	1	1	1
4	1	2	0	0
4	1	1	0	0
5	0	0	0	0
5	2	1	0	0
6	0	1	0	0
6	1	3	2	1
7	0	0	0	0
7	2	2	2	2
8	0	0	0	0
8	1	1	0	0
9	0	0	1	1
9	2	2	1	1
10	2	2	1	1
10	1	1	1	0

Tablo 14: G 2 (İ-R / Salin İnf. Grubu), Akciğer dokuları skor tablosu

Hayvanlar	Hiperemi ve konjesyon	Nötrofil marjinasyonu ve doku infiltrasyonu	Doku içi hemoraji ve debris	Sellüler hiperplazi
1	1	3	2	2
1	0	3	1	3
2	2	2	2	2
2	2	1	1	2
3	3	1	1	2
3	2	1	1	1
4	2	1	2	2
4	1	1	1	1
5	0	2	1	2
5	2	2	1	3
6	2	2	1	2
6	2	0	1	0
7	2	2	1	2
7	1	1	1	1
8	3	3	3	2
8	0	1	1	0
9	0	1	0	1
9	2	2	2	2
10	2	2	1	1
10	0	0	1	2

Tablo 15: Grup 3 (İ-R / AM+AMBP-1 Kom. İnf. Grubu), Akciğer dokuları skor tablosu

Hayvanlar	Hiperemi ve konjesyon	Nötrofil marjinasyonu ve doku infiltrasyonu	Doku içi hemoraji ve debris	Sellüler hiperplazi
1	2	1	0	1
1	0	1	0	0
2	2	3	2	2
2	3	1	2	0
3	2	2	1	2
3	2	2	0	1
4	1	1	0	0
4	3	2	2	1
5	2	1	2	2
5	2	3	3	3
6	1	1	1	1
6	1	2	0	1
7	1	1	1	1
7	0	0	0	0
8	1	1	0	0
8	0	3	0	0
9	1	1	2	2
9	1	1	0	1
10	1	2	0	0
10	0	2	1	1

Tablo 16: G 1 (Sham Grubu), Karaciğer kesitleri skor tablosu

Hayvanlar	Hiperemi ve konjesyon	Nötrofil marjinasyonu ve doku infiltrasyonu	Doku içi hemoraji ve debris	Sellüler hiperplazi
1	0	0	0	2
1	2	1	2	1
2	0	2	1	2
2	0	1	1	1
3	0	2	0	1
3	0	1	1	1
4	0	1	0	0
4	0	0	1	1
5	0	0	0	1
5	0	1	0	0
6	1	1	1	1
6	2	1	1	2
7	1	0	1	2
7	1	2	0	2
8	1	0	2	2
8	1	2	0	2
9	1	1	0	0
9	1	1	0	1
10	0	0	0	0
10	1	2	1	1

Tablo 17: G 2 (İ-R / Salin İnf. Grubu), Karaciğer dokuları skor tablosu

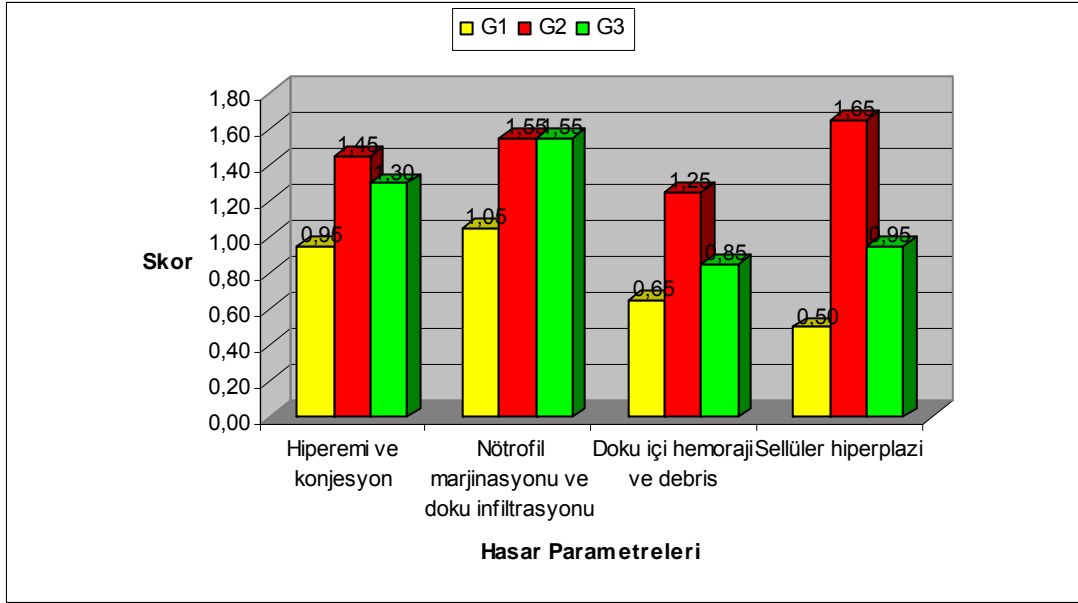
Hayvanlar	Hiperemi ve konjesyon	Nötrofil marjinasyonu ve doku infiltrasyonu	Doku içi hemoraji ve debris	Sellüler hiperplazi
1	1	2	0	1
1	1	2	0	2
2	1	0	0	2
2	1	2	2	3
3	1	1	1	1
3	1	2	2	2
4	1	1	1	1
4	0	0	1	1
5	2	3	1	3
5	1	3	3	3
6	1	2	1	2
6	1	1	1	1
7	1	2	3	2
7	2	2	1	1
8	1	2	1	3
8	1	1	1	2
9	2	1	2	2
9	1	2	1	2
10	1	1	2	3
10	1	2	1	2

Tablo 18: Grup 3 (İ-R / AM+AMBP-1 Kom. İnf. Grubu), Karaciğer dokuları skor tablosu

Hayvanlar	Hiperemi ve konjesyon	Nötrofil marjinasyonu ve doku infiltrasyonu	Doku içi hemoraji ve debris	Sellüler hiperplazi
1	0	1	3	3
1	3	2	0	0
2	3	2	0	0
2	0	0	1	1
3	1	1	1	2
3	0	1	1	1
4	1	1	0	1
4	2	2	2	2
5	1	1	2	2
5	3	3	1	1
6	0	1	0	0
6	1	1	1	1
7	0	0	1	1
7	1	0	1	1
8	0	1	1	1
8	1	2	1	2
9	1	2	2	2
9	1	1	2	2
10	0	1	1	2
10	2	2	2	2

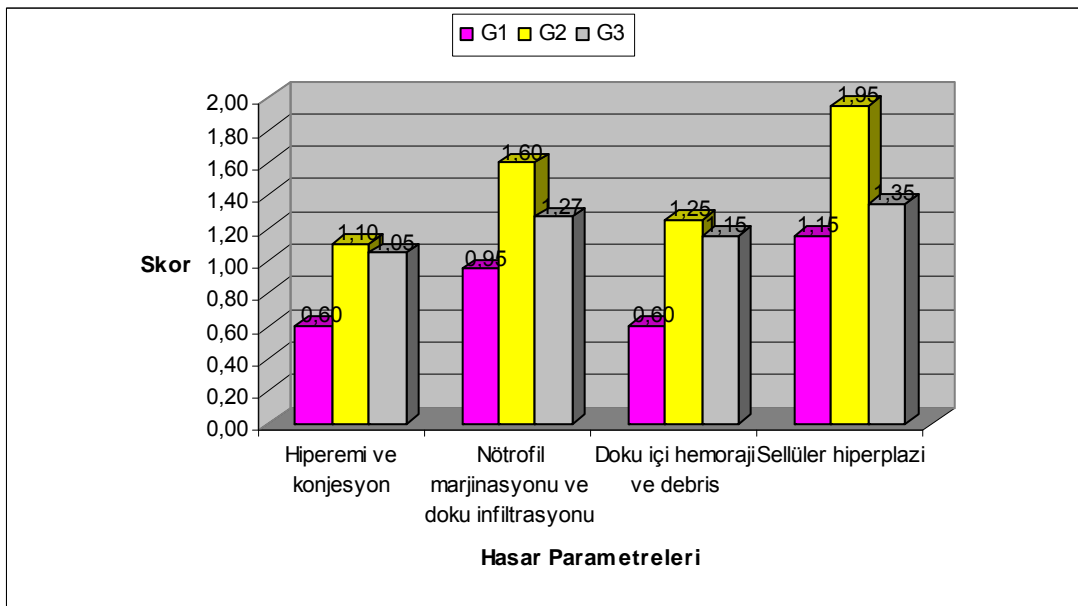
Her üç grubun akciğer doku örneklerinin histopatolojik skor ortalamaları alındı ve tablo 19’da sunuldu.

Tablo 19: Akciğer dokusunda her üç grupta ortalama hasar düzeyleri



Her üç grubun karaciğer doku örneklerinin histopatolojik skor ortalamaları alındı ve tablo 20’de sunuldu.

Tablo 20: Karaciğer dokusunda her üç grupta ortalama hasar düzeyleri.



Oluşturmuş olduğumuz karaciğer iskemi-reperfüzyonu modelinin histopatolojik hasar skorları, Mann-Whitney U testi yardımı ile gruplar arasında karşılaştırıldı. Verilerde ($p < 0,05$) anlamlı kabul edildi.

Akciğer Dokusu

Hiperemi ve konjesyon:

Grup 1 ile grup 2 karşılaştırıldığında ($p=0.096$) grup 2’de hasar skoru düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edilmedi.

Grup 1 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.277$) grup 3’te hasar skoru düzeyinde grup 1’e göre anlamlı bir artış tespit edilmedi.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.565$) grup 3’te hasar skoru düzeyinde grup 2’ye göre anlamlı bir düşüş tespit edilmedi.

Nötrofil marjinasyonu ve doku infiltrasyonu:

Grup 1 ile grup 2 karşılaştırıldığında ($p=0.108$) grup 2’de hasar skoru düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edilmedi.

Grup 1 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.096$) grup 3’te hasar skoru düzeyinde grup 1’e göre anlamlı bir artış tespit edilmedi.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.947$) grup 3’te hasar skoru düzeyinde grup 2’ye göre anlamlı bir düşüş tespit edilmedi.

Doku içi hemoraji ve debris:

Grup 1 ile grup 2 karşılaştırıldığında ($p=0.017$) grup 2’de hasar skoru düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edildi.

Grup 1 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.659$) grup 3’te hasar skoru düzeyinde grup 1’e göre anlamlı bir artış tespit edilmedi.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.114$) grup 3’te hasar skoru düzeyinde grup 2’ye göre anlamlı bir düşüş tespit edilmedi.

Sellüler hiperplazi:

Grup 1 ile grup 2 karşılaştırıldığında ($p=0.000$) grup 2’de hasar skoru düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edildi.

Grup 1 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.121$) grup 3’te hasar skoru düzeyinde grup 1’e göre anlamlı bir artış tespit edilmedi.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.017$) grup 3’te hasar skoru düzeyinde grup 2’ye göre anlamlı bir düşüş tespit edildi.

Karaciğer Dokusu

Hiperemi ve konjesyon:

Grup 1 ile grup 2 karşılaştırıldığında ($p=0.020$) grup 2’de hasar skoru düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edildi.

Grup 1 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.231$) grup 3’te hasar skoru düzeyinde grup 1’e göre anlamlı bir artış tespit edilmedi.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.461$) grup 3’te hasar skoru düzeyinde grup 2’ye göre anlamlı bir düşüş tespit edilmedi.

Nötrofil marjinasyonu ve doku infiltrasyonu:

Grup 1 ile grup 2 karşılaştırıldığında ($p=0.023$) grup 2’de hasar skoru düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edildi.

Grup 1 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.301$) grup 3’te hasar skoru düzeyinde grup 1’e göre anlamlı bir artış tespit edilmedi.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.183$) grup 3’te hasar skoru düzeyinde grup 2’ye göre anlamlı bir düşüş tespit edilmedi.

Doku içi hemoraji ve debris:

Grup 1 ile grup 2 karşılaştırıldığında ($p=0.021$) grup 2’de hasar skoru düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edildi.

Grup 1 ile grup 3 karşılaştırıldığında ($p=0.043$) grup 3’te hasar skoru düzeyinde grup 1’e göre anlamlı bir artış tespit edildi.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında (**p=0.799**) grup 3'te hasar skoru düzeyinde grup 2'ye göre anlamlı bir düşüş tespit edilmedi.

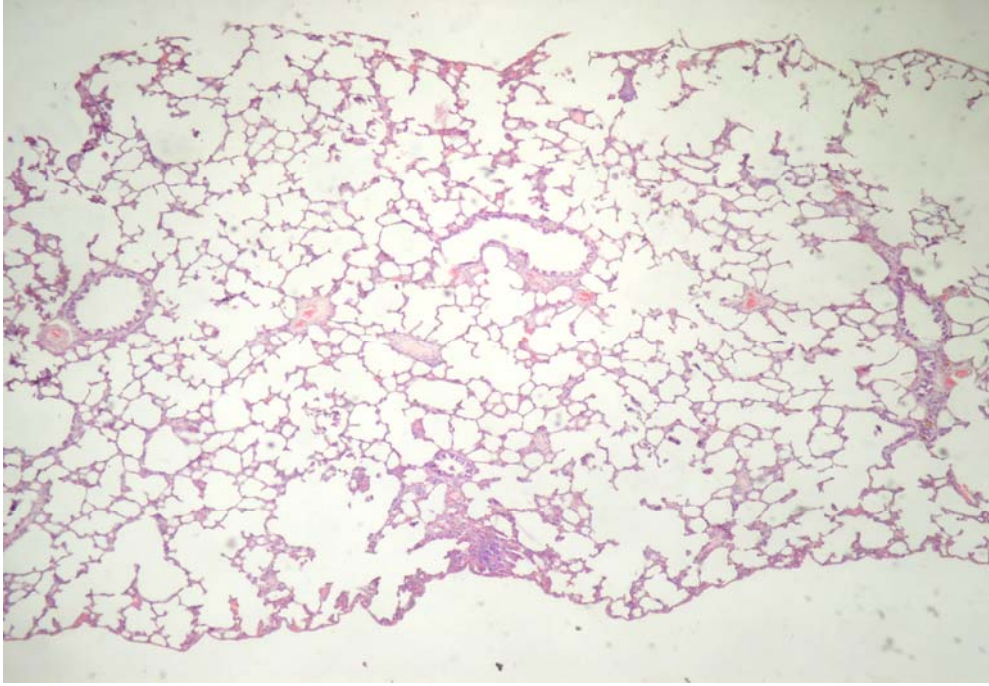
Sellüler hiperplazi:

Grup 1 ile grup 2 karşılaştırıldığında (**p=0.006**) grup 2'de hasar skoru düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edildi.

