

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

ROSKOVİTİN
VE
İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ-1'İN SIÇAN
KARACİĞERİNDE OLUŞTURULAN
İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARININ SUBAKUT DÖNEMİ
ÜZERİNE ETKİLERİ

Dr. Serdar TOPALOĞLU

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Osman Abbasoğlu

Ankara - 2001

ÖZET

Hepatositlerin apoptozis yolu ile ölümü, karaciğer iskemi-reperfüzyon (I-R) hasarında hem akut hem de subakut dönemde gösterilmiştir. Bununla birlikte, apoptozisin I-R hasarında oynadığı rol henüz tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu çalışma apoptozisin I-R hasarının subakut dönemindeki rolünü ve roskovitin ile insülin benzeri büyüme faktörü-1'in (IGF-1) bu hasar üzerindeki etkilerini araştırmak amacı ile yapıldı. IGF-1 (n=8) ve roskovitin (n=8) verilen sıçanların karaciğerlerinin sağ lobları 60 dakika süre ile iskemiye uğratıldıktan sonra, 24 saat süre ile reperfüzyona bırakıldı. Doku hasarının değerlendirilmesinde serum alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), doku myeloperoksidaz (MPO) düzeyleri ölçümü ve histolojik inceleme kullanıldı. Ölü hepatositler tripan mavisi boyaması ile belirlendi. Apoptotik hepatositler ise hazırlanan kesitlerin M30 monoklonal antikoru ile boyanması esasına dayalı immünohistokimyasal yöntem kullanılarak belirlendi. Apoptotik ve ölü hepatositlerin periportal ve perisentral alanlarda yoğunlaştıkları izlendi. Roskovitin uygulanan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında apoptotik ($P<0,005$) ve ölü hepatosit sayılarında ($P=0,055$) azalma olduğu izlendi. Roskovitin grubunda ALT (ortalama değeri; 78,8 U/L), AST (ortalama değeri; 445 U/L) ve MPO (ortalama değeri; 1,73 IU/gr yaş doku) değerlerinin kontrol grubuna göre (ortalama değerler; ALT için 335,7 U/L, AST için 908,2 U/L ve MPO için 3 IU/gr yaş doku) belirgin şekilde azaldığı saptandı ($P<0,05$). IGF-1 uygulanan grupta ise ALT ve AST düzeylerinde kontrol grubuna göre değişiklik saptanmazken, MPO düzeylerinde belirgin olarak artış gözlemlendi ($P<0,005$). Bu çalışma ile I-R'ye bağlı karaciğer hasarının oluşumunda hepatosit apoptozisinde rol aldığı ve roskovitin uygulaması ile bu hasarın önlenebileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: apoptozis, iskemi-reperfüzyon, karaciğer, roskovitin, insülin benzeri büyüme faktörü -1.

ABSTRACT

Apoptotic hepatocyte death has been observed during the acute and subacute phases of reperfusion period after liver ischemia. However, effects of this process on ischemia-reperfusion (IR) injury are still unclear. This study was designed to investigate the role of apoptosis on subacute phase of the liver IR injury and to determine the effect of roscovitine and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on this process. Rat livers pretreated with IGF-1 (n=8) and roscovitine (n=8) received 60 min. right lobe ischemia followed by 24 h reperfusion. Tissue injury was evaluated with serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), tissue myeloperoxidase (MPO) measurements and histological examination. Dead hepatocytes were determined with trypan blue dye test. Apoptotic hepatocytes were evaluated immunohistochemically in sections stained with M30 monoclonal antibody. Apoptotic and dead hepatocytes were detected mainly in periportal and pericentral areas. Roscovitine treatment decreased both apoptotic ($P < 0,005$) and dead hepatocyte counts compared to controls ($P = 0,055$). ALT (mean level; 78,8 U/L for roscovitine group), AST (mean level; 445 U/L for roscovitine group) and MPO (mean level; 1,73 IU/gr wet tissue) levels were significantly decreased compared to control (mean levels; 335,7 U/L for ALT , 908,2 U/L for AST and 3 IU/gr wet tissue for MPO) ($p < 0,05$). IGF-1 treatment did not cause differences on ALT and AST levels compared to control group. Although, MPO levels were significantly increased compared to control group ($P < 0,005$). This study indicates that hepatocyte apoptosis may play a role in the development of IR injury of the liver. Administration of roscovitine may be beneficial in preventing this injury.

Key words: apoptosis, ischemia-reperfusion, liver, roscovitine, insulin-like growth factor-1.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	ix
TABLolar	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Karaciğer dokusunda iskemiye bağlı oluşan değişiklikler	3
2.2 Karaciğer dokusunda sıcak reperfüzyon hasarı	5
2.2.1 Reperfüzyon hasarında serbest oksijen radikalleri	7
2.2.1.1 Serbest oksijen radikalleri ve hepatositler	7
2.2.1.2 Serbest oksijen radikalleri ve Kupffer hücreleri	9
2.2.1.3 Serbest oksijen radikalleri ve endotel hücreleri	9
2.2.1.4 Serbest oksijen radikalleri ve nötrofiller	9
2.2.2 Karaciğerdeki reperfüzyon hasarında "pH paradoksu"	10
2.2.3 Nitrik oksit ve reperfüzyon hasarındaki rolü	10
2.3 Apoptozis	11
2.3.1 Apoptozisde görülen morfolojik değişiklikler	12
2.3.2 Apoptozisin biyokimyası	13
2.3.3 Apoptozis ile iskemi-reperfüzyon hasarı arasındaki ilişki	15
2.4 Siklin bağımlı kinazlar ve hücre siklusuna etkileri	16
2.4.1 Siklin bağımlı kinaz inhibisyonu ve apoptozis	16
2.4.2 Roskovitin ve immünsupresan özelliği	17
2.5 İnsülin benzeri büyüme faktörü-1	17
2.5.1 IGF-1 ve dokulardaki antiapoptotik etkinliği	18

	Sayfa
3. GEREÇ ve YÖNTEM	19
3.1 Deney grupları ve ilaç uygulama düzeni	19
3.2 Cerrahi işlemler	21
3.3 Histolojik işlemler	21
3.4 İmmünohistokimyasal yöntem	22
3.5 Karaciğer hasarının enzimatik olarak değerlendirilmesi	23
3.6 Nötrofil infiltrasyonunun değerlendirilmesinde MPO	23
3.7 İstatistik değerlendirme	24
4. BULGULAR	25
4.1 Histopatolojik ve immünohistokimyasal inceleme bulguları	25
4.2 Karaciğer transaminazları düzeylerinin değerlendirilmesi	34
4.3 Doku myeloperoksidaz düzeylerinin değerlendirilmesi	35
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇLAR	40
7. KAYNAKLAR	41

SİMGELER VE KISALTMALAR

İ-R	İskemi-Reperfüzyon
TNF	Tümör Nekroz Faktör
IL	İnterlökin
PAF	Platelet Aktive Edici Faktör
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
ICAM	İntrasellüler Adhezyon Molekülü
ATP	Adenozin Trifosfat
NO	Nitrik Oksid
NOS	Nitrik Oksid Sentaz
eNOS	Endotelial Nitrik Oksid Sentaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
cdc	Siklin Bağımlı Kinaz
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
DMSO	Dimetil Sülfoksid
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
ALT	Alanin Aminotransferaz
AST	Aspartat Aminotransferaz
MPO	Myeloperoksidaz
CK	Sitokeratin
mAB	Monoklonal Antikor
HETAB	Hegzadekiltrimetilamonyum Bromid
EDTA	Etilen Dinitrilo Tetra Asetikasit
TMB	Tetrametil Benzidin
DMF	Dimetil Formamin
ISEL	İn Situ Nick-End Labeling
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Trasferase-Mediated dUTP Nick-End Labeling
BBA	Büyük Büyütme Alan

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1	Hücre ölümünün iki farklı şekli: apoptozis ve nekroz.	4
2.2.1	Karaciğerdeki iskemi ve reperfüzyon sonrasında CD ₄ ⁺ T-lenfositlerinin nötrofilik inflamatuvar yanıtı oluşturmasında potansiyel mekanizmalar.	6
2.2.2	Karaciğerdeki İ-R hasarında SOR'nin kaynakları.	8
2.2.3	pH paradoksu ve hücre ölümü arasındaki hipotetik ilişki.	11
2.3	Apoptozisin biyokimyası.	14
3.1	Deney grupları ve protokol.	20
4.1.1	Histolojik kesitlerde ölü hepatositlerin dağılımında gruplar arasındaki farklılıklar.	26
4.1.2	Histolojik kesitlerde apoptotik hepatositlerin dağılımında gruplar arasındaki farklılıklar	28
4.1.3	Ölü hepatositlerin, gruplar ve zonlara göre dağılımı.	30
4.1.4	Apoptotik hepatositlerin, gruplar ve zonlara göre dağılımı.	31
4.2	ALT ve AST düzeylerinin gruplara göre dağılımı.	34
4.3	Doku MPO değerinin gruplara göre dağılımı.	35

TABLULAR

Tablo	Sayfa
4.1.1 Ölü hepatositlerin gruplara ve karaciğer alanlarına göre dağılımı.	32
4.1.2 Apoptotik hepatositlerin gruplara ve karaciğer alanlarına göre dağılımı.	33

1.GİRİŞ

Karaciğere yönelik cerrahi girişimlerde, kalp yetmezliğinde, hemorajik şok tablosunda ve karaciğer transplantasyonunda karaciğer zedelenmesinin ana nedenlerinden olan sıcak iskemi-reperfüzyon (I-R) hasarı son yıllarda üzerinde en çok çalışılan konulardan biri olma özelliğini korumaktadır. Karaciğer transplantasyonunda sıcak I-R hasarı yanında soğuk I-R hasarı da görülmekte ve karaciğerdeki değişiklikler daha kompleks bir hal almaktadır.

Karaciğerdeki kan akımının azalmasına bağlı olarak meydana gelen yapısal hasarlanma, dokunun yeniden kanlanması ile şiddetlenmektedir. Hasarın derecesini ve şiddetini belirleyen faktörlerin başında kan akımının azaldığı veya kesildiği süre ile hangi vasküler yapının akımının (hepatik arter, portal ven ve hepatik venler) etkilendiği gelmektedir. Karaciğerde meydana gelen I-R hasarı iki evrede incelenebilir. Akut evre reperfüzyon sonrası ilk 4-6 saatlik dönemi, subakut evre ise daha sonraki 12-48 saat arasındaki dönemi kapsamaktadır(1). Reperfüzyon hasarına neden olan faktörlerden en önemlisi reaktif oksijen ürünleridir(2). Reaktif oksijen ürünlerinin I-R hasarının subakut evresindeki en önemli kaynağını polimorf nüveli lökositler oluşturmaktadır (2,3,4,5,6,7).

Günümüzde I-R hasarında rol oynayan pek çok farklı mekanizma tanımlanmıştır. Bu mekanizmalardan birisi de apoptozistir. Programlı hücre ölümü olarak tanımlanan süreç, böbrekte (8), kalpte (9), beyinde (10), pankreasta (11) ve karaciğerde (12,13) oluşturulan I-R modellerinde gösterilmiştir. Bu deneysel çalışmalarda, karaciğerde oluşan I-R hasarının subakut evresindeki değişiklikler histolojik, biyokimyasal ve enzimatik yöntemlerle incelenmiştir. Çalışılan parametreler karaciğer dokusunda ölü ve apoptotik hücre sayıları ile miyeloperoksidaz enzim düzeyi ve transaminaz düzeyleri olmuştur. Gerçekleştirilen I-R hasarının subakut evresindeki