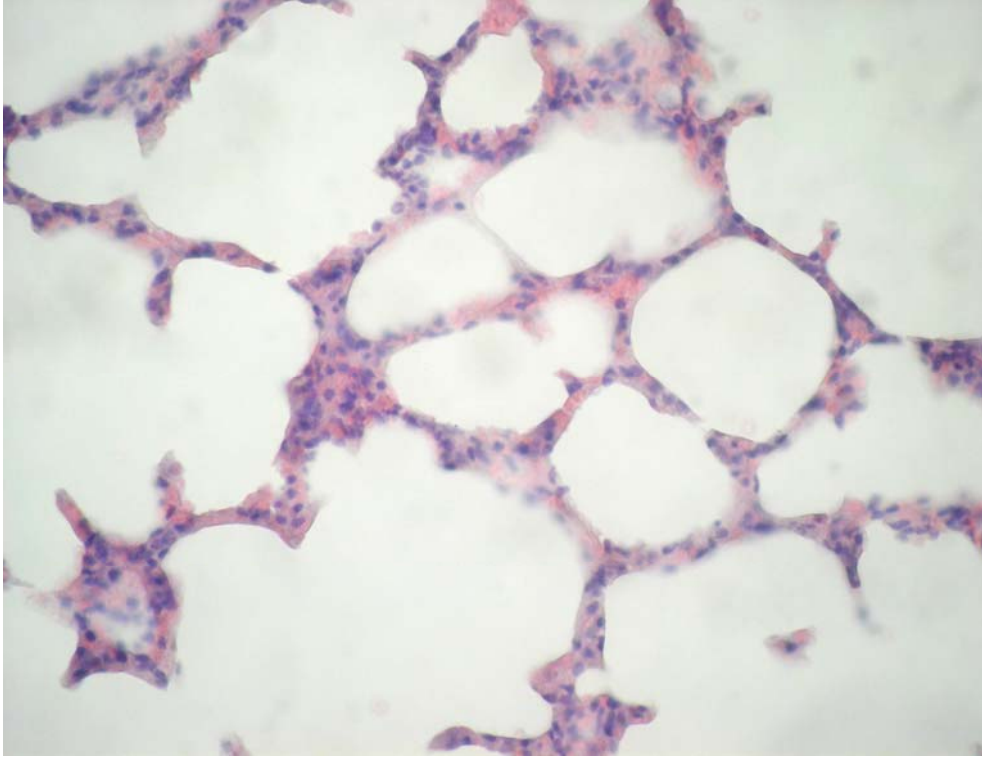
Grup 1 ile grup 3 karşılaştırıldığında (**p=0.495**) grup 3'te hasar skoru düzeyinde grup 1'e göre anlamlı bir artış tespit edilmedi.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında (**p=0.043**) grup 3'te hasar skoru düzeyinde grup 2'ye göre anlamlı bir düşüş tespit edildi.

Her üç gruptan histopatolojik ve immunohistokimyasal örnekler fotoğraflandı ve aşağıda sunuldu.

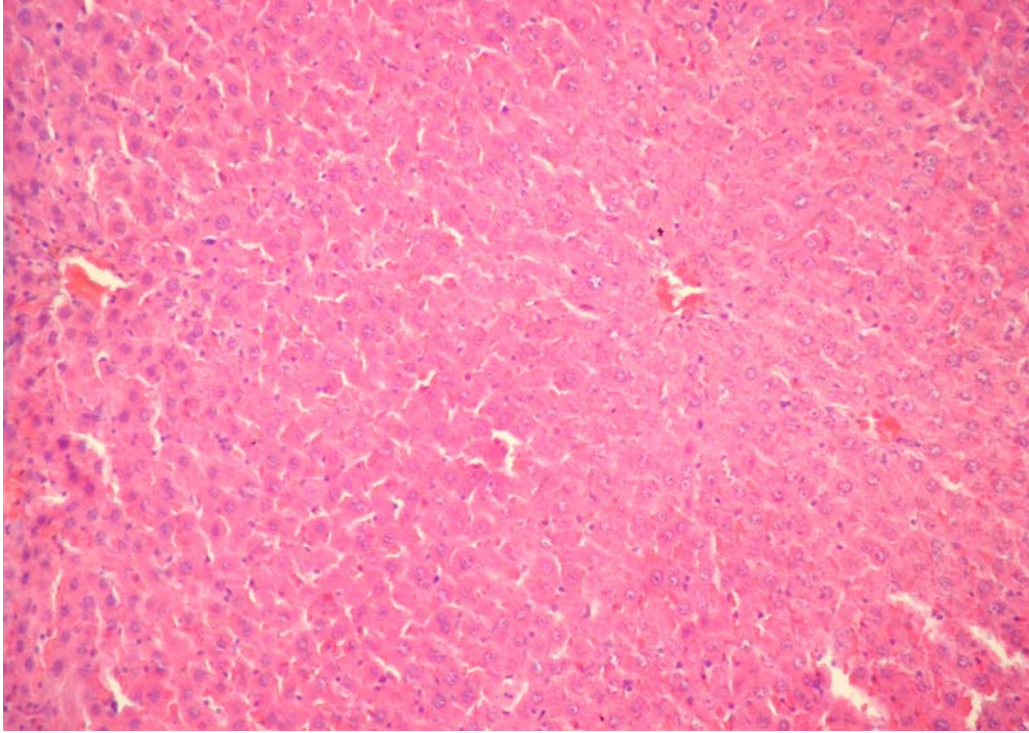


A

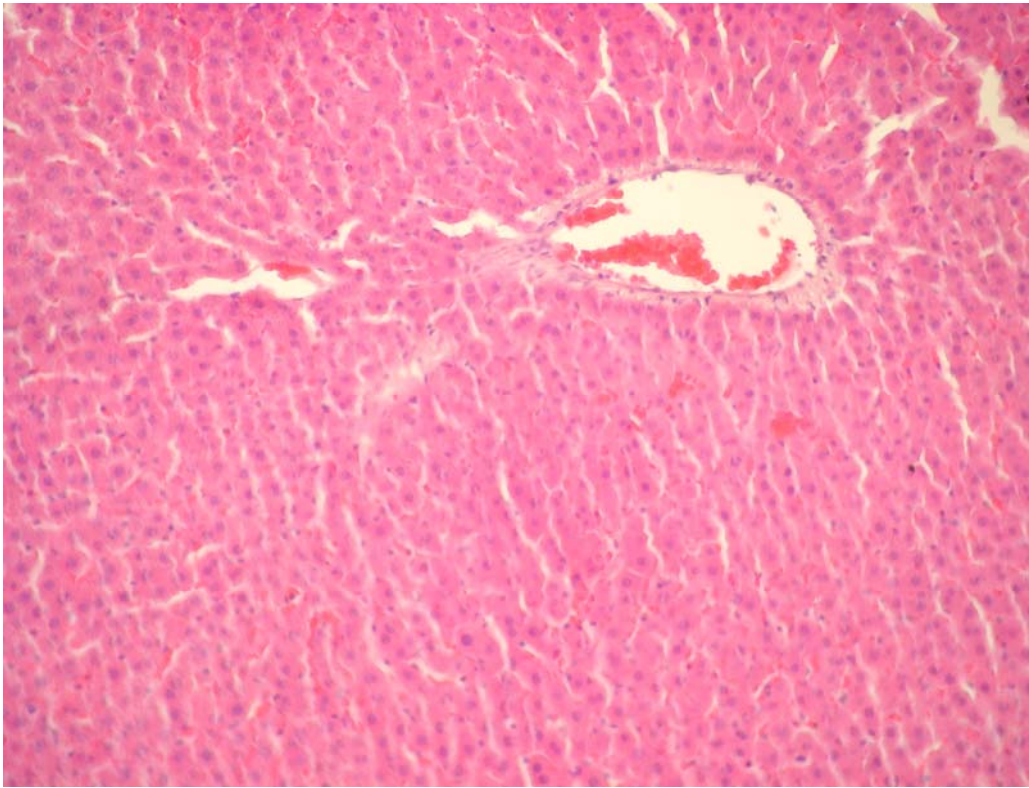


B

Resim 4: Grup 1 Akciğer dokusu H-E A: 4X B: 40X büyütmedeki görüntüsü

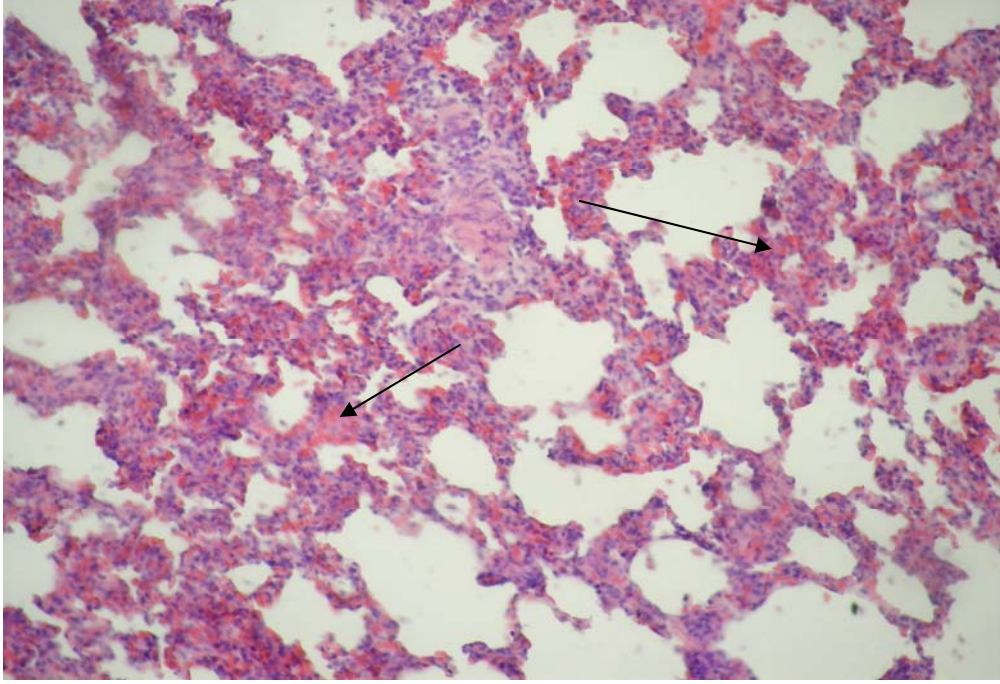


A

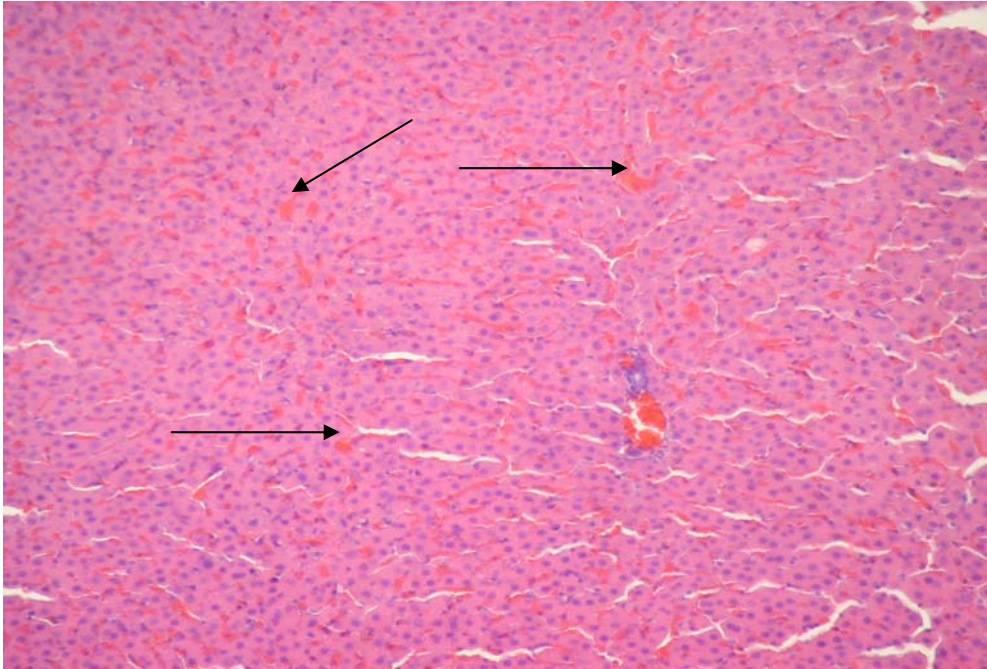


B

Resim 5:Grup1 karaciğer dokusu H-E A: 20X, B: 10X Büyütmedeki görüntüsü

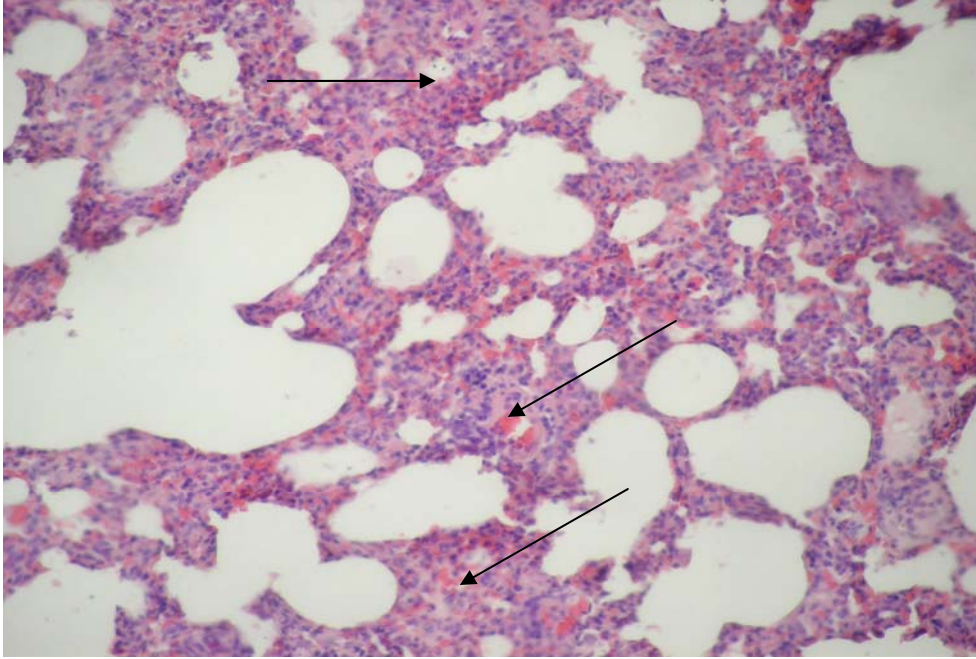


A

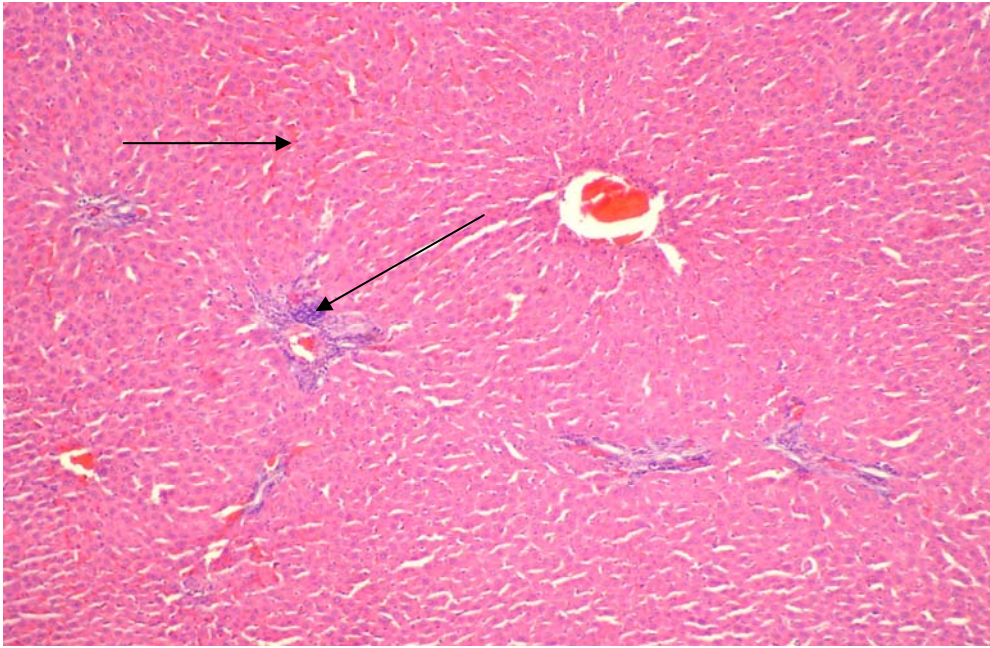


B

Resim 6: Grup 2 H-E A: akciğer dokusundaki 20X büyütmedeki görüntüsü oklar doku içi hemorajiyi ve doku ödemi göstermekte, B: karaciğer dokusundaki 10X büyütmedeki görüntüsü oklar doku içi hemorajiyi ve doku ödemi göstermekte

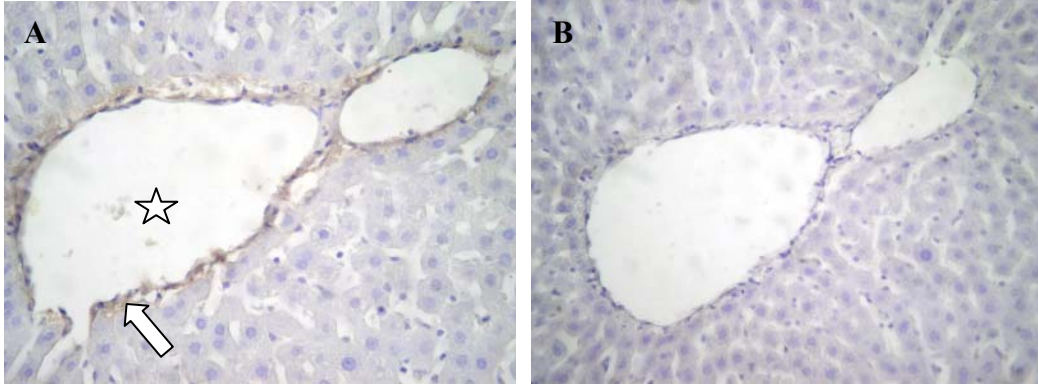


A

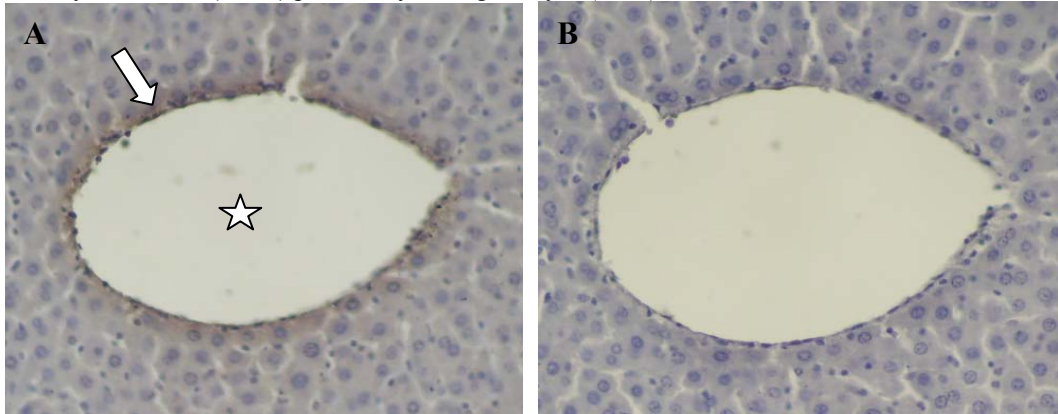


B

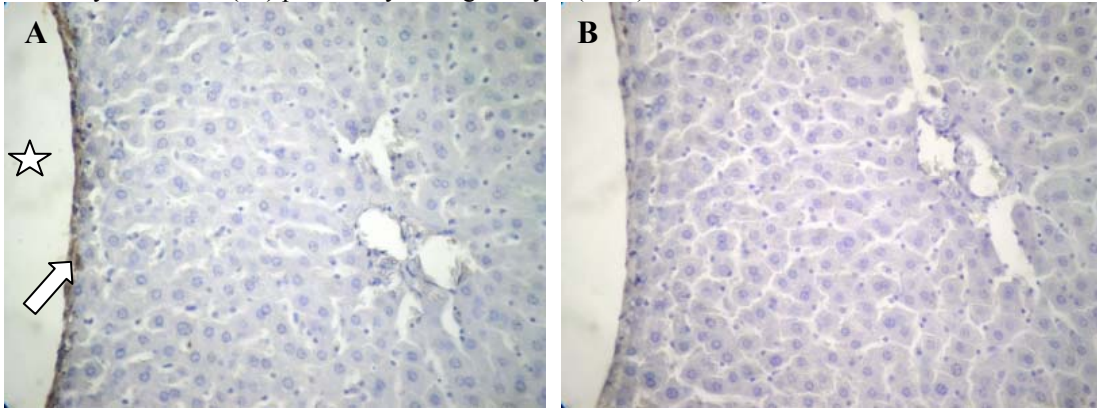
Resim 7: Grup 3 H-E A: akciğer dokusundan 10X kesitler hemorajiyi ve doku ödemi göstermekte, B: karaciğer dokusundan 20X kesitler alındı, yatay ok hemorajiyi düşey ok perivaskuler hücre proliferasyonunu göstermekte.



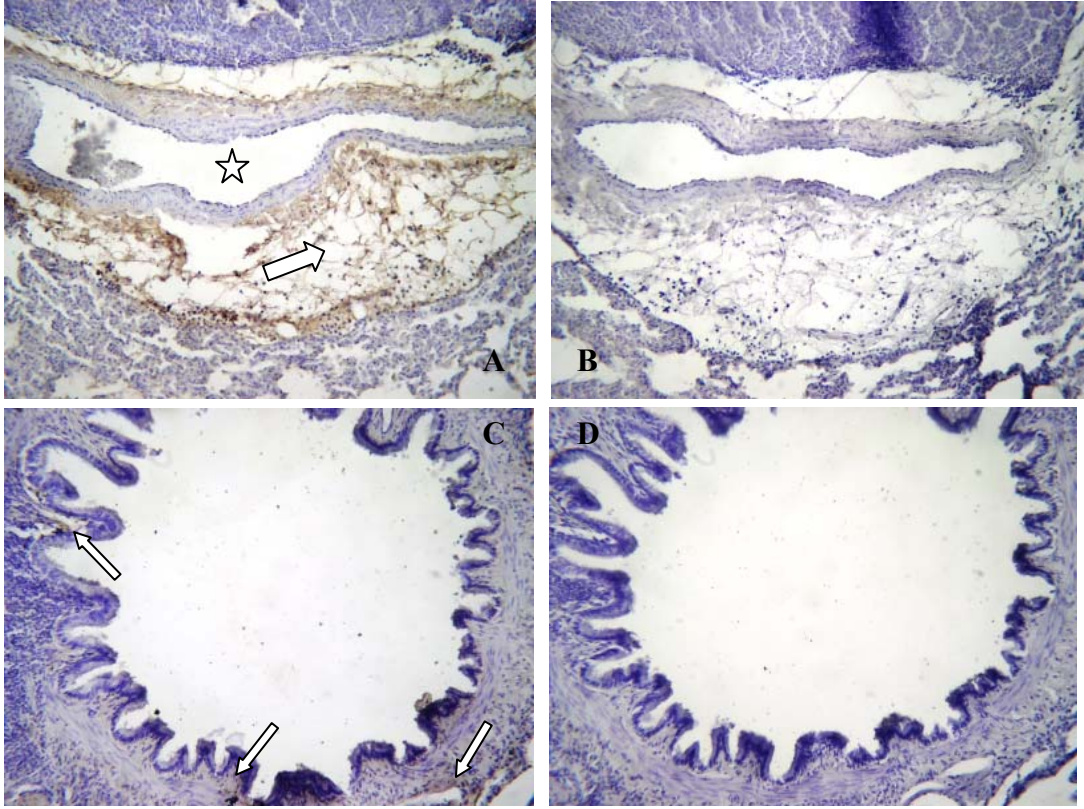
Resim 8: Grup 1 e ait dokulardan AM primer antikor ile boyanmış karaciğer kesiti (A) ile primer antikor yerine sekonder kullanılan kontrol kesiti (B) görüntülenmiş. Soldaki resimde, santral venin (*) adventisya kısmında (oklar) pozitif boyanma görülüyor (480x).



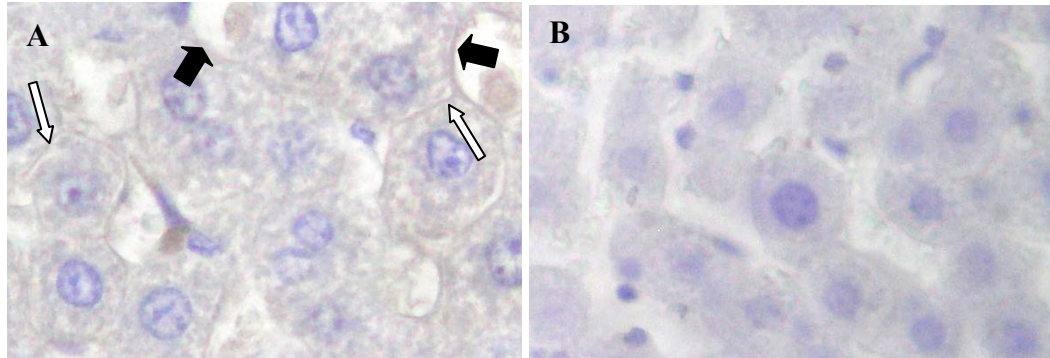
Resim 9: Grup 3 e ait dokulardan AM primer antikor ile boyanmış karaciğer kesiti (A) ile primer antikor yerine sekonder kullanılan kontrol kesiti (B) görüntülenmiş. Soldaki resimde, santral venin (*) adventisya kısmında (ok) pozitif boyanma görülüyor (240x).



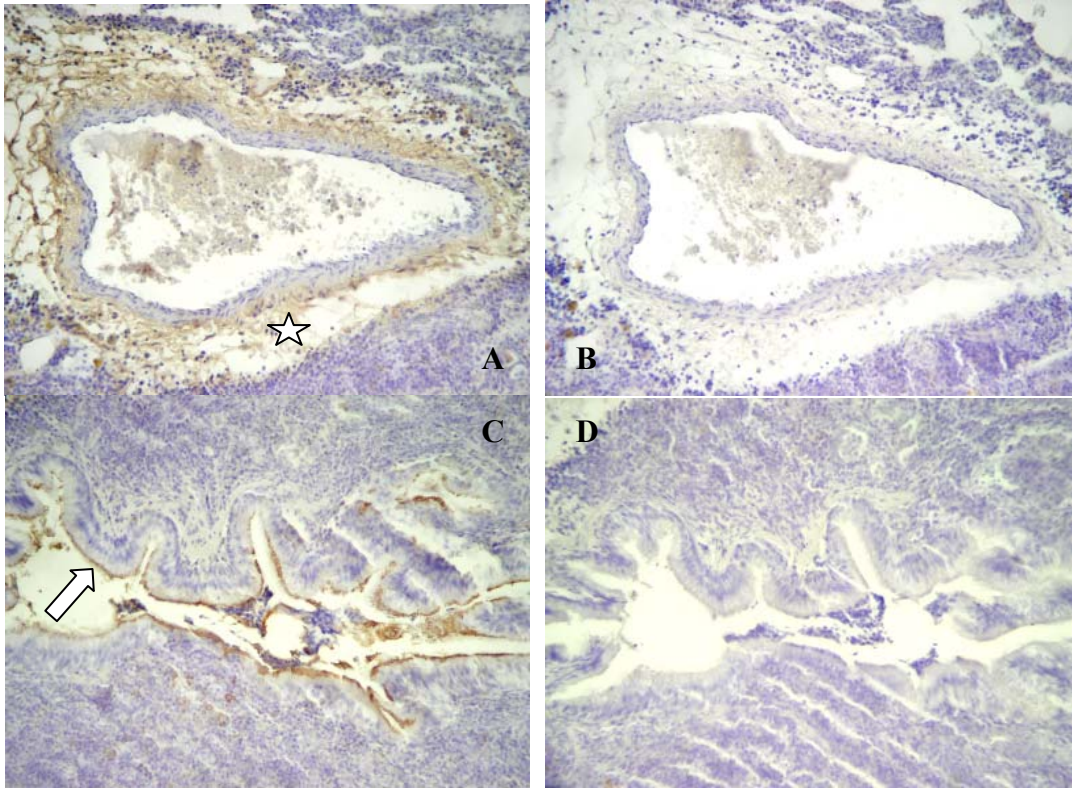
Resim 10: Grup 1 e ait dokulardan AM primer antikor ile boyanmış karaciğer kesiti (A) ile primer antikor yerine sekonder kullanılan kontrol kesiti (B) görüntülenmiş. Soldaki resimde, büyük bir ven (*) ile iki küçük venin adventisya kısımlarında (ok) pozitif boyanma görülürken kontrol kesitinde boyanma gözlenmemiş (240x).