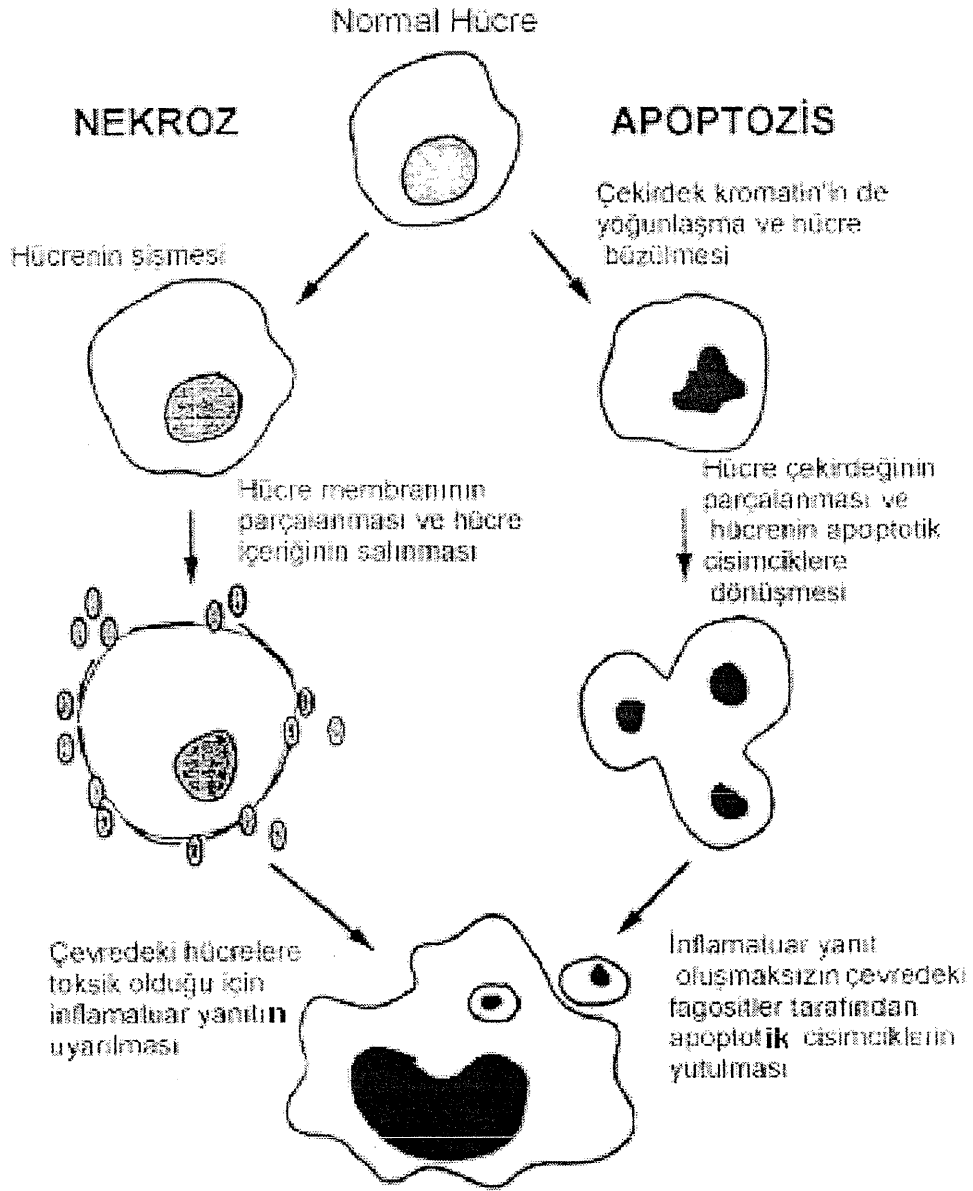
değişiklikleri önlemek amacıyla lenfoid hücre apoptozisini uyararak immunosupresan etki oluşturduğu bilinen Roskovitin (roscovitine) ve bazı dokularda apoptotik değişiklikleri önlediği gösterilen İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1(IGF-1) ~~verilmiştir.~~ *kuşaklıdır.*

2. GENEL BİLGİLER

2.1 KARACİĞER DOKUSUNDA İSKEMİYE BAĞLI OLUŞAN DEĞİŞİKLİKLER

Karaciğer dokusu temel olarak hepatositlerin oluşturduğu parankimal hücreler ve Kupffer hücreleri ile endotelin oluşturduğu nonparankimal hücrelerden oluşur. Hipoksik uyarın, dokularda karakteristik değışikliklerin başlamasına neden olmaktadır. Hipoksi ile oluşan kromatin yoğunlaşması ve glikojen kaybı, mitokondri ve endoplazmik retikulumda şişmeye neden olmakta ve lizozomal parçalanma sonrasında intraselüler membranların bütünlüğü kaybolarak hücreölüm (nekroz) gerçekleşmektedir (3).

Karaciğerde iskemik uyarın sonrasında erken dönemde hepatositlerin yüzeyinde sinüzoidal aralığa doğru uzanım gösteren membranöz kabarcıklar (bleb) oluşmaktadır (14,15). Kabarcık oluşumundan sitozolik serbest Ca^{+2} artışı ve plazma membranında meydana gelen fosfolipid hidrolizi sorumlu tutulmaktadır (16,17,18). Bu kabarcıklar değışik miktarlarda endoplazmik retikulum ve glikojen içermektedirler (3). İskemi süresi arttıkça kabarcık çapları büyümektedir. Sıçan karaciğerinin 45 dakika süre ile iskemiye uğratılması sonrasında hepatositler kabarcıklarla kaplanmakta ve neredeyse normal yüzey yapısı ortadan kalkmaktadır. İskemi süresinin ilerlemesi ile birlikte kabarcıklarda birleşme ve sonrasında da rüptür meydana gelmektedir (3). Plazma membran bariyerinin bozulmasını takiben sitozolik enzimler ve elektriksel ve kimyasal farklılığı sağlayan içerik membranın dışına çıkmaktadır. Bu permeabilite bozulması geri-dönüşsüz hücre ölümünün belirtisidir (3) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Hücre ölümünün iki farklı şekli: apoptozis ve nekroz.

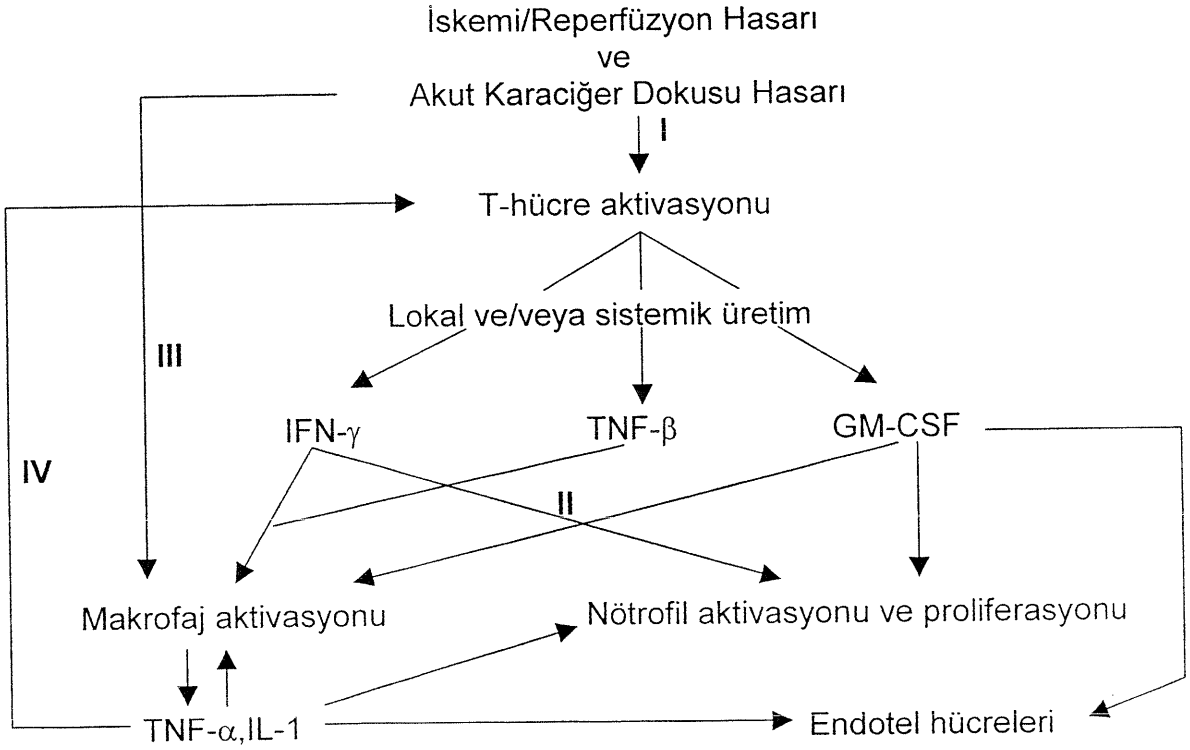
Hücre bütünlüğünün bozulması ile birlikte hücre tarafından tutulabilen floresein ve kalsein gibi sitozolik belirleyiciler (probe) saniyeler içinde kaybolmaktadır. Tripan mavisi (Trypan blue) ve propidyum iyot gibi hücre zarından geçemeyen belirleyiciler ise hücre içine girmeye başlamakta ve hücre

çekirdeğini işaretlemektedirler (3). Kabarcığın rüptürü sonucu laktat dehidrogenaz gibi çözünebilir sitozolik enzimler de hücre dışına çıkmaktadır. Çekirdekte yoğunlaşma hücre ölümünden hemen sonra oluşurken şişme dakikalar sonra gerçekleşmektedir (19). Hipoksiye bağlı oluşan hasar ileri boyutta ise reperfüzyon sonrasında geriye dönüşüm mümkün olmamaktadır. Kabarcık rüptürü olmamış ise reoksijenasyon ile kabarcıklar rezorbe olmakta ve hasarlanma geriye dönmektedir (15).

2.2 KARACİĞER DOKUSUNDA SICAK REPERFÜZYON HASARI

Karaciğerde oluşturulan iskemi sonrasında tekrar perfüzyonun sağlanması ile dokuda bazı değişiklikler meydana gelmektedir. Eğer iskemi süresince karaciğer dokusunda oluşan hasarlanma geriye dönüşlü ise reperfüzyon süresince karaciğerde ilerleyici bir zedelenme oluşmamaktadır. Ancak iskemi ileri derecede ise, reperfüzyon dönemi içinde karaciğer hasarında artış görülmektedir. Karaciğerde oluşan I/R hasarı akut ve subakut olmak üzere iki faza ayrılır. Akut faz reperfüzyonun ilk 3-6 saatini kapsayan devredir ve serbest radikal oluşumu ile T-lenfosit ve Kupffer hücre aktivasyonunun eşlik ettiği hepatosellüler hasarlanma ile karakterizedir. Subakut fazın karakteristik özelliğini ise reperfüzyonun 18-24.saatlerinde en üst seviyesine ulaşan masif nötrofil infiltrasyonu oluşturmaktadır (1). Nötrofillerin yoğun şekilde karaciğere göçüne neden olan mekanizmalardan başlıcaları şunlardır;

- (a) Endotel hücrelerinden ve hepatositlerden salınan uyarılar (20),
- (b) Antijenden bağımsız CD_4^+ T-hücresi kontrolünde makrofaj ve nötrofil aktivasyonu (21),
- (c) Tümör nekrozis faktör (TNF)- α , interlökin (IL)-1 ve platelet aktive edici faktör (PAF) gibi proinflamatuvar sitokinlerin Kupffer hücrelerinden ve/veya hepatositlerden salınımı (22,23),
- (d) İntrasellüler adezyon molekülü (ICAM) gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunun artması (Şekil 2.2.1)(24,25).



Şekil 2.2.1: Karaciğerdeki iskemi ve reperfüzyon sonrasında CD_4^+ T-lenfositlerinin nötrofilik inflamatuvar yanıtı oluşturmasında potansiyel mekanizmalar. Bu modelde, I/R başlangıçta dolaşımdaki CD_4^+ T hücrelerini aktive olmaları yönünde uyarır (I. **Mekanizma**) ve reperfüzyonun 1. saatinde karaciğerde bu lenfositlerin birikimi izlenir. Aktive haldeki CD_4^+ T hücreleri, içlerinde interferon- γ , TNF- β ve granülosit-makrofaj koloni-stimülan faktörün (GM-CSF) de bulunduğu bir grup sitokini direkt veya indirekt (Kupffer hücrelerinin salgıladığı sitokinler) yolla salgılayarak nötrofillerin aktive olmasını ve hasarlanmış karaciğeri infiltre etmelerini sağlar (II. **Mekanizma**). Nötrofillerin göçünde endotel hücrelerinde yer alan ICAM-1 gibi adezyon moleküllerinin artmış ekspresyonunun da rolü vardır. Alternatif olarak, I-R uyarını öncelikle Kupffer hücrelerini uyarır (III. **Mekanizma**) ve bu hücrelerden salınan sitokinler dolaşımdaki CD_4^+ T hücrelerini aktif hale getirir (IV. **Mekanizma**).

Hasarlanmanın subakut fazında Kupffer hücrelerinden ve karaciğere infiltre olan nötrofillerden salınan süperoksit radikalleri, oksidatif stresi artırır ve sinüzoidal konjesyon, hepatositlerde sitoplazmik vakuolizasyon ve yaygın nekroz ile karakterize geriye dönüşsüz karaciğer hasarını meydana getirir (26).

2.2.1. REPERFÜZYON HASARINDA SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

İskemik hasara uğramış doku, reperfüzyon ile birlikte hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hipoklorür radikali (HOCl) ve hidroksil radikali ($\cdot OH$) gibi toksik oksijen radikallerini oluşturur (2). Serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşumunda temel yol mitokondride yer alan elektron transport sisteminde (mitokondrial solunum zinciri) oluşan çiftleşme hatasıdır (25). Karaciğerde yer alan ve toplam hücrel oksijen sarfının % 10-30'unu oluşturan peroksizomlar (sitokrom P450 hidroksilasyon sistemi) SOR oluşumunda önemli rol almaktadır (25).