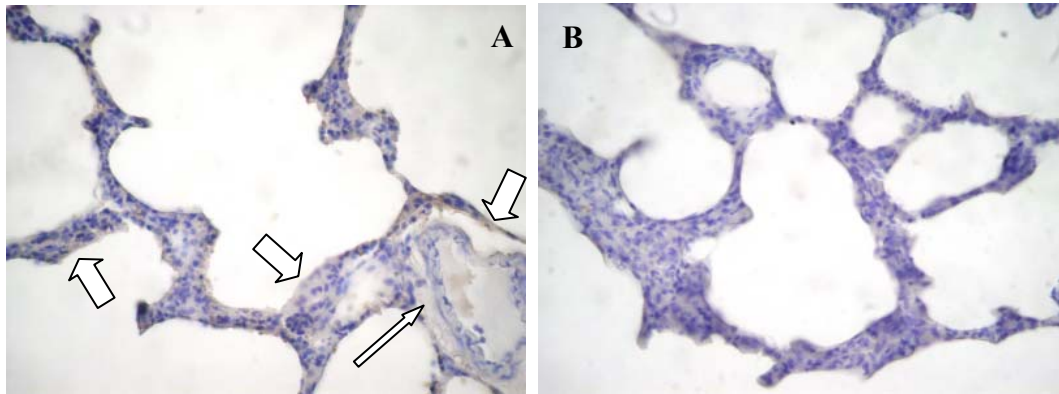
Resim 11: Grup 1 e ait akciğer kesitleri. A ile C resimlerinde örnekler AM primer antikoru ile B ile D resimlerinde örnekler ise primer antikor yerine sekonder kullanılarak boyandı. A kesitinde, akciğerdeki bir vena (*) ait adventisya tabakası (ok) kontrol kesitinin aksine pozitif boyanmış olarak görünüyor. C ve D resimlerinde bir bronşa ait görüntüler yer almakta. C resminde epitel dokusunun apikal yüzeyinde minimal boyanma gözlenirken alttaki bağ dokusunda (oklar) yer yer pozitif boyanma gerçekleşmiş. Kontrol kesitlerine kıyasla yoğun şekilde boyanmış olarak gözlenmekte (240x).



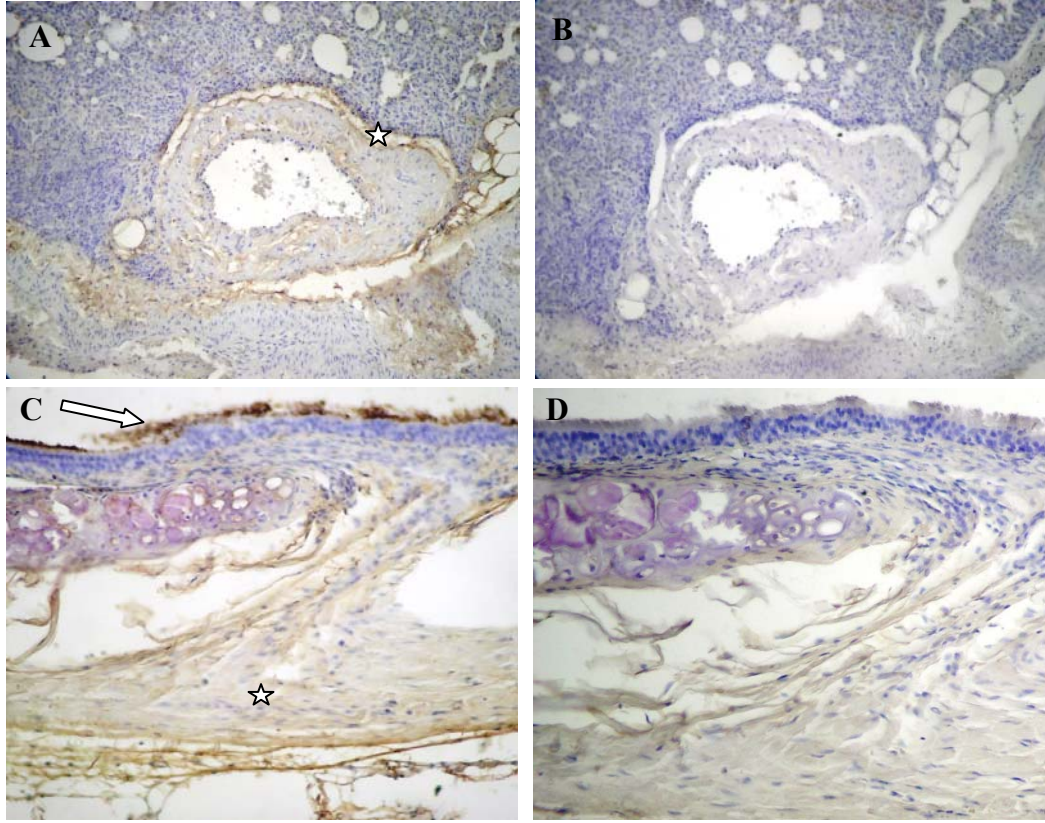
Resim 12: Grup 1 e ait karaciğer kesitleri. A resminde hepatositlerin intraselüler kısımları (*) ile hücre yüzeylerinde (ince oklar) ve sinüzoidleri döşeyen endotel hücrelerinde (kalın oklar) pozitif AM boyanması görüntülenmiştir. Kontrol amacıyla hazırlanan B kesitinde boyanma gözlenmemekte (480x).



Resim 13: Grup 3 e ait akciğer kesitleri. A ile C resimlerdeki örnekler AM primer antikorunu ile B ile D resimlerdeki örnekler ise primer antikor yerine sekonder kullanılarak boyandı. A kesitinde, akciğerdeki bir vena ait adventisya tabakası (*) kontrol kesitinin aksine pozitif boyanmış görünür. C'de ise çevresinde lenfatik nodül bulunan bir bronşiyola ait epitel dokusu özellikle apikal yüzeyinde (ok) pozitif boyanmış şekilde gözlenmektedir. B ile D resimlerinde immün boyama gözlenmiyor (Büyütmeler: 240x).



Resim 14: Grup 3 e ait akciğer kesitleri. A resiminde alveolleri döşeyen pnömositler (kalın oklar) ile görüntüdeki kan damarının adventisya tabakasını oluşturan bağ doku hücrelerinde (ince ok) pozitif AM boyanması görülmüştür. Kontrol amacıyla boyanan B şeklinde minimal bir fon boyanması dışında boyanma gözlenmiyor (480x).



Resim 15: Grup 2 ye ait akciğer kesitleri. A ile C resimlerindeki örnekler AM primer antikor ile B ile D resimlerindeki örnekler ise primer antikor yerine sekonder kullanılarak boyandı. A kesitinde, akciğerdeki bir artere ait adventisya tabakası (*) kontrol kesitinin aksine pozitif boyanmış olarak görünüyor. C ve D resimleri ise bir bronşa ait. C resminde epitel dokusunun apikal yüzeyi (ok) ile alttaki bağ dokusu (*) pozitif immün boyanma verirken, kontrol kesitlerine pozitif boyanma gözlenmemekte. (240x).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İskemi-reperfüzyon hasarı vasküler oklüzyon ve obstrüksüyon ile seyreden çeşitli hastalıklarda, bazı cerrahi tedavi prosedürlerinde ve organ nakli prosedürlerinde hem cerrahi sırasında hem de donör organın kendisinde oluşabilmektedir. Çok çeşitli şekillerde ortaya çıkabilen bu fizyopatoloji genel hasta profilinde azımsanmayacak düzeyde klinik modalite oluşturmaktadır.

İskemi-reperfüzyon hasarının fizyopatolojisinde özetle iskemiye uğrayan dokulardaki ATP eksikliği ve buna bağlı olarak hücre zarı aktif transport kanallarının çalışmaması sebebi ile hücre içi Na^{+2} , Cl^{-} ve Ca^{+2} konsantrasyonunda artış oluşmakta, hücre içi parçacık miktarının artışı osmotik basıncın artmasına sebep olmakta ve buna bağlı olarak da hücreye su girişi ile birlikte hücre hasarının ilk ve geri dönüşümlü basamağı olan hücre şişmesi oluşmaktadır. İskeminin devamı halinde hasar ilerler ve endoplazmik retikulumdan ribozomlar ayrılır. Hücre içi Ca^{+2} artışıyla birlikte fosfolipaz aktivasyonu olur ve membran fosfolipidlerinin kaybı başlar. İlerleyen basamaklarda endoplazmik retikulum membranı erir. Mitokondriler şişer, karyoreksiz ve karyolizis başlar. Lizozomal membran erir ve enzimler plazmaya yayılır. Sonuçta geri dönüşümsüz hücre nekrozu oluşur.

İskemi-reperfüzyon hasarında reperfüzyon safhasında ise hasardan temel olarak ROT ile hücrel ve hümoral immun sistem sorumludur. Reperfüzyonun başlaması ile dolaşım ile birlikte ortama salınan yüksek O_2 seviyesi, ksantin dehidrojenazı ksantin oksidaza çevirir ve süperoksit radikali oluşur. İskemi esnasında salınan sitokinler, kemokinler ve eikozanoidler PNL'lerin hasar ortamına çekilmesini sağlar. Ortama çekilen PNL hücrelerinin oluşturduğu miyeloperoksidaz aktivitesi ROT oluşumuna sebep olmaktadır (106,107).

Reperfüzyon esnasında karaciğerde vasküler endotel hücrelerinde oluşan şişme, sentezlenen adezyon molekülleri ve endotelial hücrelerdeki reseptör artışı, dolaşımdaki PNL'lerin endotele tutunmasına ve migrasyonuna sebep olmaktadır. Vasküler endotelde gelişen ödem ve vazokonstrüksiyonun da etkisi ile akım yavaşlar ve trombosit agregasyonu oluşur. Eikozanoidlerin de etkisi ile mikrosirkülasyon bozulur (108,109,110,111,112).

ROT oluştuktan sonra lipid peroksidasyonu oluşması, hücre zarı fosfolipidlerinde peroksidasyon oluşumu ve hücre zarı parçalanması ile kalıcı hasar oluşur (113,114).

İskemi-reperfüzyon modelinde oluşan hasarı azaltmaya ya da hafifletmeye yönelik çeşitli çalışmalar tasarlanmıştır. Bu çalışmalar temelde iskemiye azaltacak mekanizmalar ya da reperfüzyon hasarını azaltacak mekanizmalar şeklinde 2 farklı model olarak planlanmıştır. Bu modellerden bazıları uzak iskemik önkoşullama modelleri (115,116,117,118), yakın iskemik önkoşullama modelleri (119,120), iskemik sonkoşullama modelleri (121,122) ve ılımlı hipotermi modelleridir (123,124).

Reperfüzyon hasarının önüne geçmek için ROT etkilerini baskılayacak ya da ROT oluşumunu azaltacak modeller tasarlanmıştır. Antioksidan etkinliği olan maddeler reperfüzyon hasarını azaltmak için iskemi-reperfüzyon modellerinde kullanılmıştır. Melatonin bu maddelerden biridir ve iskemi-reperfüzyon modelinde hasarı azalttığı gösterilmiştir (125,126,127).

İskemi-reperfüzyon modelinde, reperfüzyon esnasında görülen vazokonstriksiyon doku mikrosirkülasyonunu bozar ve hasarı derinleştirir. İskemi-reperfüzyon sürecinde azalan NO, vazodilatatör etkisini oluşturmada yetersiz kalmaktadır. NO, L-arjininden NOS yardımı ile sentezlenmektedir. NO güçlü bir vazodilatatördür ve bu modelden yola çıkarak hasarı azaltmak için L-arjinin kullanılmıştır (128,129).

Güçlü antioksidan özelliğinden dolayı karnozin birçok deneysel iskemi-reperfüzyon modelinde kullanılmıştır (130,131,132,133).

Benzer amaçlarla daha birçok ajan deneysel modellerde çalışılmıştır. Bu ajanlardan birisi de ilk olarak 1993 yılında Kitamura ve arkadaşları tarafından feokromasitoma hücrelerinden izole edilen ve 52 aminoasitten oluşan bir polipeptit olan AM'dir. Kitamura ve arkadaşları aynı çalışmada, AM molekülünün vazodilatatör ve hipotansif etkinliğini de ortaya koymuştur (134).

Yapılan çalışmalarda AM'nin, vazodilatasyon ile vasküler direnci düşürerek hipotansiyona neden olduğu gösterilmiştir. AM'nin pozitif inotropik etkisi, azalan periferik vasküler dirence bağlı olarak kardiyak atım hacminin artması sonucu oluşmaktadır (135). Yapılan çalışmalarda AM'nin, vasküler düz kas hücreleri

üzerindeki CGRP reseptörleri aracılığı ile c-AMP seviyesini artırarak vazodilatasyon oluşturduğu gösterilmiştir (136,137,138). Bazı çalışmalarda vazodilatatör etkinin NO aracılığıyla oluştuğu (139), bazı çalışmalarda ise prostaglandin sekresyonunu artırarak vazodilatasyona yol açtığı belirtilmektedir (140).

Düşük doz AM'nin, glomerüler sodyum filtrasyon hızını artırmadan, tübüler sodyum geri emilimini engelleyerek natriürez sağladığı gösterilmiştir (141). Yapılan bir çalışmada AM'nin renal mezenkim hücrelerini c-AMP aracılığıyla gevşeterek glomerüler filtrasyon hızını artırdığı belirtilmektedir (142). Yapılan diğer bir çalışmada AM'nin, anjiotensin-2'nin sebep olduğu renal mezenkimal hücrelerdeki proliferasyon ve migrasyonu ve ROT oluşumunu baskıladığı ortaya konmuştur (143). Hücre proliferasyonu ile ilgili olarak AM'nin, bazı çalışmalarda hücre proliferasyonunu artırdığı, bazılarında da azalttığı gösterilmiştir (144).

AM'nin hipotansiyon oluşturmeyen dozlardaki infüzyonunun bile renin aktivitesini ve salınımını artırdığı tespit edilmiştir (145). İntraserebroventriküler olarak uygulanan AM'nin Na^{+2} ve K^{+} 'un kandaki seviyesini artırdığı gösterilmiştir (146). AM'nin proinflamatuvar sitokin salınımını baskıladığına dair veriler elde edilmiştir (147,148). AM'nin ROT, endotoksin ve sitokin etkilerine bağlı olarak artan endotelial permeabiliteyi azalttığı belirtilmektedir (149).

Zhang ve arkadaşlarının intestinal iskemi-reperfüzyon modelinde AM+AMBP-1 kombinasyonunun etkilerini araştırmak üzere yaptıkları çalışmada, giderek artan üç farklı dozda AM+AMBP-1 infüzyonu ile hem akciğer hem de barsak dokusundaki TNF- α , IL-6 ve MPO düzeyinde anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir (150).

Dwivedi ve arkadaşlarının intestinal iskemi-reperfüzyon modelinde uzak organ hasarını araştırmak üzere yaptıkları bir çalışmada, AM+AMBP-1 infüzyonu sonrası akciğer dokusundaki TNF- α , IL-6 ve MPO düzeyleri ile akciğer dokusundaki histopatolojik hasar skorunun belirgin azaldığı gösterilmiştir (105).

Carrizzo ve arkadaşlarının yaptığı intestinal iskemi-reperfüzyon modelinde AM+AMBP-1 infüzyonu sonrası rat serumundaki ölçümlerde TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 seviyesinde belirgin düşüş tespit edilmiştir (151).

Kerem ve arkadaşlarının tasarladığı hepatik iskemi-reperfüzyon modelinde serum TNF- α , IL-1 β ölçümleri yapılmış, AM, L-NAME(NL'-nitro-L-arginin metil

esterin), AM+L-NAME infüzyonu karşılaştırılmıştır. L-NAME'nin proinflamatuvar sitokinleri baskılayamadığı ve AM ile kombine verildiğinde de AM'nin antiinflamatuvar etkinliğini azalttığı gösterilmiştir (152).

Yang ve arkadaşlarının tasarladığı hepatik iskemi-reperfüzyon modelinde hem dokuda hem de plazmada m-RNA düzeyleri ölçülmüştür. Sham grubu ile iskemi-reperfüzyon grubu kıyaslandığında, iskemi-reperfüzyon sonrası AM gen ekspresyon düzeyi anlamlı olarak artış göstermiş, AMBP-1 gen ekspresyon düzeyinde de anlamlı olarak azalma tespit edilmiştir. Aynı çalışmada karaciğer dokusunda immunohistokimyasal olarak ölçülen MPO düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı azalma saptanmıştır. AM+AMBP-1 infüzyonu ile serumda ölçülen TNF- α ve IL-6 düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı düşüş tespit edilmiştir. Bu çalışmada karaciğer dokusu için histopatolojik hasar skorlarına göre yapılan ölçümlerde, AM+AMBP-1 uygulanan grupta hasar skorunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir (153).

Daha önce oluşturulmuş iskemi-reperfüzyon modellerinden elde edilen veriler doğrultusunda tasarlanmış olduğumuz hepatik iskemi-reperfüzyon modelimizde, çeşitli fizyolojik yollarda etkinliği olduğu deneysel modellerle ortaya konmuş olan ve normalde insan vücudundaki çoğu hücrede sentezlenebilen bir peptit olan AM'nin kullanılmasına karar verilmiştir. AM'nin, aynı zamanda AM etkinliğini potansiyalize ettiği düşünülen AMBP-1 peptidi ile kombine edilerek uygulanması uygun görülmüştür.

Bu modelde yapılmış diğer çalışmalar değerlendirildiğinde %20, %50, %70, %100 hepatik iskemi kullanan modeller tespit edilmiştir. Uygulanan iskemi süresinin genelde 5–10 dk ile 90 dk arasında değişmekte olduğu saptanmıştır. Reperfüzyon süresi olarak da 60–240 dk arasında uygulanmış modeller tespit edilmiştir (151,152,153). Kendi oluşturmuş olduğumuz modelde de 60 dk total iskemi, ilk 30 dk'sı ilaç infüzyonuyla birlikte olmak üzere toplamda 270 dk reperfüzyon uygulanmıştır. Daha önce çalışılmış iskemi-reperfüzyon modellerinde parsiyel iskemi modellerine getirilen eleştirilerde sadece tek bir lobu kapsayan ya da portanın sadece bir dalını içeren ve dolayısıyla total olmayan modellerin tam bir iskemi kliniğiyle örtüşmediği yönünde eleştiriler dikkate alınmış ve modelimizde total iskemi uygulanmıştır.

Çeşitli modellerde AM+AMBP-1 infüzyonunun proinflamatuvar sitokinler üzerine olan etkinliği ölçülmüştür. Hemorajik şok modelinde resüsitasyon sürecinde uygulanan AM+AMBP-1 infüzyonunun, TNF- α ve IL-6 sentezi üzerine baskılayıcı etkinliği gösterilmiştir (156,157). Diğer bir çalışmada, çekal ligasyon ve perforasyon yöntemi ile oluşturulan septik şok modelinde, uygulanan AM+AMBP-1 infüzyonu sonrasında TNF- α ve IL-6 seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (158). Wu ve arkadaşlarının hücre kültüründe lipopolisakkarit uygulaması ile oluşturdukları sepsis modelinde, AM+AMBP-1 infüzyonunun, proinflamatuvar sitokin sentezini belirgin olarak azalttığı tespit edilmiştir (148). Yapılmış olan çalışmalarda intestinal iskemi-reperfüzyon modelinde AM+AMBP-1 infüzyonunun, iskemi-reperfüzyon hasarı sırasında sentezlenen proinflamatuvar sitokinleri baskıladığı belirlenmiştir (105,150,151,159). Bizim yöntemimize benzer şekilde oluşturulmuş olan hepatik iskemi-reperfüzyon modellerinde, AM+AMBP-1 infüzyonu sonrasında proinflamatuvar sitokin düzeyleri, salin grubuna göre anlamlı derecede düşük tespit edilmiştir (152,153).

İskemi-reperfüzyon çalışmalarında genel olarak uzak organ hasarı (reperfüzyon hasarı) üzerine araştırmalar yapılmış ve hasar parametreleri iskemi uygulanan organda değil, uzak organlarda ya da serumda çalışılmıştır. Uzak organ hasarını ölçmede akciğer en uygun organlardandır. Kendi çalışma modelimizde de hem uzak hem de yakın organ hasarını tespit etmek için akciğer ve karaciğer dokusunda proinflamatuvar sitokinler ölçülmüştür. Hepatik iskemi-reperfüzyon modelimizde, uzak organ hasarının göstergesi olarak akciğer dokusunda yapılan ölçümler sonucunda, AM+AMBP-1 infüzyonunun proinflamatuvar sitokinlerin baskılanmasında etkili olduğu görülmüştür. Karaciğer dokusunda yapılan ölçümlerde proinflamatuvar sitokin düzeyleri, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, salin grubuna göre düşük tespit edilmiştir. AM+AMBP-1 infüzyonunun karaciğer dokusunda anlamlı bir antiinflamatuvar etkinlik gösterememiş olması karaciğer dokusunun hem iskemi hem de reperfüzyon hasarı şeklinde maruz kaldığı ağır tabloya bağlanmıştır.

Hücrel savunma sisteminin %60-70'lik bir kısmını oluşturan PNL'lerin vücut savunmasında önemli etkinliği mevcuttur. PNL'lerin savunma mekanizmaları arasında myeloperoksidaz enzim aktivitesi ile oluşturdukları ROT hasarı

bulunmaktadır. Aktive olmuş ve inflamasyon bölgesine çekilmiş olan PNL'lerin oluşturmuş olduğu hasar miktarı, inflamasyon bölgesindeki MPO düzeyi ile ölçülebilmektedir. Daha önce yapılmış olan çalışmalarda, intestinal ve hepatik iskemi-reperfüzyon modellerinde AM+AMBP-1 infüzyonu uygulanan grupta, inflamasyon bölgesindeki MPO düzeyi salin grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (150,105,153). Hepatik iskemi-reperfüzyon modelimizde akciğer ve karaciğer dokusunda yapılan ölçümlerde, yapılmış olan diğer çalışmalara benzer şekilde, AM+AMBP-1 infüzyonu uygulanan grupta MPO düzeyleri, salin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda AM+AMBP-1 infüzyonunun, PNL'lere bağlı organ hasarını baskıladığı görüşü desteklenmiştir.

İskemi-reperfüzyon hasarındaki önemli hasar parametrelerinden olan ve ROT'un etkisi ile oluşan lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA, pek çok deneyde çalışılmıştır (80). Özellikle hücre membran fosfolipidlerinde oluşan peroksidasyon, ROT'a bağlı hücre hasarının temel mekanizmasıdır. Kerem ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, hepatik iskemi-reperfüzyon modelinde karaciğer dokusunda ölçülen MDA düzeyleri, AM+AMBP-1 infüzyonu uygulanan grupta, salin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük tespit edilmiştir (152). Bizim çalışmamızda ise Kerem ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak karaciğer dokusundaki ölçümlerde MDA düzeyleri, AM+AMBP-1 infüzyonu uygulanan grupta salin grubuna göre düşük bulunmuş ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Akciğer dokusunda ise MDA düzeyi, AM+AMBP-1 infüzyonu uygulanan grupta salin grubuna göre anlamlı olarak düşük tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda AM+AMBP-1 infüzyonunun proinflamatuvar sitokinleri baskılamak suretiyle inflamasyon bölgesine PNL göçünü azaltarak ve dolayısı ile ROT üretimini baskılayarak hasar oluşumunu engellemede etkili olduğu düşünülmüştür.

Antioksidan mekanizmalar arasında önemli bir yeri ve etkinliği olduğu bilinen SOD, süperoksit radikallerini peroksit radikallerine indirgemekte ve detoksifikasyon mekanizmasında etkinlik göstermektedir. SOD, hemen hemen bütün hücrelerde bulunmaktadır. İskemi-reperfüzyon modellerinde çeşitli maddelerin antioksidan etkinliğini ölçmede kullanılmıştır (125,126,130,160). Hsu ve

arkadaşlarının hepatik iskemi-reperfüzyon modelinde SOD seviyesinin, iskemi-reperfüzyon grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (31). Bizim çalışmamızda ise akciğer dokusundaki ölçümlerde SOD seviyesi salin grubunda, sham grubuna göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur. AM+AMBP-1 infüzyonu uygulanan grupta SOD seviyesinde anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Karaciğer dokusundaki ölçümlerde ise her üç grup arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Sadece uzak organ hasarının gözlemlendiği akciğer dokusu ele alındığında AM+AMBP-1 infüzyonunun, antioksidan mekanizmaları baskılamadığı söylenebilir. Karaciğer dokusundaki ölçümlerde ise salin grubundaki enzim düzeyinin sham grubu ile aynı olması, karaciğerin akciğere göre daha ağır bir organ hasarına maruz kalması ile açıklanabilir. Bu sonucun organ iskemisi sonucu hücre içi enzim sentez aktivitesinin baskılanmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Ancak karaciğerdeki ağır tabloya rağmen AM+AMBP-1 infüzyonunun SOD sentezini baskılamamış olması dahi yüz güldürücüdür.

İskemi-reperfüzyon hasarının tespiti ve hasar seviyesinin ölçümü için çeşitli hasar skorlama sistemleri tanımlanmıştır. Bu skorlama sistemleri, hücre hasar safhalarındaki doku değişikliklerini içermekte ve bulgunun seviyesine göre puanlanmaktadır. Her ne kadar göreceli de olsa, mevcut doku hasarını en somut ortaya koyan yöntem histopatolojik incelemedir. İskemi-reperfüzyon modellerinde de doku hasarı için histopatolojik bakı yapılmıştır. Dwivedi ve arkadaşlarının intestinal iskemi-reperfüzyon modelinde AM+AMBP-1 infüzyonu uygulaması, uzak organ hasarını azaltmada etkili bulunmuştur (105). Carrizzo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada intestinal iskemi-reperfüzyon modelinde AM+AMBP-1 infüzyonu uygulanan grupta barsaktaki histopatolojik hasar skoru, kontrol grubuna göre belirgin olarak düşük bulunmuştur (151,159). Kerem ve arkadaşlarının hepatik iskemi-reperfüzyon modelinde AM+AMBP-1 infüzyonu karaciğer hasarını önlemede etkin bulunmuştur (152). Tasarlamış olduğumuz hepatik iskemi-reperfüzyon modelimizde ise biyokimyasal parametrelerde genel olarak yüz güldürücü sonuçların alınması ile beraber histopatolojik olarak organ hasarını incelediğimizde, hem karaciğer hem de akciğer dokusunda hasar skorlama sistemi ile ölçtüğümüz hasar seviyelerinde yüz güldürücü sonuçlar alınamamıştır. Tüm parametreler AM+AMBP-1 grubunda salin grubuna göre düşük tespit edilmiş ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı

bulunmamıştır. Biyokimyasal hasar parametrelerinde yüz güldürücü sonuçların alınmasına rağmen histopatolojik hasar skorlamasında istatistiksel olarak anlamlı bir düzelmenin izlenmemiş olması iskemi-reperfüzyon mekanizmasıyla oluşan doku hasarında, henüz ortaya koyamadığımız pekçok inflamatuvar yolakların bulunduğu ve mevcut ajanımızın etkili olmakla birlikte tüm inflamatuvar yolakları baskılayamadığını düşündürmüştür. Biyokimyasal hasar parametrelerindeki düzelmenin histopatolojik olarak izlenememiş olması iskemi-reperfüzyon hasarının aydınlatılması için yeni ve daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

İmmunohistokimyasal çalışmada ise akciğer dokusunda AM antikoru ile yapılan boyamalar değerlendirildiğinde iki önemli sonuç gözlenmiştir. Bunlardan ilki bronş ve bronşiyol epiteli ile pnömositlerde görülen pozitif boyanmadır. Pnömositlerdeki boyanma hücrenin tamamında gözlenmiştir. Bronş/bronşiyol epitelinde ise hücrenin apikal yüzeyinde lümene bakan yüzünü sıvama şeklinde kapladığı tespit edilmiştir.