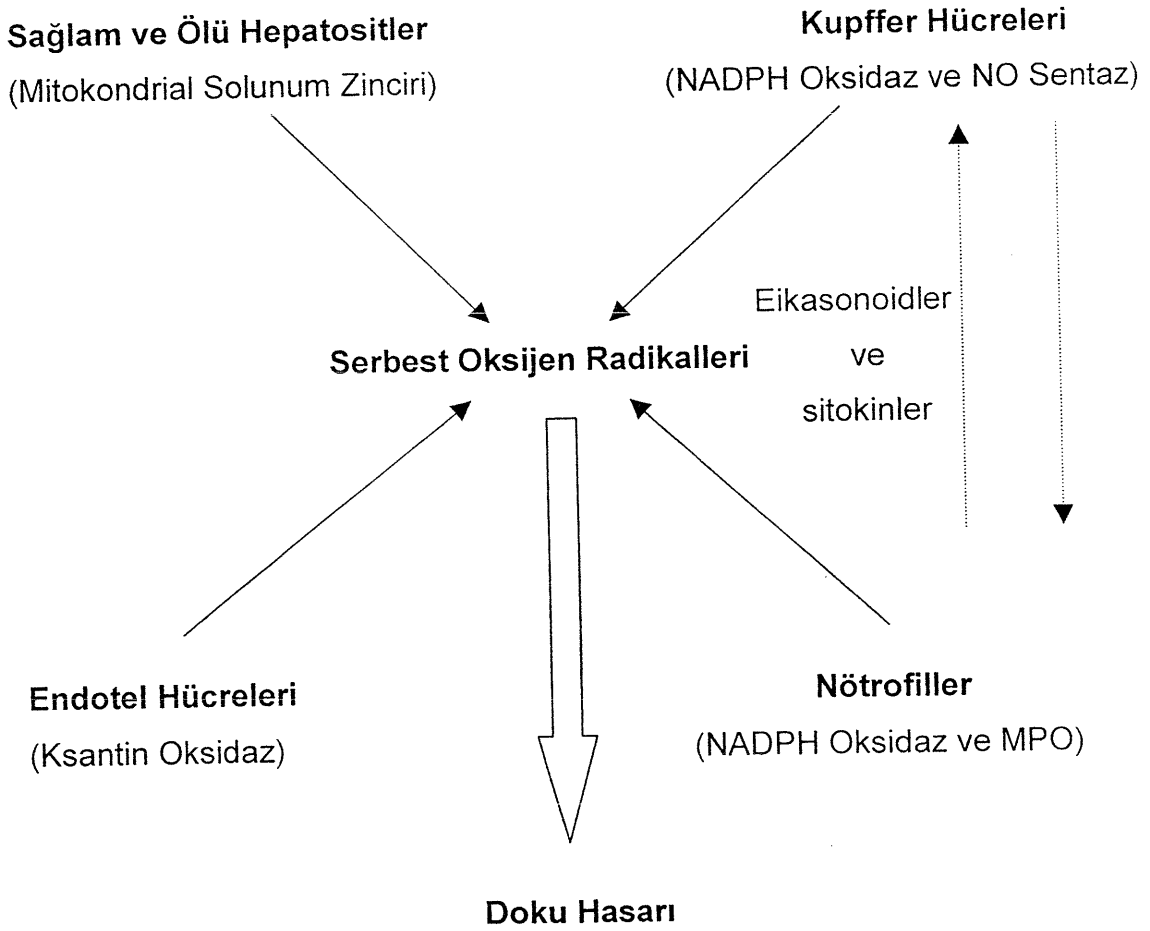
SOR oluşumunda ksantin oksidaz enzimi de önemli bir rol almaktadır. İskemi süresince ksantin dehidrogenaz enzimi kalsiyuma bağımlı proteoliz ile ksantin oksidaza dönüşmektedir. Diğer yandan ATP yıkımı ile ksantin oksidazın substratı konumunda olan hipoksantin meydana gelir (27). Reperfüzyon ile sağlanan oksijenizasyon sonucunda ksantin oksidaz, hidrojen peroksit ve süperoksit radikalinin oluşumuna neden olur. Süperoksit radikali lipidlere, proteinlere ve nükleik asitlere affinite göstermektedir. Süper oksit radikalinin hidrojen peroksit ile girdiği Fenton reaksiyonu (demir ve bakır ile katalize edilir) sonucu daha etkili bir serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşur (3).

Reperfüzyon ile birlikte serbest oksijen radikalleri hepatositlerden, kupfer hücrelerinden, endotel hücrelerinden ve nötrofillerden salınmaktadır (25) (Şekil 2.2.2). Glutatyonun artmış oksidasyonuna bağlı glutatyon disülfid, artmış lipid peroksidasyonuna bağlı malonildealdehit ve hidroksialkenaller serbest oksijen radikallerinin düzeyinin arttığını gösteren belirleyicilerdir (28,29,30,31).

2.2.1.1 SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE HEPATOSİTLER

Hepatositlerde reaktif oksijen radikallerinin temel kaynağını mitokondrial solunum zinciri oluşturduğu düşünülmektedir (30,31). Ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümüne bağlı reaktif oksijen radikal oluşum yolu,

hepatositlerin % 80'den fazlasının canlılığını kaybetmesinden sonra aktive olmaktadır (32). İzole hepatositlerde reoksijenasyon ile aniden başlayan SOR salınımı saatlerce hücre bütünlüğü kaybolmasına karşın devam etmektedir. Reaktif oksijen radikallerinin hepatositlerden salınımı için belirli bir iskemik dönem geçmesi gerekmektedir. Bu süre hepatosit kültürlerinde 4 saat kadar olmakla birlikte in-vivo ortamda daha kısa olmaktadır (31).



Şekil: 2.2.2 Karaciğerdeki I-R hasarında SOR'nin kaynakları. Reperfüzyon hasarı direk sitotoksik etkiler ile oluşabileceği gibi (düz oklar), nötrofillerin ve Kupffer hücrelerinin aktivasyonu ile de gelişmektedir.

2.2.1.2 SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE KUPFFER HÜCRELERİ

Kupffer hücreleri sahip oldukları NADPH oksidaz ve NO sentaz enzimleri ile reaktif oksijen radikali sentezleme özelliğine sahiptir (33). İ-R hasarı ile sitozolik kalsiyum konsantrasyonunda yükselme olmakta ve bu enzimlerin aktivasyonu sonucunda süperoksit radikali (O_2^-) ve H_2O_2 oluşumu gerçekleşmektedir (28,34). Kupffer hücrelerinin kültür ortamında hipoksiye oldukça dayanıklı oldukları gösterilmekle birlikte 2 ila 4 saatlik hipoksik inkübasyon sonrasında reoksijenasyon evresinde hasarlandıkları gösterilmiştir (28). Hepatositlerden ve endotel hücrelerinden farklı olarak, Kupffer hücrelerindeki hasar reperfüzyonun başlamasından yaklaşık 2 saat sonrasında belirgin hale gelmektedir (35).

2.2.1.3 SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE ENDOTEL HÜCRELERİ

Endotel hücrelerinde SOR'nin oluşumunda ksantin oksidaz enzimi etkili olmaktadır. Endotel hücrelerinden salınan radikaller nötrofilleri aktive etmekte ve aktive hale gelen nötrofiller de endotel hücrelerindeki hasarı artırarak SOR salınımını uyarmaktadırlar. Ayrıca İ-R hasarına bağlı endotel hücrelerinin fibrinolitik fonksiyonlarında da değişimler görülmektedir. Bu değişimler makrovasküler endotel hücrelerinde görüldüğü gibi karaciğer sinüzoidlerini kaplayan endotel hücrelerinde de görülmektedir (36).

2.2.1.4 SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE NÖTROFİLLER

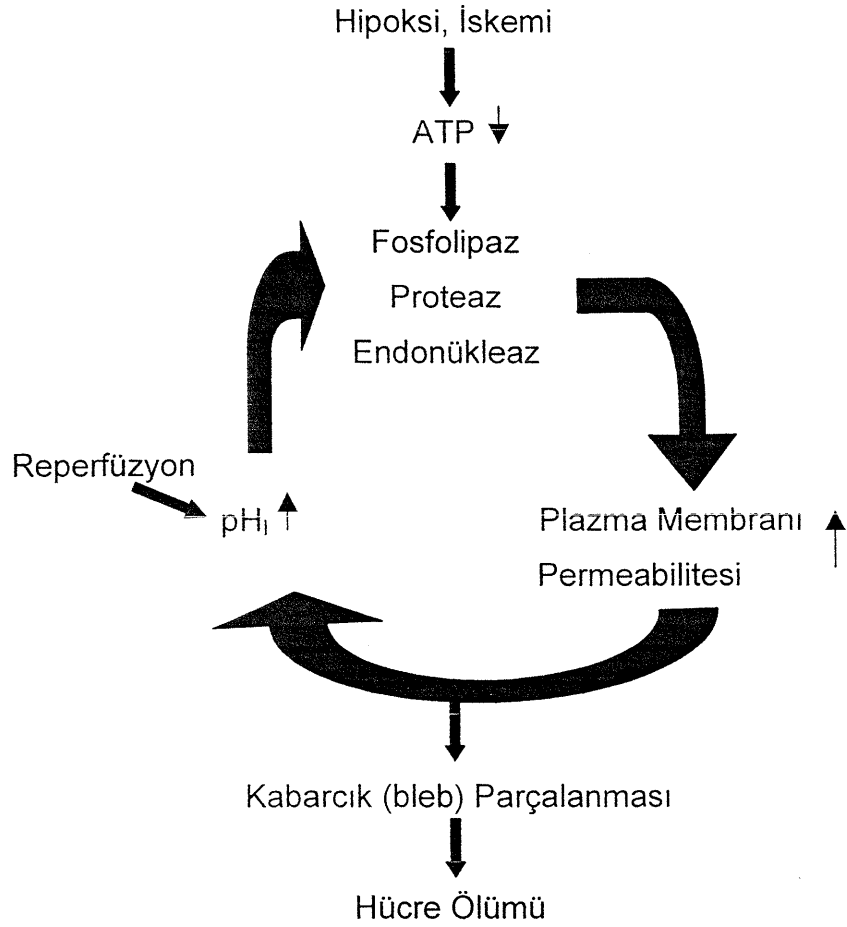
Nötrofiller Kupffer hücrelerine benzer şekilde sahip oldukları NADPH oksidaz ile O_2^- ve hidrojen peroksit oluşturabilirler. Ancak Kupffer hücrelerinden farklı olarak MPO enzimi ile hidrojen peroksit ve klor iyonu kullanarak reaktif hipokloroz asit (HOCl) oluşumuna neden olurlar (37). Nötrofil lökositler asıl etkinliklerini reperfüzyonun subakut fazında göstermektedirler.

2.2.2 KARACİĞERDEKİ REPERFÜZYON HASARINDA “pH PARADOKSU”

İskemi süresince, anaerobik glikolize ve ATP hidrolizi ile salınan inorganik fosfatlardan kaynaklanan hidrojen iyonlarının çözünmelerine bağlı pH değeri 6.5'in altına düşmektedir. Asidik pH, ATP eksikliği durumunda hücre ölümünün başlamasını engellemektedir (38,39). Bu etki özellikle intraselüler pH değerinin düşmesi ile oluşmaktadır (40). Doku pH değerinin asidik düzeyinden fizyolojik aralığa dönüşümü reperfüzyonun önemli bir sonucudur. ATP eksikliği içindeki hepatositlerde pH değerinin hızlı bir şekilde fizyolojik aralığa yükselmesi, halen tam olarak açıklanamamış mekanizmalar ile hücre ölümünü arttırmaktadır (38). Bu doku düzeyindeki farklı tepkiye “pH paradoksu” adı verilmektedir (38,39). Bu paradoks özellikle reperfüzyonun erken dönemindeki hasarda rol oynamaktadır. Antioksidan ajanlar pH değişimine bağlı bu hasarlanma şeklini engelleyememektedirler (3).

2.2.3 NİTRİK OKSİT VE REPERFÜZYON HASARINDAKİ ROLÜ

Nitrik oksit (NO) L-arginin'den nitrik oksid sentaz (NOS) yardımı ile oluşan, diğer serbest radikallerle reaksiyon kapasitesi olan ve SOR metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan bir ajandır (25). Karaciğerde hepatositler, Kupffer hücreleri ve endotel hücrelerinden sentezlenebilmektedir. Nitrik oksid sentaz'ın endotelial NOS(eNOS) ve uyarılabilir NOS(iNOS) olmak üzere karaciğerde iki temel izoformu bulunmaktadır. eNOS aktivasyonunda kalsiyum-kalmodülin etkili olmaktadır. iNOS ise başlıca karaciğerdeki makrofaj (Kupffer hücreleri) ve nötrofillerden salınmakta ve aktivasyonunda sitokinler ve lipopolisakkaritler rol oynamaktadır (41). eNOS aktivasyonu ile salınan az miktardaki NO vasküler tonusu azaltarak I-R hasarının ilerlemesini engellemekte, buna karşılık iNOS aktivasyonu ile salınan çok miktardaki NO, süperoksit radikalleri ile reaksiyona girerek daha toksik bir form olan peroksinitrit anyonunu ($\cdot\text{OONO}$) oluşturarak inflamatuvar olayın ilerlemesine neden olmaktadır (42,43).



Şekil 2.2.3: pH paradoksu ve hücre ölümü arasındaki hipotetik ilişki.

2.3 APOPTOZİS

İlk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından tanımlanan farklı morfolojideki hücre ölümüdür (44,45). Apoptosis, plazma membran bütünlüğünün kaybı ile karakterize diğer hücre ölüm şekli olan nekroz ile karşılaştırıldığında, ciddi bir yaralanma sonucu meydana gelmemekte hatta ölümü beklenen veya normal olan hücrelerde görülmektedir. Nekrozdan daha fizyolojik bir hücre ölümü olduğu için eski Yunanda ağaçtan düşen yapraklar anlamına gelen apoptosis (apo- uzak ; ptosis- düşmek) adı verilmiştir (46).