Akciğer dokusunda AM'nin yoğun olarak tespit edildiği ikinci tip doku, damarlara ait adventisya tabakasıdır. AM büyük ve orta çaplı arter ile venlerin adventisyasında yoğun olarak gözlenmiş, daha küçük çaplı damarlarda ise daha az yoğunlukta saptanmıştır. Damar adventisyası dışındaki bağ dokusu bölgelerinde, gruplar arasında bağ dokusu artışı açısından farklılık olsa bile, herhangi bir boyanma gözlenmemiştir. Boyanma bölgesinin genişliği ve yoğunluğu göz önüne alınarak AM'nin bağ dokusunda fibroblastlarca yüksek miktarlarda sentez edildiği ya da dolaşımdaki AM'nin fibroblastlarca tutulduğu lehine düşünülebilir (154,155,161,162).

Karaciğer dokusuyla ilgili boyamalar incelendiğinde, AM sentezinin en net gözlemlendiği bölgelerin damarlara ait adventisya kısımları olduğu belirlenmiştir. Her iki organda da yapılan immunohistokimyasal tetkikte damar adventisyasındaki yoğun boyanma major sentez, salınım ya da tutulum yerinin damar adventisyası olduğunu düşündürmektedir. Her iki dokudaki boyanma miktarı ve boyanmanın bağ doku artışı veya inflamasyonla korelasyon göstermemesi AM'nin, karaciğerde antiproliferatif, antiinflamatuvar etkinliğinden ziyade vazodilatatör etkinliğinin olduğu şeklinde düşünülebilir.

Literatür taramalarında karaciğer ve akciğer dokusunda hem normal koşullarda hem de iskemi-reperfüzyon hasarındaki AM varlığını, miktarını ve dokudaki lokalizasyonunu immünohistokimyasal yöntemle gösteren bir makaleye rastlanmamıştır. Her iki dokuda da sham grubu ile kıyaslandığında hem salin hem de AM+AMBP-1 kombinasyonu uygulanan grupta AM'nin göreceli olarak daha fazla tespit edilmesi, yapılan diğer çalışmalarla da gösterildiği gibi (151,152) AM'nin iskemi-reperfüzyon hasarının kontrol altına alınmasındaki doğal savunma mekanizmalarından olduğunu destekler bir bulgudur.

Çalışmamızda ortaya çıkan tablo doğrultusunda, AM+AMBP-1 kombinasyonu infüzyonu biyokimyasal hasar parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş sağlamış ancak organ hasarını engellemede istatistiksel olarak anlamlı bir etkinlik gösterememiştir. AM+AMBP-1 kombinasyonu etkinliği ile ilgili daha başarılı sonuçlar elde edebilmek için ek çalışmalara ihtiyaç olduğu görüşünderiz. Oluşturulacak yeni modellerle, etkin ilaç dozu ayarlamaları ve yeni ajanların kombinasyonu ile etkinliğin artırılması mümkün görülmektedir. Yaptığımız çalışma ve diğer çalışmalar göz önüne alındığında, hem yakın organ hasarında hem de uzak organ hasarında yüz güldürücü sonuçlar alınabileceği aşikardır.

6. ÖZET

Günümüz cerrahisinin ulaşılmış olduğu noktada özellikle organ nakli cerrahisinde ve organ hasarı tamir cerrahilerinde cerrahi tekniğin gereği olarak iskemi oluşturulmaktadır. Hastalığın ya da cerrahi tedavinin bir parçası olarak oluşmuş olan iskemi-reperfüzyon hasarının önüne geçmek, hem hastalığın kontrolünde etkili olacak hem de cerrahi tedavinin uygulanabilirliğini ve etkinliğini artıracaktır. İskemi-reperfüzyon hasarının önüne geçebilmek için klinik deneylerle pek çok model oluşturulmuş, pek çok yöntem denenmiş ve pek çok terapötik ajan kullanılmıştır.

AM'nin vazodilatatör, antiinflamatuvar, antiproliferatif, natriüretik etkileri tanımlanmıştır. AMBP-1'in, birlikte kullanıldığında AM'nin etkinliğini artırdığı gösterilmiştir. Oluşturmuş olduğumuz hepatik iskemi-reperfüzyon modelinde AM'nin antiinflamatuvar ve vazodilatatör etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla AM ve AMBP-1 kombinasyonu infüzyonu kullanılmıştır.

Sham, kontrol ve AM+AMBP-1 infüzyon grubu olarak 3 grup oluşturulmuş ve sham grubunda sadece laparotomi uygulanmıştır. Kontrol ve AM+AMBP-1 infüzyon grubunda iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulmuştur. Her üç grupta da akciğer ve karaciğer dokuları alınarak hem biyokimyasal hasar parametreleri hem de histolojik hasar değerlendirilmiş ve immunohistokimyasal olarak da AM düzeyi gösterilmiştir. AM+AMBP-1 infüzyonu uygulanan grupta kontrol grubuna göre biyokimyasal hasar parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük değerler tespit edilmiştir. Histopatolojik hasar skorları karşılaştırıldığında 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

AM+AMBP-1 infüzyonunun biyokimyasal hasar parametrelerinde oluşturmuş olduğu düşük değerlere rağmen histopatolojik hasar oluşumunda olumlu etkinlik sağlayamamış olması, iskemi-reperfüzyon oluşumundaki tanımlanmış hasar mekanizmalarını inhibe etmekle birlikte henüz tanımlanamamış mekanizmaların varlığı lehine yorumlandı. AM molekülü üzerine yapılacak yeni deneylerin de yardımıyla, iskemi-reperfüzyon hasarının engellenmesinde ya da azaltılmasında optimum etkinliğin sağlanabileceği düşünülmüştür.

7. SUMMARY

At the point where today's surgery has reached, ischemia is being formed as a surgical technique particularly in transplantation surgery and organ-injury repair surgery. Preventing ischemia-reperfusion injury caused by the surgical therapy and disease will be useful in managing the disease and will increase the effectiveness and applicability of the surgical therapy as well. Many models have been created, many methods have been tried and many therapeutic agents have been used to prevent ischemia-reperfusion injury.

Adrenomedullin has been shown to have vasodilator, anti-inflammatory, anti-proliferative and natriuretic effects. Adrenomedullin Bağlayıcı Protein-1 has been indicated to increase the efficiency of Adrenomedullin when they are used together. We investigated the anti-inflammatory and vasodilator efficacy of Adrenomedullin in a model of hepatic ischemia-reperfusion. To this end, an infusion of Adrenomedullin and Adrenomedullin Bağlayıcı Protein-1 combination was used.

Three groups were set up as Sham, control and Adrenomedullin + Adrenomedullin Bağlayıcı Protein-1 infusion and in the group Sham only laparotomy was performed. In control and Adrenomedullin + Adrenomedullin Bağlayıcı Protein-1 infusion groups we generated ischemia-reperfusion injury. We obtained lung and liver samples from each group and investigated both biochemical injury parameters and histologic injury and we also showed Adrenomedullin levels immunohistochemically. Adrenomedullin + Adrenomedullin Bağlayıcı Protein-1 infusion group has been shown to have statistically significant decreased levels in biochemical injury parameters compared with the control group. There was no statistically significant difference regarding histopathologic injury scores among three groups.

The finding that Adrenomedullin + Adrenomedullin Bağlayıcı Protein-1 infusion has provided low levels in biochemical injury parameters but did not have any positive effect on histopathologic injury formation is interpreted as the infusion

inhibits injury mechanisms known for ischemia-reperfusion formation but still it's likely that there are undefined mechanisms. It is considered that with the help of further studies on Adrenomedullin molecule, optimum efficiency in the prevention or decrease of ischemia-reperfusion injury can be attained.

8. ŞEKİLLER, RESİMLER ve TABLOLAR DİZİNİ

<u>Sekiller</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1(Karaciğer sinüsoidi, portal triad ve karaciğer zonları)	4
Şekil 2(Karaciğer Segmentleri ve portal ven ve hepatik ven ana dalları)	8
Şekil 3(Safra yolları anatomisi)	10
Şekil 4(Grupların karaciğer dokusundaki median IL-6 düzeyleri)	42
Şekil 5(Grupların akciğer dokusundaki median IL-6 düzeyleri)	43
Şekil 6(Grupların karaciğer dokusundaki median TNF- α düzeyleri)	45
Şekil 7(Grupların akciğer dokusundaki ortalama TNF- α düzeyleri)	46
Şekil 8(Grupların karaciğer dokusundaki median MPO düzeyleri)	48
Şekil 9(Grupların akciğer dokusundaki median MPO düzeyleri)	49
Şekil 10(Grupların karaciğer dokusunun median MDA düzeyleri)	51
Şekil 11(Grupların akciğer dokusunun median MDA düzeyleri)	52
Şekil 12(Grupların karaciğer dokusunun median SOD düzeyleri)	54
Şekil 13(Grupların akciğer dokusunu median SOD düzeyleri)	55
<u>Resimler</u>	<u>Sayfa No</u>
Resim 1(Portal ven ve hepatik arter)	27
Resim 2(Buldog klemple klempe edilen portal ven hepatik arter)	27
Resim 3(Ratın kuyruk veni kateterizasyonu)	28
Resim 4(Grup 1 akciğer dokusu H-E A: 4X B: 40X büyütmedeki görüntüsü)	68
Resim 5(Grup1 karaciğer dokusu H-E A: 20X, B: 10X Büyütmedeki görüntüsü)	69
Resim 6(Grup 2 H-E A: akciğer dokusundaki 20X B: karaciğer dokusundaki 10X büyütmedeki görüntüsü)	70
Resim7(Grup 3 H-E A: akciğer dokusundan 10X B: karaciğer dokusundan 20X büyütmedeki görüntüsü)	71
Resim 8(Grup 1'e ait dokulardan ADM primer antikor ile boyanmış karaciğer kesiti)	72
Resim 9 (Grup 3'e ait dokulardan ADM primer antikor ile boyanmış karaciğer kesiti)	72
Resim 10(Grup 1'e ait dokulardan ADM primer antikor ile boyanmış karaciğer kesiti)	72
Resim 11(Grup 1'e ait dokulardan ADM primer antikor ile boyanmış akciğer kesitleri)	73
Resim12(Grup 1'e ait dokulardan ADM primer antikor ile boyanmış karaciğer kesitleri)	73
Resim13 (Grup 3'e ait dokulardan ADM primer antikor ile boyanmış akciğer kesitleri)	74
Resim14(Grup 3'e ait dokulardan ADM primer antikor ile boyanmış akciğer kesitleri)	74
Resim15(Grup 2 ye ait ADM primer antikor ile boyanmış akciğer kesitleri)	75

<u>Tablolar</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1: IL-6, TNF- α , MPO, MDA ve SOD'nin tüm gruplardaki karaciğer dokularındaki düzeyleri.	40
Tablo 2: IL-6, TNF- α , MPO, MDA ve SOD'nin tüm gruplardaki akciğer dokularındaki düzeyleri.	41
Tablo 3: Her 3 grubun karaciğer dokusunda IL-6 düzeyleri	42
Tablo 4: Her 3 grubun akciğer dokusunda IL-6 düzeyleri	44
Tablo 5: Her 3 grubun karaciğer dokusunda TNF- α düzeyleri	45
Tablo 6: Her 3 grubun akciğer dokusunda TNF- α düzeyleri	47
Tablo 7: Her 3 grubun karaciğer dokusunda MPO düzeyleri	48
Tablo 8: Her 3 grubun akciğer dokusunda MPO düzeyleri	50
Tablo 9: Her 3 grubun karaciğer dokusunda MDA düzeyleri	51
Tablo 10: Her 3 grubun akciğer dokusunda MDA düzeyleri	53
Tablo 11: Her 3 grubun karaciğer dokusunda SOD düzeyleri	54
Tablo 12: Her 3 grubun akciğer dokusunda SOD düzeyleri	56
Tablo 13: G 1 (Sham Grubu), Akciğer kesitleri skor tablosu	58
Tablo 14: G 2 (İ-R / Salin İnf. Grubu), Akciğer dokuları skor tablosu	59
Tablo 15: Grup 3 (İ-R / AM+AMBP-1 Kom. İnf. Grubu), Akciğer dokuları skor tablosu	60
Tablo 16: G 1 (Sham Grubu), Karaciğer kesitleri skor tablosu	61
Tablo 17: G 2 (İ-R / Salin İnf. Grubu), Karaciğer dokuları skor tablosu	62
Tablo 18: Grup 3 (İ-R / AM+AMBP-1 Kom. İnf. Grubu), Karaciğer dokuları skor tablosu	63
Tablo 19: Akciğer dokusunda her üç grupta ortalama hasar düzeyleri	64
Tablo 20: Karaciğer dokusunda her üç grupta ortalama hasar düzeyleri.	64