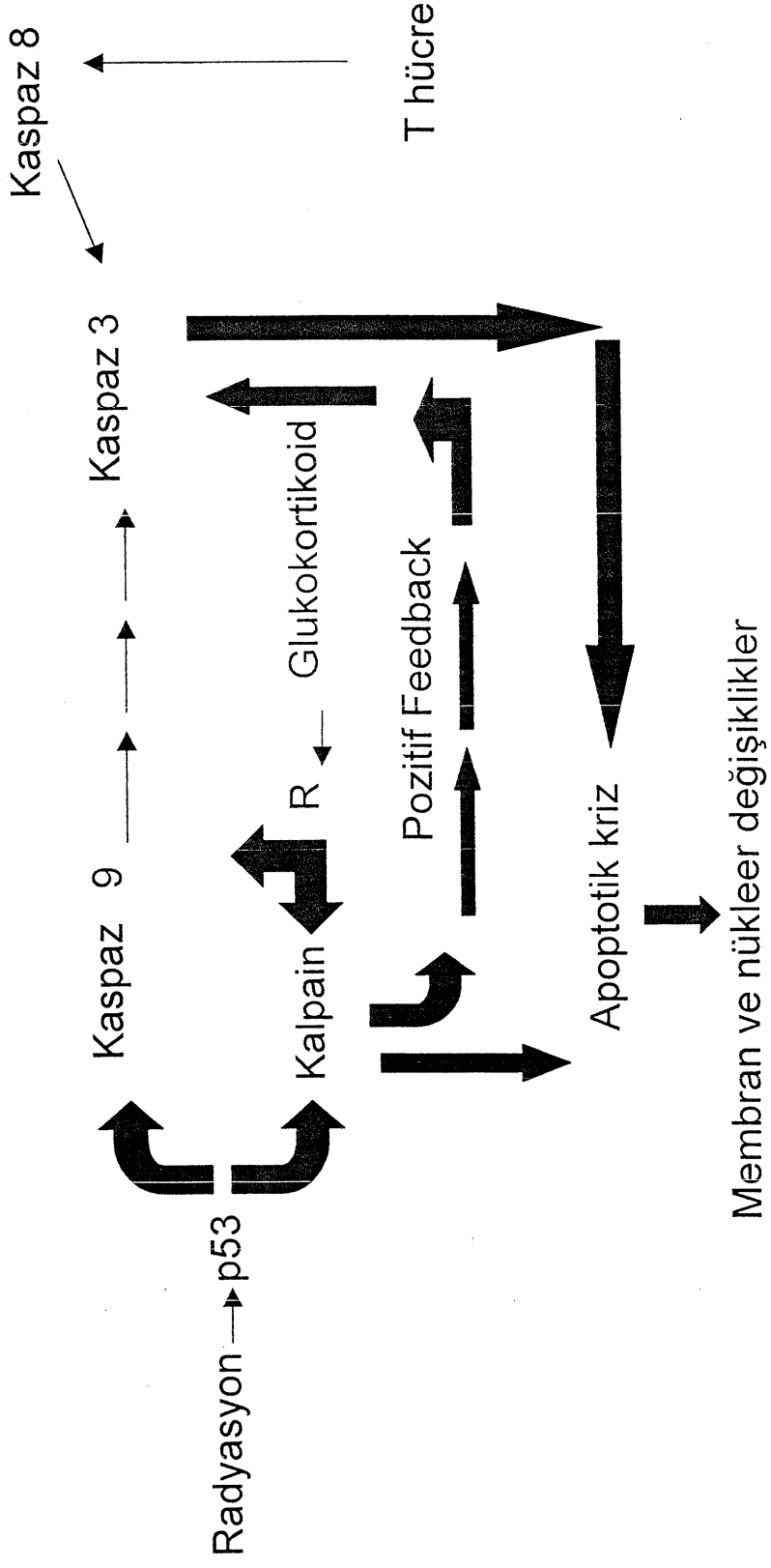
2.3.1 APOTİZİSDE GÖRÜLEN MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

Apoptozisin karakteristik morfolojik özelliği nükleusun çökmesidir. Bunu kromatin yoğunlaşması izlemektedir. Bu morfolojik bulgunun altında yatan yapısal bozukluk DNA (deoksiribonükleik asit) parçalanmasıdır. Bu parçalanmada DNA yapısı içinde yer alan bir endonükleaz'ın (DNA'z) rol oynadığı düşünülmektedir (47). Tam olarak tanımlanmamakla birlikte kaspaz sistemi ile aktif hale geçen DNA'z bu parçalanmadan sorumlu tutulmaktadır (48). Hücre, DNA'da meydana gelen sınırlı sayıdaki kırılmayı onarabilecek kapasiteye sahip iken (en fazla 300.000 kırılma / kromozom) apoptozis sırasında görülen çok sayıdaki kırılma karşısında yetersiz kalmakta ve başka değişiklikler olmasa bile hücre bir daha bölünmemektedir (46). Ancak diğer değişiklikler DNA kırılmasını takip eder (şekil 2.1). Apoptozisin erken evresinde hücre, dakikalar içinde haciminin üçtebirini kaybederek belirgin olarak büzülür. Mekanizması tam olarak anlaşılammakla birlikte plazma membranında yer alan iyon kanallarının ve pompalarının anormal fonksiyonuna bağlı olduğu sanılmaktadır (49). Bu büzülme sonucunda apoptozise uğrayan hücre, komşu hücrelerden uzaklaşmaktadır. Büzülme sırasında plazma membranında kabarcık oluşumu meydana gelmektedir. Hücre membranı sağlam kalmakla birlikte membran yapısını oluşturan fosfatidilserinin dış tabakaya atılması sonucu fosfolipid dizilimi değişmektedir. Membran yapısında meydana gelen bu değişikliğe *zeiozis* adı verilmektedir (50,51). Zeiozis ile hücre, içinde apoptotik cisimcikler içeren parçalara ayrılmaktadır. Bu cisimciklerden bazıları kromatin içermektedirler. Bu değişikliklerin hücre ölümüne neden olup olmadığı henüz net olarak anlaşılammıştır. Apoptozisin erken döneminde hücre tripan mavisi gibi vital boyaları ekstrakte edebilme özelliği gösterirken, ilerleyen süre içerisinde makrofajlar tarafından fagositozis yolu ile öldürülür.

2.3.2 APOPTOZİSİN BİYOKİMYASI

Hücre tipine ve nedene bağımsız olarak apoptozise giden hücrelerde morfolojinin aynı olması altta yatan mekanizmanın aynı olduğunu düşündürmektedir. Apoptotik değişikliklerin oluşumunda proteazlar önemli rol almaktadır. Kaspaz (Cysteine proteases that cleave at an aspartic acid residue = caspase) sistemine dahil proteazlar insanda apoptozis oluşumunda etkili olmaktadır (Şekil 2.3). Kaspaz-3 bu sistemde en önemli hız belirleyici enzimdir. Kaspaz-8 ve kaspaz-9 dışardan gelen sinyalleri kaspaz-3'e iletmekte ve bu enzim üzerinden apoptozis oluşmaktadır. Siklin bağımlı kinazlardan bazıları (Cyclin dependent kinase-cdc-4) kaspaz-9'u uyararak apoptozisin oluşumunda rol alır (46,52). Kaspazlar dışında apoptozisde rol alan diğer proteaz *kalpain*'dir. Kalpain, kalsiyuma bağımlı bir sistein proteazdır ve timositler ve nötrofiller gibi pekçok normal hücre sisteminde apoptozisin gerçekleşebilmesinde yer alır (53,54).

APOPTOZISIN BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ



Şekil 2.3 Apoptozisin biyokimyası

2.3.3 APOPTOZİS İLE İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI ARASINDAKİ İLİŞKİ

Apoptotik hücre ölümünün bulunmasından sonra araştırmacılar bu mekanizmanın rol aldığı fizyolojik ve patolojik olayları ortaya koymak için yoğun çalışmalar içine girmişlerdir. Apoptozise karşı gelişen rezistansın lenfoproliferatif hastalıkların (lenfoma, lösemi) ve otoimmün hastalıkların patogenezinde önemli yer tuttuğu düşünülmektedir. Ayrıca, immün yetmezlik tablosunda, aplastik anemide ve nörodejeneratif hastalıklarda artmış apoptotik hücre ölümünün patogenezde rol aldığı düşünülmektedir. Çeşitli dokularda oluşturulan İ-R hasarında da apoptozisin varlığına rastlanılmıştır. İskemik akut böbrek yetmezliğinde, hipoksiye bağlı nöron hücresi hasarında, myokard infarktüsü modelinde ve pankreasta oluşturulan İ-R modelinde apoptotik hücre ölümü saptanmıştır (8,9,10,11,55,56,57,58,59).

Sıçan karaciğerinde 60 dakikalık iskemik periyot sonrasında reperfüzyonun 3-6.saatleri arasında apoptotik hepatosit sayısının en üst düzeye çıktığı ve 24-48.saate gelindiğinde ise yavaş yavaş apoptotik hepatositlerin sayısının azaldığı bildirilmiştir (13). Ayrıca sıçan ve insan karaciğerinde soğuk prezervasyon hasarında apoptozis varlığı saptanmıştır (60,61). Apoptozisin TNF- α (Tümör nekroz faktör), SOR, kalsiyum artışı ve proteazların aktivasyonuna bağlı olduğu sanılmaktadır (62,63). İskemik travma sonrasında karaciğerde apoptotik hücre ölümünün nekrotik hücre ölümüne göre daha geç evrede ortaya çıktığı sanılmaktadır (13,61).

2.4 SIKLİN BAĞIMLI KİNAZLAR VE HÜCRE SIKLUSUNDAKİ ETKİLERİ

Transkripsiyon, DNA tamiri ve hücre döngüsünde çok önemli bir basamak olan protein fosforilasyonu, kinazlar tarafından düzenlenmektedir (64,65). Kinazlar işlev görebilmek için siklin (cyclin) adlı proteinlere bağlı kalmak zorundadırlar. Bu nedenle siklin bağımlı kinaz (cdk) olarak anılırlar (66,67). Hücre siklusunda G1/S fazı geçişinde cdk2-siklin E, cdk3, cdk4-siklin D1-D3, cdk6-siklin D1 ve cdk8-siklin C kompleksleri; S fazında cdk2-siklin A kompleksi; G2 fazında cdc2-siklin A kompleksi ve G2/M fazı geçişinde cdc2-siklin B, cdk7-siklin H kompleksleri regülatör olarak rol almaktadırlar. Bu kompleks, fosforilasyon ve inhibitör protein bağlanması gibi birtakım reaksiyonlarla inhibe edilebilmekte ve hücrenin çoğalması engellenebilmektedir (68,69).

2.4.1 SIKLİN BAĞIMLI KİNAZ İNHİBİSYONU VE APOPTOZİS

Cdk proteinlerinin ve düzenleyicilerinin kanserde sıklıkla normal işleyişlerinden sapmaları, cdk inhibitörleri üzerindeki çalışmaları arttırmıştır (70). Bugüne kadar çalışılan cdk inhibitörleri; *staurosporin* (71,72), *bütirolakton* (73-75), *flavopiridol* (76-78), *suramin* (79) ve *olmusin*'dir (80-82). Apoptozis oluşumu hücre döngüsünün G1 ve G2 evrelerinde oluşturulabilir. Radyasyona ve bazı kimyasal maddelere bağlı oluşan apoptozis, G1 fazında hücre döngüsünün durmasına neden olur ve p53 genine bağımlı bir yoldur (83-85). Diğer bir yol da hücre döngüsünü G2/M döneminde durdurma ilkesine dayanır. Taksol, DNA-hasarı yapan ajanlar ve X-ışını, bu p53 genine bağımlı olmayan yol üzerinden etkilerini oluştururlar (83,85). *Flavopiridol* ve *olmusin* pürin halkası içermektedirler. Her iki ajanın hücre siklusunu G2 fazında durdurarak, p53 geninden bağımsız olarak hücrelerde apoptozise neden oldukları saptanmıştır (86). *Flavopiridol*, timus, dalak, intestinal kript hücreleri ve lenf nodlarındaki hücrelerde apoptozisi indükleyerek organ atrofisine yol açarken, böbrek,

karaciğer, kemik ve kemik iliği, akciğer, kaslar ve kalp gibi organlarda herhangi bir değişikliğe neden olmamaktadır. Bu özellikleri göz önüne alındığında etkin bir immunosupresan ajan olan flavopiridol'ün birden fazla cdk inhibisyonuna neden olması, olmutine ve roskovitin gibi pürin yapısına sahip ancak daha selektif etkiye sahip cdk inhibitörlerinin geliştirilmesine yolaçmıştır (87).

2.4.2 ROSKOVİTİN VE İMMUNOSUPRESAN ÖZELLİĞİ

Roskovitin (2 - [R] - (1- etil - 2 - hidroksietilamino) - 6 - benzilamino - 9 - izopropilpürin) bir pürin analogu olup cdc2, cdk2 ve cdk5 inhibisyonu yapmaktadır. Ajan, ilk kez Fransa'da Roscoff klinikte geliştirildiği için bu ad verilmiştir. Yaptığı bu selektif inhibisyon ile hücre siklusunda G2-M ve G1-S geçişlerini durdurur. Grubun diğer üyeleri gibi lenfoid sisteme spesifik etkinlik göstermektedir (88). Faz 1 çalışmaları halen devam etmekte olan ajanın sıçan böbreğinde in-vivo olarak gerçekleştirilen mezenjial proliferatif glomerulonefrit modelinde hücre çoğalmasını T hücre apoptozisini indükleyerek azalttığı gösterilmiştir (89). Bu verilerden hareketle çalışmamızda, I-R hasarının özellikle subakut evresinde rol alan nötrofil infiltrasyonunu T-hücre çoğalmasını engelleyerek inhibe etmeyi amaçladık. Böylelikle roskovitin'in devam eden faz-1 çalışmaları içerisinde şimdiye kadar denenmemiş bir alan olan iskemi-reperfüzyon hasarı üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçladık.