9. KAYNAKLAR

- 1- Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Basic Pathology 5th edition, W.B. Saunders Company A Division of Harcourt Brace & Company bölüm 1–2–3; 1–60.
- 2- Wu R, Zhou M, Wang P. Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein–1 downregulate TNF- α in macrophage cell line and rat Kupffer cells. *Regulatory Peptides* 2003;112:19–26.
- 3- Hsu YC, Chou TY, Chen CF, Wang D, Su CL, Hu RT. Rat Liver Ischemia/Reperfusion Induced Proinflammatory Mediator and Antioxidant Expressions Analyzed by Gene Chips and Real-Time Polymerase Chain Reactions. *Transplantation Proceedings* 2008;40:2156–2158.
- 4- Skandalakis JE, Skandalakis LJ, Skandalakis PN, Mirilas P. Hepatic surgical anatomy *Surg Clin North America* 2004;84:413–435.
- 5- Goldsmith NA, Woodburne RT. Surgical anatomy pertaining to liver resection. *Surg Gynecol Obstet* 1957;105:310-8.
- 6- Meyers WC, Ricciardi R, Chiari RS. Liver. Anatomy and development. In: Townsend CM, editor. *Sabiston textbook of surgery*. 16th edition. Philadelphia: WB Saunders; 2001. p. 997–1034.
- 7- Schwartz S, Shires T, Spencer FC, Daly MJ, Fischer JE, Galloway AC. *Principles of Surgery Seventh Edition* McGraw-Hill, A Division of the McGraw.Hill Companies Bölüm 28;1417-1455.
- 8- Moore LK, Dalley FA. *Clinically Oriented Anatomy* Lippincott Williams&Wilkins bölüm 2;263-277.
- 9- Williams PL, Bannister LH, Berry MM et al. editors. *Gray's anatomy of the human body*. 38th edition. Edinburgh (UK): Churchill Livingstone; 1995. p. 90-96.
- 10- Sayek I, Batman F, Aydın M. *Temel Cerrahi* 2004, 3. Baskı, Ankara Güneş Kitabevi Ltd. Şti. Bölüm129;1293-1301.
- 11- The 17th edition of Townsend: *Sabiston Textbook of Surgery* represents an historical landmark. W.B. Saunders comp. 1526-1529.
- 12- Adams DH, Eksteen B. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2006;6:244-51.
- 13- Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology Text & Atlas*. Tenth Edition. USA: McGraw-Hill Companies, 2003;332-344.
- 14- Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histology A Text and Atlas*. Fourth Edition. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2003;532-548.
- 15- Sobotta J, Becher H. *Atlas der Anatomie des menschen* 2. teil 16. auflage Sobotta-Becher 1965.
- 16- Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: A review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery* 2004;24:468-475.
- 17- Bronk SF, Gores GJ. Efflux of protons from acidic vesicles contributes to cytosolic acidification of hepatocytes during ATP depletion. *Hepatology* 1991;14:626-633.
- 18- Carini R, Autelli R, Bellomo G, Albano E. Alterations of cell volume regulation in the development of hepatocyte necrosis. *Exp Cell Res* 1999;248:280-293.
- 19- Gasbarrini A, Borle AB, Farghali H, Bender C, Francavilla A, Van Thiel D. Effect of anoxia on intracellular ATP, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ and cytotoxicity in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1992;267:6654-6663.
- 20- Rosser BG, Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 1995;108:252-275.
- 21- Lentsch AB, Atsushi K, Yoshidome H et al. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000;32:169–173.

- 22- Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpi' E et al. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999;30:1481–1489.
- 23- Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000;32:169-173.
- 24- Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000;190:255-66.
- 25- Radojković M, Stojanović M, Zlatić A, Radojković D, Jeremić L, Kovacević P, Stosić B. Microcirculatory disorders in ischemic/reperfusion hepatic injury. *Vojnosanit Pregl*. 2008;65:913-8.
- 26- Klaus A, Heribert H, Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signaling transduction. *Annual Review of Plant Biology. Health & Medical Complete*. 2004; 55:373–399
- 27- Toyokuni S. Reactive oxygen species- induced molecular damage and its application in pathology. *Pathology International*. 1999; 49(2): 91
- 28- Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*. 2002;192:1–15
- 29- Gedik E, Girgin S, Ozturk H, Obay BD, Ozturk H, Buyukbayram H. Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *World J Gastroenterol*. 2008 Dec 14;14:7101-6.
- 30- Xu SQ, Li YH, Hu SH, Chen K, Dong LY. Effects of Wy14643 on hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol*. 2008 Dec 7;14:6936-42.
- 31- Hsu YC, Chou TY, Chen CF, Wang D, Su CL, Hu RT. Rat liver ischemia/reperfusion induced proinflammatory mediator and antioxidant expressions analyzed by gene chips and real-time polymerase chain reactions. *Transplant Proc*. 2008 Sep;40:2156-8.
- 32- Raghavan S.A.V, Dikshit M. Vascular regulation by the L-arginine metabolites, nitric oxide and agmatine. *Pharmacological Research* 2004; 49:397–414
- 33- Shah V, Haddad FG, Garcia- Cardena G. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *Journal of Clinical Investigation*. 1997; 100:2923–2930
- 34- Clemens MG. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology*.1999; 30:1–5
- 35- Pannen BH, Al-Adili F, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology*. 1998 Mar;27:755-64.
- 36- Peralta C, Rull R, Rimola A et al. Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation*. 2001; 71: 529–536
- 37- Inglott FS, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *The American Journal of Surgery* 2001; 181:160–161
- 38- Turnage RH, Kadesky KM, Bartula L, Myers SI. Intestinal reperfusion up-regulates inducible nitric oxide synthase activity within the lung. *Surgery*. 1995;118:288-93.
- 39- Oberhalzer A., Oberhalzer C., Moldower LL. Cytokine signaling refulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med*. 2000;28:3-12
- 40- Akhorfy KM., Kellum JA., Matzke GR. Unintended immunomodulation. Part II. Effects of pharmacological agents on cytokine activity. *Shock* 2000;13: 346-60
- 41- Beutler B, Caroni A, Cachectin: More than a tumor necrosis factor. *N. Engl. J. Med*. 1987;316:379-85
- 42- Oberhalzer A, Oberhalzer C, Moldower LL. Cytokine signaling refulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med*. 2000;28:3-12
- 43- Horie Y, Wolf R, Russell J, Shanley TP, Granger DN. Role of Kupffer cells in gut ischemia/reperfusion-induced hepatic microvascular dysfunction in mice. *Hepatology*. 1997 Dec;26:1499-505.

- 44- Kalia N, Brown NJ, Wood RF, Hopkinson K, Fairburn B, Pockley AG. Effects of intestinal ischemia-reperfusion injury on rat peripheral blood neutrophil activation. *Dig Dis Sci.* 2003 Sep;48:1677-84.
- 45- Fong Y, Moldawet L, Shires GT, Lowry SF. The biological characteristics of cytokines and their implication in surgical injury. *Surg Gynecol Obstet* 1990;170:363–78.
- 46- Streieter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of tumour necrosis factor in disease states and inflammation. *Crit Care Med* 1993;21:S447– 63.
- 47- Thornton AJ, Strieter RM, Lindley I, et al. Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes. *J Immunol.* 1990;144:2609 –13.
- 48- Pober JS. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium: physiology and pathology. *Am J Pathol* 1998;133:426 –33.
- 49- Wanner GA, Ertel W, Muller P. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock.* 1996;5: 34–40.
- 50- Tullis MJ, Brown S, Gewertz BL. Hepatic influence on pulmonary neutrophil sequestration following intestinal ischemia-reperfusion. *J Surg Res.* 1996;66:143-6.
- 51- Sorkine P, Szold O, Halpern P, Gutman M, Gremland M, Rudick V, Goldman G. Gut decontamination reduces bowel ischemia-induced lung injury in rats. *Chest.* 1997;112:491-5.
- 52- Köksoy C, Kuzu MA, Kuzu I, Ergün H, Gürhan I. Role of tumour necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischaemia-reperfusion. *Br J Surg.* 2001;88:464-8.
- 53- Turnage RH, Guice KS, Oldham KT. The effects of hypovolemia on multiple organ injury following intestinal reperfusion. *Shock.* 1994;1:408-12.
- 54- Kuzu MA, Köksoy C, Kuzu I, Gürhan I, Ergün H, Demirpence E. Role of integrins and intracellular adhesion molecule-1 in lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *Am J Surg.* 2002;183:70-4.
- 55- Turnage RH, Bagnasco J, Berger J, Guice KS, Oldham KT, Hinshaw DB. Hepatocellular oxidant stress following intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res.* 1991;51:467-71.
- 56- Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M. Up-regulation of oxygen-derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplantation.* 1997;64:1398–1403.
- 57- Suwa T, Hogg JC, Klut ME, Hards J, van Eeden SF. Interleukin-6 changes deformability of neutrophils and induces their sequestration in the lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:970-6.
- 58- Hierholzer C, Kalff JC, Audolfsson G, Billiar TR, Tweardy DJ, Bauer AJ. Molecular and functional contractile sequelae of rat intestinal ischemia/reperfusion injury. *Transplantation.* 1999;15;68:1244-54.
- 59- Kimura F, Miyazaki M, Suwa T, Sugiura T, Shinoda T, Itoh H, Nakagawa K, Ambiru S, Shimizu H, Yoshitome H. Evaluation of total hepatic vascular exclusion and pringle maneuver in liver resection. *Hepatogastroenterology.* 2002;49:225-30.
- 60- Kimura F, Miyazaki M, Suwa T, Kakizaki S, Itoh H, Kaiho T, Nakajima N. Increased serum interleukin-6 level and reduction of hepatic acute-phase response after major hepatectomy. *Eur Surg Res.* 1996;28:96-103.
- 61- Matsumoto T, O'Malley K, Efron PA, Burger C, McAuliffe PF, Scumpia PO, Uchida T, Tschoeke SK, Fujita S, Moldawer LL, Hemming AW, Foley DP. Interleukin-6 and STAT3 protect the liver from hepatic ischemia and reperfusion injury during ischemic preconditioning. *Surgery.* 2006;140:793-802.
- 62- Tacchini L, Cairo G, De Ponti C, Massip M, Rosellò-Catafau J, Peralta C. Up regulation of IL-6 by ischemic preconditioning in normal and fatty rat livers: association with reduction of oxidative stress. *Free Radic Res.* 2006;40:1206-17.
- 63- Lentsch AB, Yoshidome H, Kato A et al. Requirement for interleukin-12 in the pathogenesis of warm hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Hepatology* 1999;30:1448–1453.
- 64- Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 suppresses hepatic/ischemia reperfusion injury in mice: implications of a central role for NF- κ B. *Hepatology* 1999;30:203– 8.

- 65-**Minor T, Isselhard W, Yamaguchi T. Involvement of platelet activating factor in microcirculatory disturbances after global hepatic ischemia. *J Surg Res* 1995;58:536–40.
- 66-**Serizawa A, Nakamura S, Suzuki S, et al. Involvement of plateletactivating factor in cytokine production and neutrophil activation after hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatology* 1996;23:1656–63.
- 67-**Lichtman SN, Lemasters JJ. Role of cytokines and cytokine-producing cells in reperfusion injury to the liver. *Seminars Liver Disease*. 1999; 19: 171–87.
- 68-** Figueroa D.J. , Breyer R.M., Defoe S.K et al. Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine* 2001;163: 226–233
- 69-** Pober JS. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium: physiology and pathology. *American Journal of Pathology*. 1998;133:426–433
- 70-** Smith CW, Jaeschke H. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Journal of Leukocyte Biology* .1995; 57:368–374
- 71-** Marklund SL. Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem J*. 1984. May 15;220:269-72.
- 72-** Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7915-22.
- 73-**Gonzales R, Auclair C, Voisin E, Gautero H, Dhermy D, Boivin P. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Res*. 1984. Sep;44:4137-9.
- 74-** Takahashi K, Cohen HJ. Selenium-dependent glutathione peroxidase protein and activity: immunological investigations on cellular and plasma enzymes. *Blood*, 1986;68:640-645.
- 75-** Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994, Sep 10;344: 721-4.
- 76-** Frei B. Reactive oxgen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of Action.,*The American Journal of Medicine* 1994; 97:5-12
- 77-** Bast A, Haenen GRMM, Cees JAD. Oxidants and antioxidants: State of the art. *The American Journal of Medicine* 1997;91:2-13
- 78-** Smirnoff N, Pallanca JE. Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 1996;24:472-8.
- 79-** Henderson JM. Liver transplantation and rejection: an overview. *Hepato-Gastroenterol* 1999;46:1482-4.
- 80-** Slater TF, Cheeseman KH, Davies MJ, Proudfoot K, Xin W. Free radical mechanisms in relation to tissue injury. *Proc Nutr Soc*. 1987;46:1-12
- 81-** Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev*. 2000;21:138-167
- 82-** Jougasaki M, Burnett Jr JC. Adrenomedullin as a regulator peptide. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15: 293-295
- 83-** Kapas S, Martinez A, Cuttitta F, Hinson JP. Local production and action of adrenomedullin in the rat adrenal glomerulosa. *J Endocrinol* 1998;156: 477-484
- 84-** Brain SD, Cambridge H. Calcitonin gene-related peptide: vasoactive effects and potential therapeutic role. *Gen Pharmacol* 1996;27:607-611.
- 85-** Eguchi S, Hirata Y, Kano H, Sato K, Watanabe Y, Watanabe TX, Nakajima K, Sakakibara S, Marumo F. Specific receptors for adrenomedullin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1994;340:226-230
- 86-** Ishizaka Y, Ishizaka Y, Tanaka M, Kitamura K, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H, Eto T. Adrenomedullin stimulates cyclic AMP formation in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;200:642-646
- 87-** Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma.

Biochem Biophys Res Commun. 1993;192:553-60.

88- Dogan A, Suzuki Y, Koketsu N, Osuka K, Saito K, Takayasu M, Shibuya M, Yoshida J. Intravenous infusion of adrenomedullin and increase in regional cerebral blood flow and prevention of ischemic brain injury after middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17:19-25.

89- Kitamura K, Kangawa K, Ishiyama Y, Washimine H, Ichiki Y, Kawamoto M, Minamino N, Matsuo H, Eto T. Identification and hypotensive activity of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP). *FEBS Lett.* 1994;351:35-7.

90- Di Iorio R, Marinoni E, Cosmi EV. Adrenomedullin in pre-eclampsia. *Lancet.* 1998;351:676-7.

91- Di Iorio R, Marinoni E, Scavo D, Letizia C, Cosmi EV. Adrenomedullin in pregnancy. *Lancet.* 1997;349:328.

92- Hirata Y, Hayakawa H, Suzuki Y. Mechanisms of adrenomedullin-induced vasodilatation in the rat kidney. *Hypertension* 1995;25: 790-795

93- Chini E, Chini CCS, Bolliger C. Cytoprotective effects of adrenomedullin in glomerular cell injury: Central role of cAMP signaling pathway. *Kidney Int* 1997;52:917-925

94- Shimekake Y, Nagata K, Ohta S et al. Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca²⁺ mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* 1995;270:4412-7.

95- Lang-Rollin I, Schurek JO, Lang RE. Platelet-induced inhibition of adrenomedullin secretion. *Eur J Pharmacol.* 2001;427:115-8.

96- Hofbauer KH, Jensen BL, Kurtz A, Sandner P. Tissue hypoxxygenation activates the adrenomedullin system in vivo. *Am J Physiol – Regul Integr C* 2000;278:513–519

97- Hayashi M, Shimosawa T, Fujita T: Hyperglycemia increases vascular adrenomedullin expression. *Biochem Biophys Res Commun,* 1999; 258:453–456

98- Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a Multifunctional Regulatory Peptid. *Endocrine Rewievs.* 2000;21:138-167.

99- Asakawa H, Nishikimi T, Suziki T, Hara S, Tsubokou Y, Yagi H, Yabe A, Horinaka S, Kangawa K, Matsuoka H. Elevation of two molecular forms of adrenomedullin in plasma and urine in patients with acute myocardial infarction treated with early coronary angioplasty. *Clin Sci.* 2001;100:117-126.

100- Elsasser TH, Kahl S, Martínez A, Montuenga LM, Pio R, Cuttitta F. Adrenomedullin binding protein in the plasma of multiple species: characterization by radioligand blotting. *Endocrinology.* 1999;140:4908-11

101- Friese MA, Hellwage J, Jokiranta TS, et al. FHL-1/reconectin and factor H: two human complement regulators which are encoded by the same gene are differently expressed and regulated. *Mol Immunol* 1999;36:809–818.

102- Luo W, Vik DP. Regulation of complement factor H in a human liver cell line by interferon-gamma. *Scand J Immunol* 1999;49:487–494

103- Yang S, Zhou M, Fowler DE, et al. Mechanisms of the beneficial effect of adrenomedullin and adrenomedullin-binding protein-1 in sepsis: down-regulation of proinflammatory cytokines. *Crit Care Med* 2002;30:2729–2735

104- Yang S, Zhou M, Chaudry IH, et al. Novel approach to prevent the transition from the hyperdynamic phase to the hypodynamic phase of sepsis: role of adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1. *Ann Surg* 2002;236:625–633

105- Dwivedi AJ, Wu R, Nguyen E, Higuchi S, Wang H, Krishnasastri K, Marini CP, Ravikumar TS, Wang P. Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1 prevent acute lung injury after gut ischemia-reperfusion. *J Am Coll Surg.* 2007 Aug;205(2):284-93 (

106- McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985;312:159–163.

- 107-**Adkins D, Hollwarth ME, Benoit JN, Parks DA, McCord JM, Granger DN. Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986; 548:101–107.
- 108-** Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 1990;4:3355-9.
- 109-** Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, et al. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant for liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol.* 1994;145:1421–3.
- 110-** Marzi I, Takei Y, Ruicker M, et al. Endothelin-1 is involved in hepatic sinusoidal vasoconstriction after ischemia and reperfusion. *Transplant Int.* 1994;7:S503– 6.
- 111-** Yadav SS, Howell DN, Gao W, et al. L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic Mouse liver. *Am J Physiol.* 1998;75:G1341–52.
- 112-** Cywes R, Packham MA, Tietze L, et al. Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat. *Hepatology* 1993;18:635– 47.
- 113-** Delva E, Camus Y, Nordlinger B, et al. Vascular occlusion for liver resections operative management and tolerance to ischemia: 142 cases. *Ann Surg* 1989;209:211-8.
- 114-** Henderson JM. Liver transplantation and rejection: an overview. *Hepato-Gastroenterol,* 1999; 46:1482-4.
- 115-** Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg* 2003;20:383– 396
- 116-** Kanoria S, Jalan R, Davies NA, Seifalian AM ve ark. Remote ischaemic preconditioning of the hind limb reduces experimental liver warm ischaemia–reperfusion injury. *Br J Surg* 2006;93:762–768
- 117-** Koti RS, Yang W, Dashwood MR, Davidson BR ve ark. Effect of ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Liver Transpl* 2002;8:1182–1191
- 118-** Funaki H, Shimizu K, Harada S, Tsuyama H ve ark. Essential role for nuclear factor kB in ischemic preconditioning for ischemia- reperfusion injury of the mouse liver. *Transplantation* 2002;74:551–556
- 119-** Tsuyama H, Shimizu K, Yoshimoto K, Nezuka H ve ark. Protective effect of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Transplant Proc* 2000;32:2310–2313
- 120-** Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 1999;30:1223-1231
- 121-** Hardy KJ, McClure DN, Subwongcharoen S. Ischaemic preconditioning of the liver: a preliminary study. *Aust N Z J Surg.* 1996;66:707-10.
- 122-** Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM (2004) Postconditioning: A form of “modified reperfusion” protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res* 95:230–232
- 123-** Behrends M, Hirose R, Serkova NJ, Coatney JL, Bedolli M, Yardi J, Park YH, Niemann CU. Mild hypothermia reduces the inflammatory response and hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Liver Int.* 2006;26:734-41.
- 124-** Wang CY, Ni Y, Liu Y, Huang ZH, Zhang MJ, Zhan YQ, Gao HB. Mild hypothermia protects liver against ischemia and reperfusion injury. *World J Gastroenterol.* 2005;11:3005-7.
- 125-** Yamamoto H, Tang H. Melatonin attenuates L-cysteine induced seizures and lipid peroxidation in the brain of mice. *J. Pineal Res.,* 1996;21:108-113.
- 126-** Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek B, et al. A review of the evidence supporting melatonin’s role as an antioxidant. *J. Pineal. Res.,* 1995;18:1-11.

- 127-** Pierrefiche G, Laborit H. Oxygen free radicals, melatonin and aging. *Experimental Gerontology*, 1995; 30: 213-227.
- 128-** Chattopadhyay P, Verma N, Verma A, Kamboj T, Khan NA, Wahi AK. L-arginine protects from pringle manoeuvre of ischemia-reperfusion induced liver injury. *Biol Pharm Bull*. 2008;31:890-2.
- 129-** Li SQ, Liang LJ. Protective mechanism of L-arginine against liver ischemic-reperfusion injury in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2003;2:549-52.
- 130-** Stvolinsky SL, Kukley ML, Dobrota D, Vachova MM, Tkac I, Boldyrev A. Carnosine: an endogenous neuroprotector in the ischemic brain. *Cellular and Molecular Neurobiology* 1999;19:45-56
- 131-** Fujii T, Takaoka M, Muraoka T, Kurata H, Tsuruoka N, Ono H, Kiso Y, Tanaka T, Matsumura Y. Preventive effect of L-carnosine on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *European Journal of Pharmacology* 2003; 474:261-267
- 132-** Lee JW, Miyawaki H, Bobst EV, Hester JD et al. Improved functional Recovery of Ischemic Rat Hearts due to singlet Oxygen Scavengers Histidine and Carnosine. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:113-121
- 133-** Kang KS, Yun JW, Lee YS Protective effect of L-carnosine against 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate –or hydrogen peroxide-induced apoptosis on v-myc transformed rat liver epithelial cells. *Cancer Letters* 2002;178: 53-62
- 134-** Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T: Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993;192:553–560.
- 135-** Saita M, Shimokawa A, Kunitake T, Kato K, Hanamori T, Kitamura K, Eto T, Kannan H. Central actions of adrenomedullin on cardiovascular parameters and sympathetic outflow in conscious rats. *Am J Physiol* 1998;274:979–984.
- 136-** Beltowski J. Adrenomedullin. *Postepy Hig Med Dosw* 1998;53: 99–123.
- 137-** Cao YN, Kitamura K, Ito K, Kato J, Hashida S, Morishita K, Eto T. Glycine-extended adrenomedullin exerts vasodilator effect through amidation in the rat aorta. *Regul Pept*. 2003; 113:109–114.
- 138-** Cases A, Esforzado N, Lario S, Vera M, Lopez-Pedret J, Rivera-Fillat F, Jimenez W: Increased plasma adrenomedullin levels in hemodialysis patients with sustained hypotension. *Kidney Int*. 2000;57:664–670.
- 139-** Hayakawa H, Hirata Y, Kakoki M, Suzuki Y, Nishimatsu H, Nagata D, Suzuki E. Role of nitric oxide-cGMP pathway in adrenomedullin-induced vasodilation in the rat. *Hypertension* 1999;33:689–693.
- 140-** Yang BC, Lipton H, Gumusel B, Hyman A, Mehta JL. Adrenomedullin dilates rat pulmonary artery rings during hypoxia: role of nitric oxide and vasodilator prostaglandins. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996;28:458–462.
- 141-** Jougasaki M, Wei CM, Aarhus LL, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC Jr. Renal localization and actions of adrenomedullin: a natriuretic peptide. *Am J Physiol* 1995;268: 657–663.
- 142-** Parameswaran N, Nowak W, Hall CS, Sparks HV, Spielman WS. Cellular and molecular actions of adrenomedullin in glomerular mesangial cells. *Peptides*. 2001;22:1919–1924.
- 143-** Kohno M, Yasunari K, Minami M, Kano H, Maeda K, Mandal AK, Inoki K. Regulation of rat mesangial cell migration by platelet-derived growth factor, angiotensin II, and adrenomedullin. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10:2495–2502.
- 144-** Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev*. 2000;21:138–167.
- 145-** Jensen BL, Kramer BK, Kurtz A. Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in Mouse juxtaglomerular granular cells. *Hypertension*. 1997;29:1148–1155.
- 146-** Israel A, Diaz E. Diuretic and natriuretic action of adrenomedullin administered intracerebroventricularly in conscious rats. *Regul Pept*. 2000;89:13–18.

- 147-** Isumi Y, Kubo A, Katafuchi T, Kangawa K, Minamino N. Adrenomedullin suppresses interleukin-1 β -induced tumor necrosis factor- α production in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett.* 1999;463:110–114.
- 148-** Wu R, Zhou M, Wang P. Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1 downregulate TNF- α in macrophage cell line and rat Kupffer cells. *Regul Pept* 2003;112:19–26.
- 149-** Hippenstiel S, Witzenrath M, Schmeck B, Hocke A, Krisp M, Krull M, Seybold J. Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circ Res* 2002;91:618–625.
- 150-** Zhang F, Wu R, Zhou M, Blau SA, Wang P. Human adrenomedullin combined with human adrenomedullin binding protein-1 is protective in gut ischemia and reperfusion injury in the rat. *Regul Pept.* 2009;152:82-7.
- 151-** Carrizo GJ, Wu R, Cui X, Dwivedi AJ, Simms HH, Wang P. Adrenomedullin and adrenomedullin-binding protein-1 downregulate inflammatory cytokines and attenuate tissue injury after gut ischemia-reperfusion. *Surgery.* 2007;141:245-53.
- 152-** Kerem M, Bedirli A, Pasaoglu H, Ofluoglu E, Yilmazer D, Salman B, Yilmaz TU. Effect of adrenomedullin on hepatic damage in hepatic ischaemia/reperfusion injury in rats. *Liver Int.* 2008;28:972-81
- 153-** Yang J, Wu R, Qiang X, Zhou M, Dong W, Ji Y, Marini CP, Ravikumar TS, Wang P. Human adrenomedullin and its binding protein attenuate organ injury and reduce mortality after hepatic ischemia-reperfusion. *Ann Surg.* 2009;249:310-7.
- 154-** Jougasaki M, Burnett Jr JC. Adrenomedullin as a regulator peptide. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 293-95.
- 155-** McGregor D, Troughton RW, Frampton C. Hypotensive and natriuretic actions of adrenomedullin in subjects with chronic renal impairment. *Hypertension* 2001;37:1279-84.
- 156-** Wu R, Cui X, Dong W, Zhou M, Simms HH, Wang P. Mechanisms responsible for vascular hyporesponsiveness to adrenomedullin after hemorrhage: the central role of adrenomedullin binding protein-1. *Ann Surg.* 2005;242:115-23.
- 157-** Cui X, Wu R, Zhou M, Dong W, Ulloa L, Yang H, Wang H, Tracey KJ, Simms HH, Wang P. Adrenomedullin and its binding protein attenuate the proinflammatory response after hemorrhage. *Crit Care Med.* 2005;33:391-8.
- 158-** Yang S, Zhou M, Fowler DE, Wang P. Mechanisms of the beneficial effect of adrenomedullin and adrenomedullin-binding protein-1 in sepsis: down-regulation of proinflammatory cytokines. *Crit Care Med.* 2002;30:2729-35.
- 159-** Higuchi S, Wu R, Zhou M, Marini CP, Ravikumar TS, Wang P. Gut hyperpermeability after ischemia and reperfusion: attenuation with adrenomedullin and its binding protein treatment. *Int J Clin Exp Pathol.* 2008;1:409-18.
- 160-** Codoñer-Franch P, Muñoz P, Gasco E, Domingo JV, Valls-Belles V. Effect of a Diet Supplemented with alpha-Tocopherol and beta-Carotene on ATP and Antioxidant Levels after Hepatic Ischemia-Reperfusion. *J Clin Biochem Nutr.* 2008;43:13-8.
- 161-** Jiang W, Yang JH, Wang SH, Pan CS, Qi YF, Zhao J, Tang CS. Effects of adrenomedullin on aldosterone-induced cell proliferation in rat cardiac fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Nov 5;1690(3):265-75.
- 162-** Jiang W, Yang JH, Pan CS, Qi YF, Pang YZ, Tang CS. Effects of adrenomedullin on cell proliferation in rat adventitia induced by aldosterone. *J Hypertens.* 2004;22:1953-61.