2.5 İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ-1 (IGF-1)

İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) 7.5 kDa büyüklüğünde tek zincirli yapısal olarak proinsüline benzeyen bir polipeptittir (90). Büyüme hormonunun iskelet yapısı üzerindeki büyümeyi artırıcı etkilerinde IGF-1 önemli rol alır (90,91). Ayrıca glikoz ve aminoasit alınımını, protein ve glikojen sentezini artırarak insülin benzeri metabolik etkiler gösterir. Etkinliğini IGF-1 reseptörü üzerinden göstermektedir (92). Reseptörü ile bağlantıya geçtiğinde tirozin

kinaz yolu üzerinden etki ederek kalsiyum kanal akımında artışa neden olur (93,94).

2.5.1 IGF-1 VE DOKULARDAKİ ANTIAPOPTOTİK ETKİNLİĞİ

IGF-1, hücre çoğalmasında, farklılaşmasında ve apoptozis'de önemli rol oynamaktadır (95). IGF-1'in bcl-2 protein düzeylerindeki değişimi ve kaspaz-3'ün aktivitesini inhibe ederek pekçok dokuda (örn; nöronal doku ve kalp kası) antiapoptotik etkinliği gösterilmiştir (94,96).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen 32 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan herbiri ayrı kafeste olmak üzere Hacettepe Üniversitesi Deneysel Araştırma Kurulu'nun önerdiği şartlar doğrultusunda barındırıldı. Hayvanlara standart sıçan yemi (Altis Veteriner Hizmetleri Tic. Şti., Ankara) ve su verildi. Çalışma Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından 20/05/2000 tarihli ve 2000/28 sayılı kararla onaylandı.

3.1 DENEY GRUPLARI VE İLAÇ UYGULAMA DÜZENİ

Çalışmaya dahil edilen 32 sıçan dört gruba ayrıldı. Bu gruplar sırası ile; *sham* grubu (n=8), kontrol grubu (n=8), roskovitin grubu (n=8) ve IGF-1 grubu (n=8) olarak belirlendi (Şekil 3.1).

Sham ve kontrol gruplarına 0.1 ml dozlar halinde dimetilsülfoksit (DMSO) 1. ve 24 saat sonraki 2.laparotomiden 16'şar saat önce intraperitoneal (i.p.) yolla uygulandı. Aynı gruba dahil sıçanlara 1.laparotomiden ve 24 saat sonra uygulanan 2.laparotomiden üçer saat önce subkutan (s.c.) yolla 0.1 ml dozlarında fosfat tamponlu salin çözeltisi (PBS) verildi.

Roskovitin grubuna dahil sıçanlara 2.8 mg/kg dozdaki roskovitin toplam hacimi 0.1 ml olan DMSO içersinde 1.ve 2.laparotomiden 16 saat öncesinde i.p. yolla uygulandı (89). Aynı gruptaki sıçanlara 1.ve 2.laparotomilerden üçer saat öncesinde s.c. yolla 0.1 ml dozunda PBS verildi.

IGF-1 grubuna dahil sıçanlara 0.1 mg/kg dozdaki IGF-1 toplam hacimi 0.1 ml olan PBS içersinde 1.ve 2.laparotomiden üçer saat önce s.c. yolla uygulandı (97). Bu gruptaki sıçanlara ayrıca 1.ve 2.laparotomiden 16 saat öncesinde 0.1 ml DMSO i.p. olarak uygulandı.

DENEY GRUPLARI



Şekil 3.1 Deneysel grupları ve protokol.

3.2 CERRAHI İŞLEMLER

Sıçanlar laparotomilerden 12 saat öncesinden itibaren aç bırakıldılar. Tüm cerrahi girişimler intramüsküler olarak uygulanan 40 mg/kg dozda ketamin (Ketalar, Parke-Davis Inc., Amerika Birleşik Devletleri) ve 4 mg/kg dozda ksilazin (Rompun, Bayer, AG, Almanya) anestezisi altında yapıldı. *Sham* grubu dışındaki gruplara dahil bütün hayvanlara karaciğerin sağ lobuna selektif iskemi ve reperfüzyon uygulandı. Hepatik iskemi oluşturmak için karına orta hat kesisi ile girildi. Karaciğerin orta ve sol loblarının dolaşımı korunarak, sağ loba giden hepatic arter ve portal ven dalları, selektif olarak mikrovasküler atravmatik klemplerle 60 dk. süre ile kapatıldı. İskemi periyodu sonunda klemp alınarak sıçanın karnı 4/0 ipek dikişlerle kapatıldı. *Sham* grubuna dahil hayvanlara laparotomi yapıldıktan sonra sadece hiler bölge diseksiyonu yapıldı ve bir saatlik süre sonunda karınları aynı yöntem ile kapatıldı. Birinci laparotominin tamamlanmasından 24 saat sonra serum alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) ölçümü amacı ile venöz kan örnekleri alındıktan sonra sıçanların tümüne laparotomi ve sağ torakotomi ile total hepatektomi uygulandı. Karaciğerin I-R hasarına uğratılmış olan sağ lobundan, myeloperoksidaz (MPO) tayini için alınan doku örnekleri 72 saat içinde çalışılmak koşulu ile -20°C sıcaklıkta saklanmak üzere derin dondurucuya konuldu. Karaciğer sağ lobuna giden portal ven dalı, histolojik incelemeler için boya infüzyonu yapılmak üzere 24 G polietilen kanül ile kateterize edildi.

3.3 HİSTOLOJİK İŞLEMLER

Karaciğer sağ lobuna yerleştirilen kanülden serum fizyolojik ile yapılan yıkama ile damar içinde kalmış olan eritrositler ve kan temizlendi. Takiben 0.2 mM konsantrasyonda hazırlanan tripan mavisi (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Amerika Birleşik Devletleri) 10 dakika süre ile aynı kanülden infüze edildi. Vasküler yatakta kalan fazla boya 5 dakika serum fizyolojik infüzyonu ile temizlendi. Daha sonra karaciğer dokuları 6 dakika süre ile %1'lik paraformaldehit ile perfüze edilerek fikse edildi. İşlem sonrasında karaciğer

dokuları, Thurman ve ark.'nın tanımladıkları yöntemlerle parafine gömülerek ışık mikroskopisi için hazırlandı (98,99). Altı μm kalınlığında alınan kesitler deparafinize edildikten sonra tripan mavisi boyası almış olan hücrelerin farkedilebilmesi amacıyla eosin ile boyandı (Şekil 4.1.1). Alınan her kesitte ışık mikroskopu altında (Carl Zeiss, Almanya) hasara uğramış hücrelerin nükleuslarını değerlendirmek amacı ile periportal, midzonal ve perisentral alanlar belirlendi. Analiz yapmak amacı ile mikroskopik görüntüler yüksek çözünürlükteki video ekranına yönlendirildi ve kesitlerde ayrı ayrı her üç alan içinde 10'ar büyük büyütme alanındaki (400 x) hepatositler değerlendirildi. Birbirinden ve kesitlerin hangi deneğe ait olduğundan habersiz iki araştırmacı tarafından her alandaki tripan mavisi pozitif hepatosit sayısı ve toplam hepatosit sayısı bulundu. Bu değerlerin ortalamaları alınarak, her denek için her üç alandaki ölü ve toplam hepatosit sayısına dair değerler elde edildi.

3.4 İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM

İlk kez Leers ve ark. tarafından tanımlanan M30 monoklonal antikoru (mAb) (Boehringer Mannheim, Almanya), apoptozisin erken evresinde DNA kırılmasına bağlı ortaya çıkan sitokeratin-18'in (CK-18) epitopuna bağlanarak apoptotik hücrelerde boyanmaya neden olurlar (100). Çalışmamızda M30 mAb yöntemi kısaca şu şekilde uygulandı; formalin ile fikse edilmiş ve parafine gömülmüş karaciğer dokusundan alınan 6 μm kalınlığındaki kesitler deparafinize ve rehidrate edildi. Antijen saptanması için sitrat tamponu içinde mikrodalga ile 15 dakika süresince ısıtma yapıldı ve kesitler M30 mAb ile 1 μg IgG/ml konsantrasyonunda 1 saat süre ile oda sıcaklığında enkübe edildi. Kesitler daha sonra anti-mouse biotin Ig (Dako, Danimarka) ve peroksidaz-işaretli streptavidin (Dako, Danimarka) ile işleme tabii tutuldu. Peroksidaz işaretleri diaminobenzidin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, Amerika Birleşik Devletleri) ile birlikte %0.003'lük H₂O₂ içinde kahverengi çöküntüler olarak saptandı (Şekil 4.1.2). Kontrastı daha belirgin hale getirmek amacı ile kesit tabanı hematoksilin ile boyandı. Daha önce ölü hücrelerin sayımında tariflenen ilkelere sadık kalınarak

erken apoptozise uğrayan hepatosit sayısı ile toplam hepatosit sayılarının ortalaması her denek için alındı.

3.5 KARACİĞER HASARININ ENZİMATİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Venöz kan örneklerinde, Hitachi 717 otomatik analizler (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Amerika Birleşik Devletleri) yardımı ile ALT ve AST düzeylerine bakıldı. Karaciğer dokusu örneklerinde ise nötrofil infiltrasyonunun indirekt parametresi olarak MPO enzimi düzeylerine bakıldı.

3.6 NÖTROFİL İNFİLTRASYONUNUN DEĞERLENMESİNDE MPO

MPO ölçümünde Suzuki ve arkadaşları tarafından tarif edilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı (101). Örnekler, 7.4 pH'da 1:10 (w/v) olarak sulandırılmış 50mM potasyum fosfat tamponu içinde homojenizörle homojenize hale getirildi. Homojenat santrifüj edildikten sonra dipte biriken çökelti aynı hacminde deterjan içeren tampon (50mM potasyum fosfat tamponu pH: 6, %0.5 hegzadekiltrimetilamonyum bromid (HETAB), 10mM EDTA) ile tekrar süspansiyon haline getirildi. Standart reaksiyon karışımı 500 µl tampon çözeltisi (5.4 pH'daki 160µM potasyum fosfat tamponu, %1 HETAB), 100 µl 3,3', 5,5'-tetrametil benzidin (TMB) (16mM, dimetil formamin[DMF]'de çözünmüş), 50 µl homojenat ve 300 µl su ile hazırlandı. Reaksiyon 37°C'da 50 µl H₂O₂ eklenerek başlatıldı. TMB'nin MPO ile katalize edilen oksidasyon oranı, 655nm'de emilimdeki artış kaydedilerek takip edildi. Karaciğer dokusundaki MPO düzeyi IU/gr yaş doku cinsinden hesaplandı (102).

3.7 İSTATİSTİK DEĞERLENDİRME

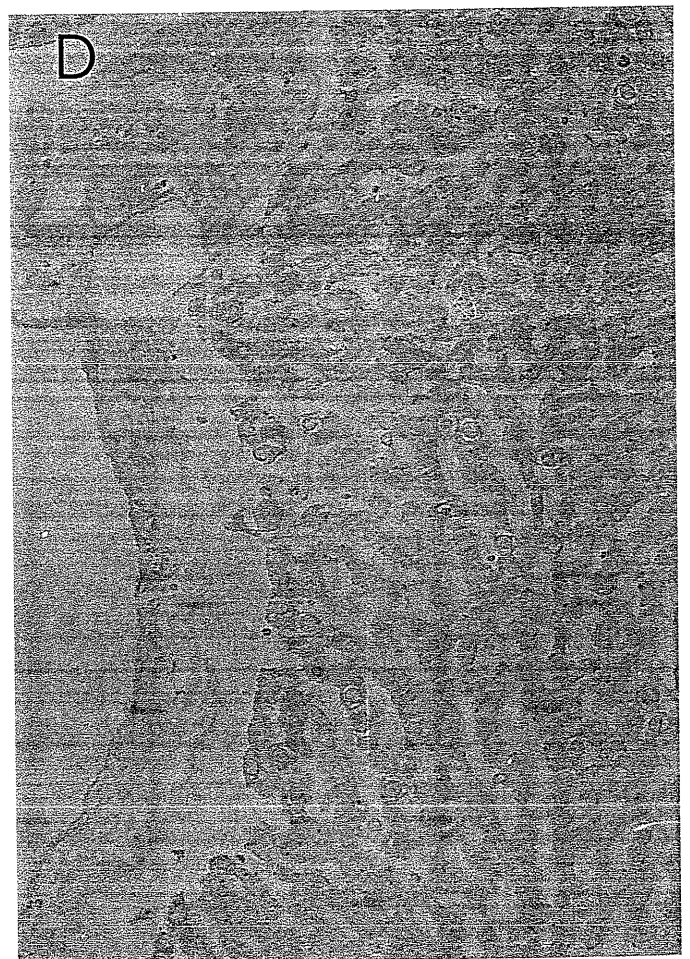
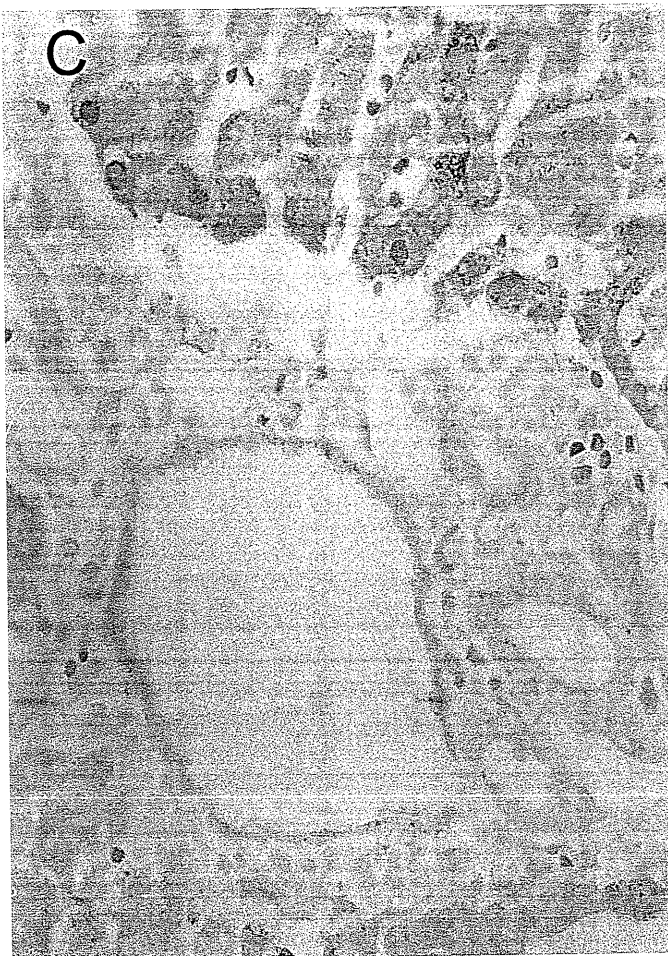
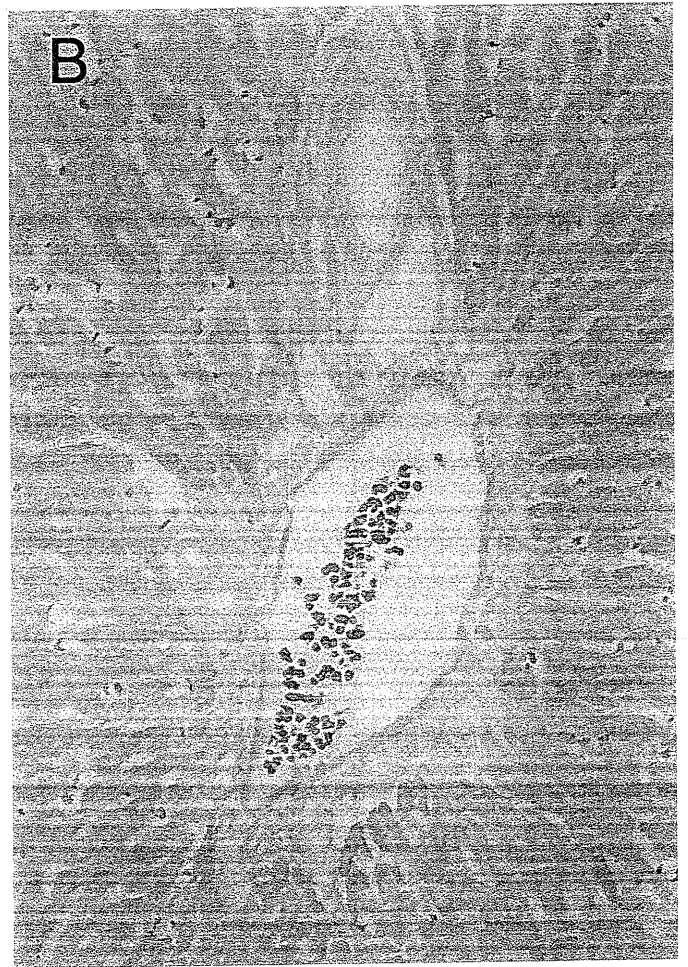
Histolojik verilerin median değerleri (minimum – maksimum) ve biyokimyasal verilerin ortalama \pm standart sapmaları dikkate alındı. Veriler Kruskal-Wallis testi kullanılarak analiz edildi. Farklılıklar anlamlı bulunduğunda, gruplar Mann-Whitney-U testi kullanılarak karşılaştırıldı. Bonferroni düzeltmesi kullanıldığında; periportal, midzonal ve perisentral alanların karşılaştırılmasında anlamlı P değeri < 0.016 ve histolojik veriler açısından gruplar karşılaştırıldığında anlamlı P değeri < 0.008 olarak belirlendi. Enzimlerin gruplar arasındaki dağılımı incelenirken P değeri < 0.05 olarak belirlendi.

4. BULGULAR

Deney gruplarında, deney sırasında değişik faktörlere bağlı olarak (deney hayvanları laboratuvarındaki uygunsuz Őartlara bağlı, anestezi indüksiyonu sırasında ani ölümlere bağlı) sıçan sayısında planlanan rakamlar ile farklılıklar oldu. Buna göre; kontrol grubunda 6, *sham* grubunda 8, roskovitin grubunda 6 ve IGF-1 grubunda 7 sıçan çalışma sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanıldı.,

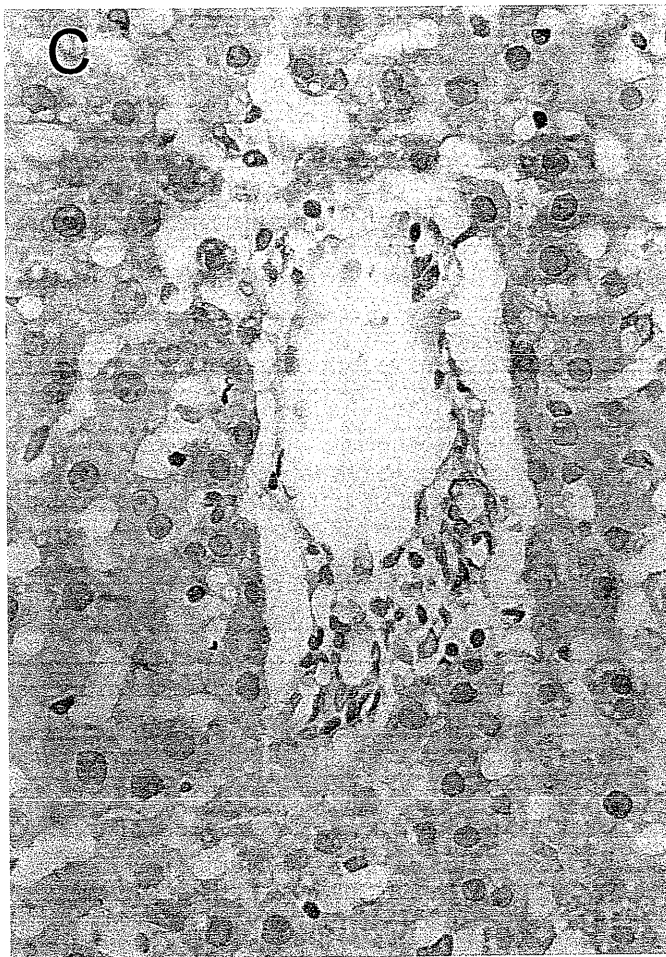
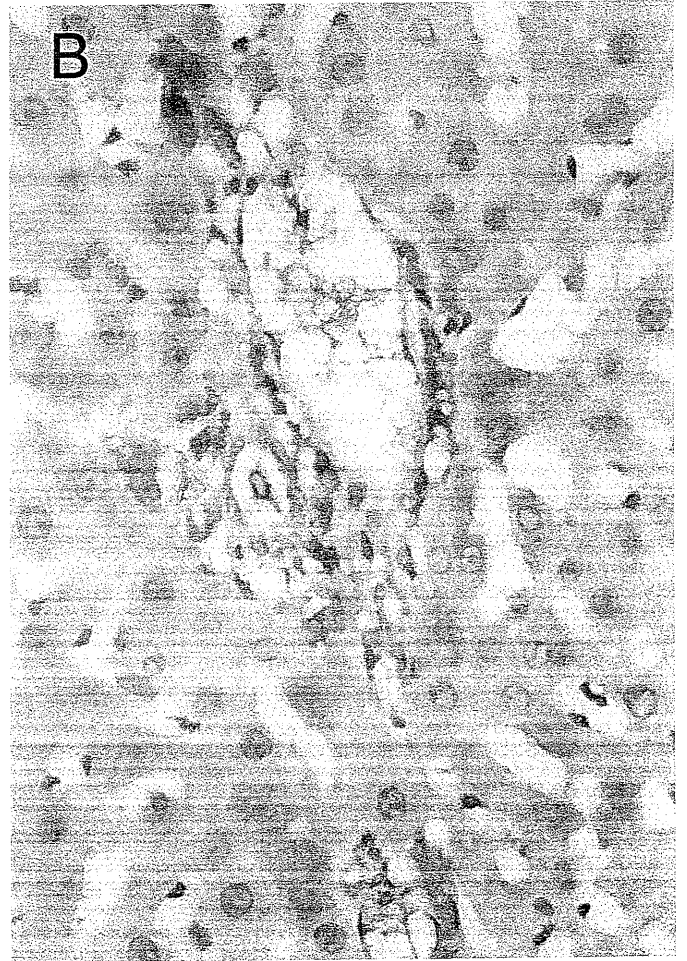
4.1 HİSTOPATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME BULGULARI

Sham grubundan alınan noniskemik karaciğer doku kesitlerinde belirgin apoptozis, nekroz ve diğer iskemik değişikliklere rastlanmadı. Kontrol grubunda ise ölü hepatositlerin diğer alanlarla karşılaştırıldığında özellikle periportal alanlarda belirgin olarak yoğunlaştıkları saptandı ($P<0.016$) (Şekil 4.1.1,4.1.3, Tablo 4.1). Apoptotik hepatositlerin dağılımının da benzer özellikler göstermekle birlikte perisentral alanda da birikimin olması dikkat çekti ($P<0.016$) (Şekil 4.1.2,4.1.4, Tablo 4.2). *Sham* grubu ile karşılaştırıldığında, kontrol grubunda özellikle periportal alandaki apoptotik ve ölü hepatosit sayısının belirgin olarak arttığı izlendi ($P<0.002$).



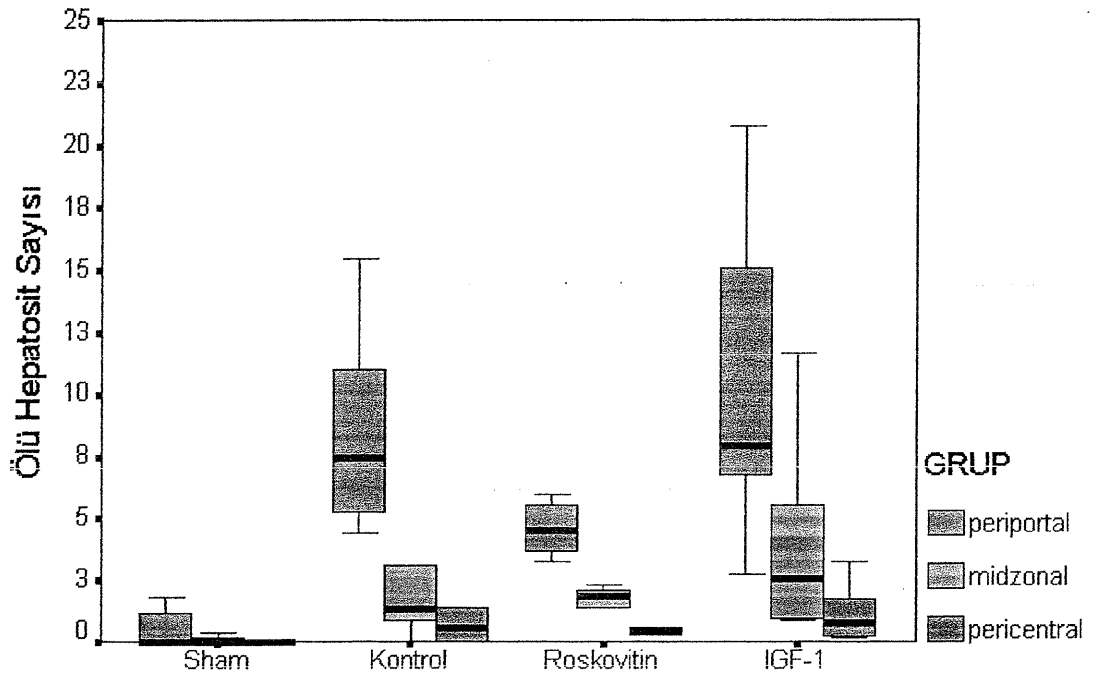
Şekil 4.1.1 Histolojik kesitlerde apoptotik hepatositlerin dağılımında gruplar arasındaki farklılıklar. A- M30 MAb tutulumuna bağlı olarak sitoplazmalarında kahverengi boyanma oluşan apoptotik hepatositlerin kontrol grubunda periportal alanda yoğunlaşmaları izlenmektedir (X 460 BBA). B-*Sham* grubunda apoptotik hepatosit izlenmemektedir (X 460 BBA) . C- Roskovitin uygulanan grupta kontrol grubuna oranla apoptotik hepatosit sayısının azaldığı izlenmektedir (X 460 BBA). D- IGF-1 uygulaması, apoptotik hepatosit sayılarında kontrol grubuna göre farklılığa yol açmamıştır (X 460 BBA).

Roskovitin uygulanan gruptaki deneklerden alınan karaciğer kesitlerinde ölü hepatositlerin kontrol grubuna benzer şekilde periportal alanda yoğunlaşmış oldukları izlendi ($P<0.005$)(Şekil 4.1.1,4.1.3, Tablo 4.1). Apoptotik hepatosit dağılımı incelendiğinde periportal ve perisentral alanlarda daha belirgin yoğunlaşma olduğu saptandı ($P<0.007$) (Şekil 4.1.2,4.1.4, Tablo 4.2). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; periportal alandaki ölü hepatosit yoğunluğunun azaldığı, ancak diğer alanlarda değişiklik olmadığı belirlendi ($P>0.05$). Özellikle periportal alandaki apoptotik hepatosit yoğunluğunda belirgin bir azalmanın olduğu izlendi ($P<0.005$)

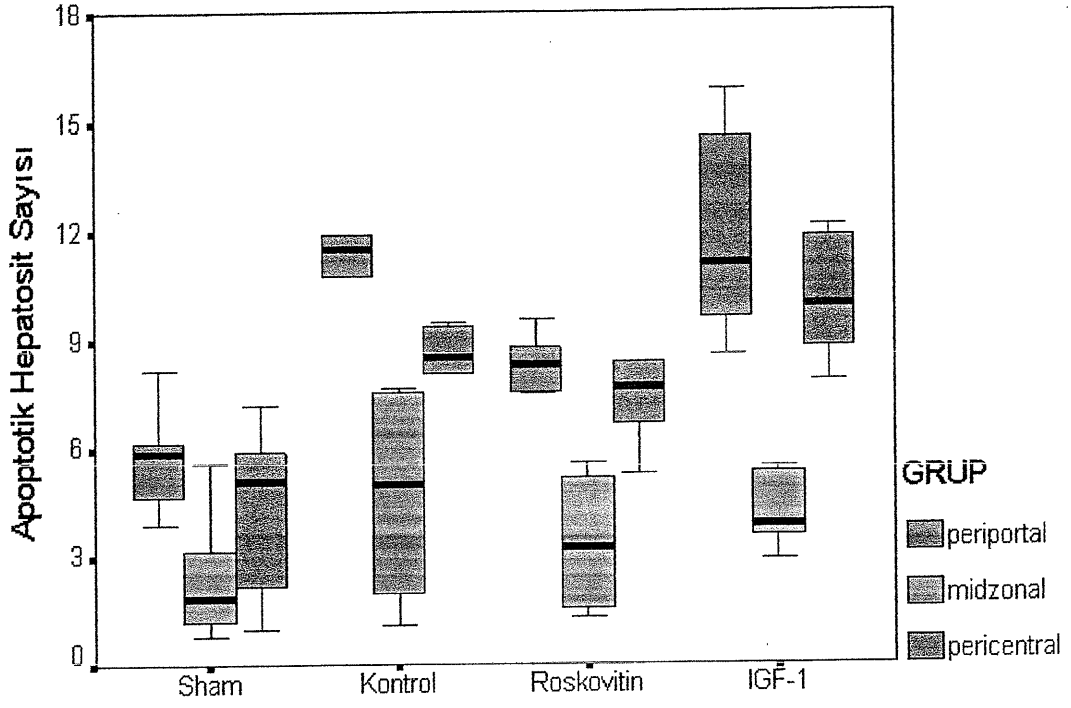


Şekil 4.1.2. Histolojik kesitlerde ölü hepatositlerin dağılımında gruplar arasındaki farklılıklar. A-Eosin ile boyanan zeminde nükleusları tripan mavisi ile boyanan ölü hepatositler kontrol grubunda periportal alanda izlenmektedir (X 460 BBA). B- *Sham* grubunda ölü hepatosit izlenmemektedir (X 230 BBA). C- Roskovitin uygulanan grupta kontrol grubuna oranla ölü hepatosit sayısının oldukça azaldığı dikkat çekmektedir (X 460 BBA). D- IGF-1 uygulaması sonrası ölü hepatosit sayılarında kontrol grubuna göre farklılık izlenmemiştir (X 230 BBA).

IGF-1 uygulanan sıçanlardan alınan karaciğer doku örneklerinin tripan mavisi ve eosin ile boyanarak hazırlanan kesitlerinde ölü hepatositlerin periportal ve midzonal alanlarda yoğunlaştıkları izlendi ($P < 0.005$) (Şekil 4.1.1, 4.1.3, Tablo 4.1). Apoptotik hepatositlerin ise periportal ve midzonal alanlarda çok sayıda oldukları saptandı ($P < 0.01$) (Şekil 4.1.2, 4.1.4, Tablo 4.2). Gerek ölü, gerekse de apoptozise uğramış hepatosit miktarının kontrol grubuna göre belirgin farklılık göstermediği görüldü ($P > 0.05$).



Şekil 4.1.3: Ölü Hepatositlerin, gruplar ve zonlara göre dağılımı.



Şekil 4.1.4: Apoptotik hepatositlerin, gruplar ve zonlara göre dağılımı.

Tablo 4.1.1 Ölü hepatositlerin gruplara ve karaciğer alanlarına göre dağılımı. Tüm değerler median (minimum-maksimum) olarak verilmiştir.

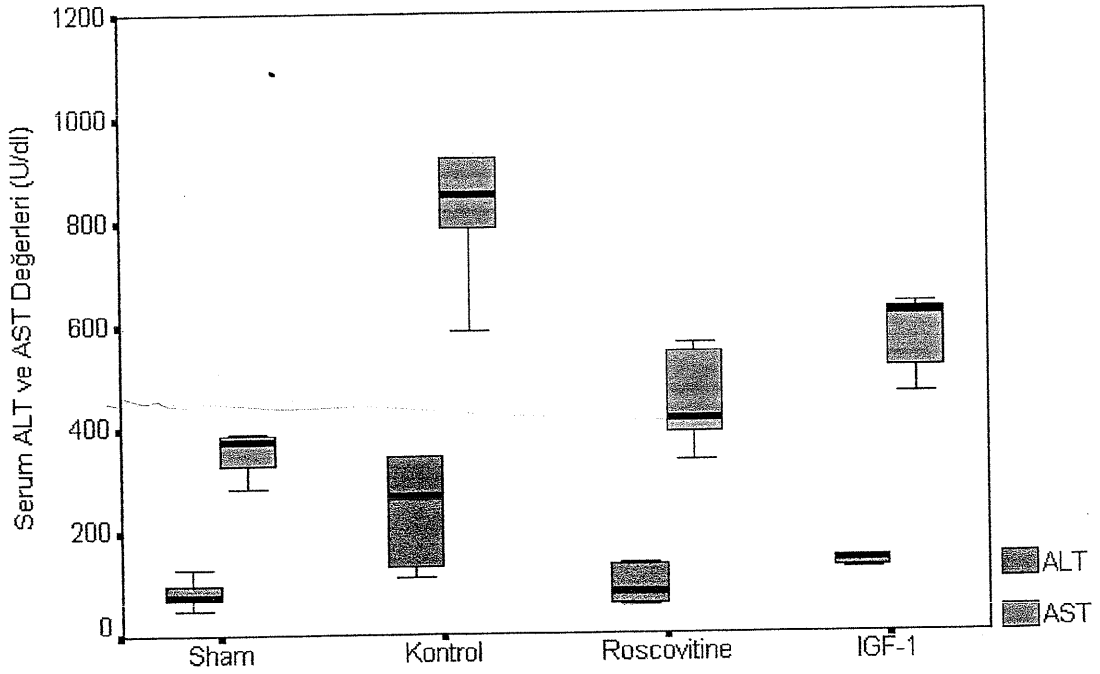
Gruplar	Periportal bölge		Midzonal bölge		Perisentral bölge	
	ölü hepatosit sayısı	toplam hepatosit sayısı	ölü hepatosit sayısı	toplam hepatosit sayısı	ölü hepatosit sayısı	toplam hepatosit sayısı
Kontrol N=6	7.5 (4.4-15.5)	55 (49.8-57.2)	1.4 (0-6.5)	66.7 (61.7-70.5)	0.6 (0-3.9)	57.85 (51.1-64.9)
Sham N=8	0.0 (0.0-1.8)	53.55 (45.4-62.1)	0.0 (0.0-0.6)	71.0 (60.7-78.5)	0.0 (0.0-0.0)	62.65 (49.6-71.2)
Roskovitin N=6	4.5 (3.3-6.0)	50.55 (44.9-54.7)	1.9 (1.4-2.3)	76.1 (73.4-78.0)	0.45 (0.3-1.2)	63.2 (60.3-68.7)
IGF-1 N=7	8.0 (2.8-20.8)	47.9 (45.7-53.5)	2.6 (0.9-11.7)	74.6 (73.0-80.4)	0.8 (0.2-3.3)	58.9 (57.2-63.6)

Tablo 4.1.2 Apoptotik hepatositlerin gruplara ve karaciğer alanlarına göre dağılımı. Tüm değerler median (minimum-maksimum) olarak verilmiştir.

Gruplar	Periportal bölge		Midzonal bölge		Perisentral bölge	
	apoptotik hepatosit sayısı	toplam hepatosit sayısı	apoptotik hepatosit sayısı	toplam hepatosit sayısı	apoptotik hepatosit sayısı	toplam hepatosit sayısı
Kontrol N=6	11.5 (10.8-15.4)	38.1 (36.3-48.6)	5.0 (1.1-7.7)	68.75 (51.2-70.1)	8.55 (5.1-9.5)	53.45 (43.2-60.5)
Sham N=8	5.9 (3.9-8.2)	42.6 (39.0-49.4)	1.85 (0.8-5.6)	69.15 (63.7-75.9)	5.1 (1.0-7.2)	53.15 (44.9-55.7)
Roskovitin N=6	8.35 (7.5-9.6)	41.65 (35.5-48.7)	3.25 (1.3-5.6)	69.55 (59.6-81.0)	7.7 (5.3-11.6)	51.4 (47.3-63.5)
IGF-1 N=7	11.1 (8.6-15.9)	42.8 (37.1-53.8)	3.9 (2.9-8.9)	74.2 (67.6-85.2)	10.0 (7.9-12.2)	53.5 (42.1-59.3)

4.2 KARACİĞER TRANSAMİNAZLARI DÜZEYLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

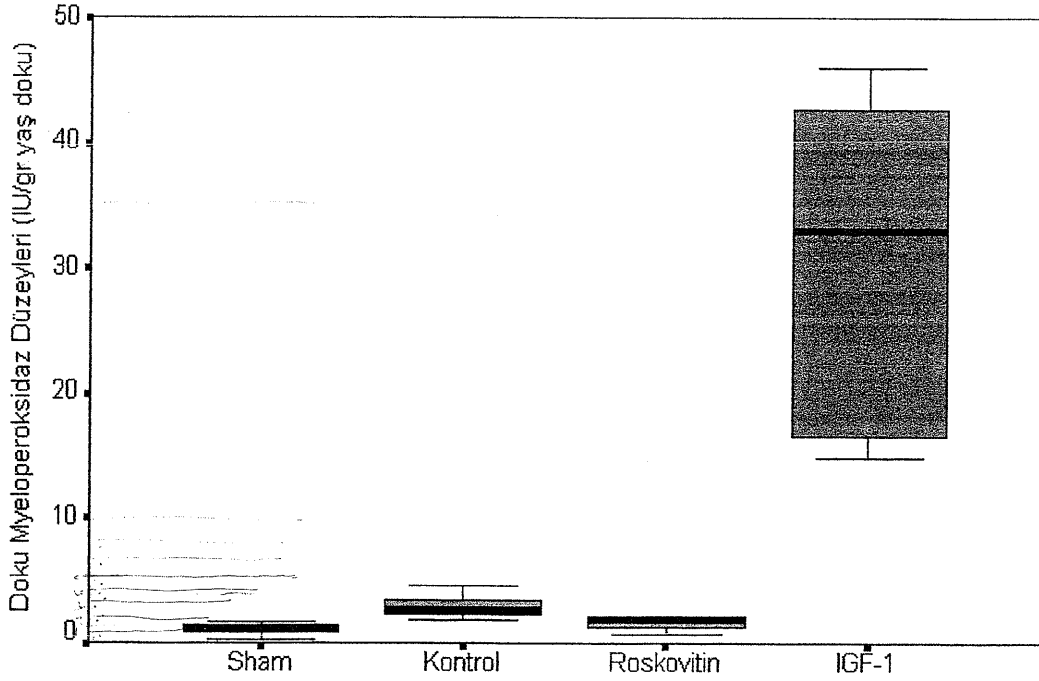
Sham grubu ile karşılaştırıldığında iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan kontrol grubunda; ALT ve AST değerlerinde belirgin artış olduğu görüldü ($P<0.005$). Roscovitin uygulanan sıçanlarda ALT ve AST değerlerinin kontrol grubuna göre belirgin olarak azaldığı saptandı ($P<0.05$). IGF-1 uygulanan grupta ALT ve AST değerlerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklılık saptanmadı (Şekil 4.2)



Şekil 4.2: ALT, AST düzeylerinin gruplara göre dağılımı.

4.3 DOKU MYELOPEROKSİDAZ DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Kontrol grubunda *sham* grubuna göre belirgin olarak artmış MPO değerleri saptandı ($P<0.002$). MPO düzeylerinin; Roskovitin uygulanan grupta kontrol grubuna göre belirgin azalmış olmasına karşın ($P<0.02$), IGF-1 uygulanan grupta kontrol grubuna göre belirgin olarak artmış olduğu görüldü ($P<0.005$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Doku MPO değerinin gruplara göre dağılımı.

5. TARTIŞMA

Karaciğer, Pringle manevrası gibi cerrahi işlemlerde izole olarak veya şok gibi sistemik hipoperfüzyona neden olan durumlarda diğer organlarla birlikte, sıcak iskemi-reperfüzyon hasarına maruz kalabilmektedir. Karaciğerde oluşturulan sıcak I-R sonrasında en belirgin hasarlanma akut dönemde (3-6.saat) gelişen nekroz yoluyla olmaktadır. Ancak sıçan karaciğerinde oluşturulan 60 dakikalık sıcak iskemi sonrasında akut ve subakut devrede (18-24.saat), nekrotik hepatositlerin yanı sıra apoptotik hepatositlerin de görüldüğü saptanmıştır (13). Bu verilere karşın apoptozis'in karaciğerdeki I-R hasarının patogenezinde oynadığı rol tam olarak tanımlanamamıştır.

I-R sonrasında oluşan akut ve subakut dönemdeki karaciğer hasarı ile ilgili bir diğer tartışmalı nokta da hasarın zonal dağılımında homojenitenin olmamasıdır. Lemasters ve Thurman yaptıkları çalışmalarda I-R'nin öncelikle perisentral bölgede hasara neden olduğunu ve midzonal, periportal bölgelerin daha az etkilendiğini saptamışlardır (14). Buna karşın, 1992 Yılında Suematsu ve ark. ile 1997 yılında Sasaki ve arkadaşları, daha önceki gözlemlerden farklı olarak I-R sonrasındaki karaciğer hasarının öncelikle periportal alanda yoğunlaştığını rapor etmişlerdir (13,61,103).

Tarafımızdan daha önce gerçekleştirilmiş olan bir çalışmada sıçan karaciğerinde oluşturulan I-R sonrasında reperfüzyonun akut döneminde (4.saat) oluşan değişiklikler araştırılmıştır (104). Apoptotik hepatositlerin öncelikle periportal bölgelerde yoğunlaştıkları gözlenmiş, ölü hepatosit yoğunluğunun da benzer dağılım özellikleri gösterdiği saptanmıştır. Aynı çalışmada hasarın dağılım karakterinin saptanması dışında apoptozisin inhibe edilmesinin genel olarak karaciğerde oluşan hasarın engellenmesine etkisi de araştırılmış, etkin bir antiapoptotik ajan olan IGF-1'in karaciğerde oluşan hasarı belirgin olarak azalttığı görülmüştür. Hasarın azaltılması yönündeki benzer etkiler immünosupresif bir ajan olan roskovitin

uygulandığı grupta da göze çarpmıştır. Ancak her iki ajanın birlikte uygulanması sonucunda etkinliklerinin azaldığı gözlenmiştir.

Sıçan karaciğerinde oluşturulan I-R hasarı üzerinde yaptığımız önceki çalışmanın devamı niteliğini taşıyan çalışmamızda reperfüzyonun subakut evresinde de apoptotik ve ölü hepatositlerin özellikle periportal bölgelerde yoğunlaştıklarını gözlemledik. Apoptotik ve ölü hepatositlerin, karaciğerdeki I-R hasarının akut fazında gösterildiği gibi subakut fazında da periportal bölgede yoğunlaşmalarının altında yatan mekanizma bilinmemektedir. Karaciğer lobülündeki perisentral alanlarda, oksijen tansiyonunun periportal bölgelere göre daha az olduğundan bu bölgeler hipoksik hasara karşı daha savunmasızdır, ancak IR hasarı hipoksik hasara göre daha farklı özellikler gösterir. Düşük oksijen tansiyonuna sahip bölgelerin IR hasarına karşı daha dirençli olduğu düşünülebilir. Ayrıca perisentral ve periportal bölgelerdeki mitokondrial içerik arasındaki farklılık da, hepatosit hasarındaki dağılım üzerinde etkin olabilir (105).

I-R hasarının subakut fazında, lenfoid hücrelerin kontrol ettiği mekanizmalar önemli rol almaktadır (1,3,4,5,6). Pek çok araştırmacı bu hasarı önlemek amacı ile farklı yollardan etkinliklerini gösteren lenfoid sistem baskılayıcılarını (immünosupresan ajanlar) kullanmıştır. Siklosporin gibi ajanlar bu çalışmalar sonucunda klinik kullanıma girmişlerdir. Son yıllarda üzerinde yoğun olarak çalışılan bir immünosupresan ajan grubu da siklin bağımlı kinaz inhibitörleridir. Bu gruba dahil ajanlar, hücre siklusunu düzenleyen siklin bağımlı kinazların inhibisyonu yolu ile etkinliklerini göstermektedir (86,87). Siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinden olan roskovitin (88,89) ile nötrofillerin ve onların uyarılmasında pay sahibi olan T-lenfositlerin apoptozisini uyararak yaratılan immünosupresyonun, karaciğerde oluşturulan I-R travmasının subakut evresindeki hasar üzerine etkilerini gösterdik. Çalışmamız sonucunda roskovitin uygulanan sıçan grubunda histolojik ve biyokimyasal bakımdan I-R'ye bağlı subakut dönemdeki karaciğer hasarında belirgin azalma olduğunu saptadık. Daha önce sıçan karaciğerinde

oluşturduğumuz I-R modelinde akut dönem hasarının azaltılması yönünde olumlu etkilerini saptadığımız roskovitinin (104), hasarın subakut döneminde de özellikle lenfositler hücre üzerinde yaptığı baskı ile karaciğer dokusunu koruduğunu düşündük.

Çalışmamızda I-R üzerindeki etkinliğini araştırdığımız diğer ajan olan IGF-1; hücre çoğalmasında, farklılaşmasında ve apoptozisde önemli roller almaktadır (95). Değişik dokularda bcl-2 protein düzeylerindeki değişiklikleri ve kaspaz-3 benzeri aktiviteleri inhibe ederek apoptotik hücre sayılarının azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (94,96). Sıçan karaciğerinde oluşturduğumuz I-R hasarının akut evresinde apoptozise uğramış hepatosit sayısını ve genel olarak karaciğer hasarını azalttığını gösterdiğimiz IGF-1'in reperfüzyonun subakut evresindeki etkinliğini de araştırdık. Elde ettiğimiz veriler ışığında, ajanın karaciğerdeki IR hasarında akut dönemde göstermiş olduğu olumlu etkilerin (104) aksine, subakut dönemde etkinliğinin olmadığı gözlemlendi. IGF-1'in karaciğerdeki I-R hasarının subakut evresinde antiapoptotik özellik gösterememesi, bu evredeki hasarın başlıca düzenleyicisinin nötrofiller olduğunu düşündürmektedir.

Literatürde apoptozisi saptamak amacıyla kullanılacak pek çok yöntem tariflenmiştir. Apoptozis, doku kesitlerinden hazırlanan preparatların ışık ve elektron mikroskopisi ile incelenmesi ile, agaroz jel DNA elektroforezi ile, ISEL (in situ nick-end labeling), TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) ve annexin V gibi yöntemlerle saptanabilmektedir (106-108). Apoptozisin erken döneminde kaspazlar tarafından parçalanan sitokeratin (CK) 18'in epitopu ile M30 Ab arasında gelişen reaksiyon Leers ve arkadaşlarını yeni bir apoptotik hücreleri saptamaya yönlendirmiştir (100). Yöntem özellikle erken dönemde (ışık ve elektron mikroskopisinde apoptozisin karakteristik özellikleri oluşmadan) apoptotik hücreleri tanıma avantajını taşıdığı için ve sıklıkla kullanılan diğer bir test olan TUNEL testinin aksine zemin ile apoptotik hücre arasındaki kontrastın belirgin olması nedeni ile çalışmamızda histolojik olarak apoptozis'i

göstermek için tercih edilmiştir. Ölü hepatositlerin belirlenmesinde ise vital bir boya olan tripan mavisi kullanılmıştır. Daha önce çeşitli etkenlere bağlı oluşan karaciğer hasarının incelendiği pek çok çalışmada da kullanılan tripan mavisi duyarlı ve ucuz olması yanında karaciğerdeki hasarın bölgesel dağılımını göstermekte yararlı olmuştur. (98,99).

Sıçan karaciğerinde yaptığımız bu çalışma ile öncelikle İ-R hasarında subakut dönemde oluşan değişiklikler içerisinde önemli yer tutan hepatosit hasarının morfolojisini ve karakterlerini tanımladık. Klinikte karşılaştığımız ve İ-R hasarının patogeneğinde yer aldığı karaciğer transplantasyonu, hipovolemik şok tedavisi ve karaciğere yönelik diğer cerrahi girişimlerin daha başarılı olmasında, oluşan hasarın tanımlanması ve önlenmesine yönelik tedbirlerin alınması önemli bir yer tutmaktadır.

Özellikle karaciğer transplantasyonlarının başarısında İ-R hasarının azaltılması çok önemli bir yer tutmaktadır. Karaciğerde oluşturulan modelimizde roskovitin uygulanması ile elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda ajanın İ-R hasarının önlenmesinde etkin bir yeri olabileceği saptanmıştır. Ancak roskovitin klinik uygulamaya sunumu için oldukça kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

6. SONUÇ

- 1- Karaciğerde oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarı, subakut evrede özellikle periportal ve daha az oranda da perisentral alanlarda belirginleşmektedir.
- 2- Apoptozis, tıpkı nekroz gibi I-R hasarında önemli bir mekanizma olarak rol almaktadır.
- 3- Roskovitin, immunosupresif etkinliğini sıçan karaciğerinde oluşturulan IR hasarı modelinde göstererek nekroz ve apoptozis'e bağlı oluşan hepatosit kaybının azalmasını sağlamıştır.
- 4- IGF-1, I-R hasarının subakut döneminde hepatosit apoptozisini ve nekrozunu azaltmamış, aksine dokudaki hasarı arttırmıştır.
- 5- Her iki ajanın bu şekilde etki göstermesi karaciğerde I-R hasarının subakut döneminde nötrofillerin önemli rol oynadığını düşündürmektedir.

7. KAYNAKLAR

- 1- Zwacka R.M., Zhang Y., Halldorson J., Schlossberg H., Dudus L., Engelhardt J.F. CD4 T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *J Clin Invest.*100: 279-289,1997.
- 2- Rauren U, Viebahn R, Lauchart W, DeGroot H. The potential role of reactive oxygen species in liver ischemia/reperfusion injury following liver surgery. *Hepato-Gastroenterol.* 41: 333-336, 1994.
- 3- Lemasters JJ, Thurman RG. Hypoxia and reperfusion injury to liver. *Prog Liv Dis.* 11: 85-114, 1993.
- 4- Toledo-Pereyra LH, Suzuki S. Neutrophils, cytokines, and adhesion molecules in hepatic ischemia and reperfusion injury. *J Am Coll Surg.* 179: 758-762, 1994.
- 5- Jaeschke H. Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 5: 402-408, 1998.
- 6- Lichtman SN, Lemasters JJ. Role of cytokine-producing cells in reperfusion injury to the liver. *Sem Liv Dis.* 19: 171-187, 1999.
- 7- Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology.* 32: 169-173, 2000.
- 8- Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, Gobe G, Connor J, O'Toole KM, Olsson CA, Wise GJ, Buttyan R. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol.* 140: 831-883, 1992.
- 9- Itoh G, Tamura J, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Koike M, Nomura M, Jie T, Ito K. DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *Am J Pathol.* 146: 1325-1332, 1995.
- 10- Hashimoto Y, Kawatsura H, Shiga Y, Furukawa S, Shigeno T. Significance of nerve growth factor content levels after transient forebrain ischemia in gerbils. *Neurosci Lett.* 139: 45-46, 1992.

- 11- Fujimoto K, Hosotani R, Wada M, Lee J, Koshiba T, Miyamoto Y, Doi R, Imamura M. Ischemia-reperfusion injury on the pancreas in rats: identification of acinar cell apoptosis. *J Surg Res.* 71: 127-136, 1997.
- 12- Schlossberg H, Zhang Y, Dudus L, Engelhardt JF. Expression of c-fos and c-jun during hepatocellular remodeling following ischemia/reperfusion in mouse liver. *Hepatology.* 23: 1546-1555, 1996.
- 13- Sasaki H, Matsuno T, Nakagawa K, Tanaka N. Induction of apoptosis during early phase of reperfusion after rat liver ischemia. *Acta Med Okayama.* 51: 305-312, 1997.
- 14- Lemasters JJ, Ji S, Thurman RG. Centrilobular injury following low flow hypoxia in isolated, perfused rat liver. *Science.* 213: 661-663, 1981.
- 15- Lemasters JJ, Stemkowski CJ, Ji S, Thurman RG. Cell surface changes and enzyme release during hypoxia and reoxygenation in the isolated, perfused rat liver. *J Cell Biol.* 97:778-786, 1988.
- 16- Phelps PC, Smith MW, Trump BF. Cytosolic ionized calcium and bleb formation after acute cell injury of cultured rabbit renal tubule cells. *Lab Invest.* 60:630-642, 1989.
- 17- Bellomo G, Orrenius S. Altered thiol and calcium homeostasis in oxidative hepatocellular injury. *Hepatology.* 5:876-882, 1985.
- 18- Harrison DC, Lemasters JJ, Herman B. A pH-dependent phospholipase A₂ contributes to loss of plasma membrane integrity during chemical hypoxia in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 174:654-659, 1991.
- 19- Marotto ME, Thurman RG, Lemasters JJ. Early midzonal cell death during low-flow hypoxia in the isolated, perfused rat liver: Protection by allopurinol. *Hepatology.* 8:585-590, 1988.
- 20- Flaherty JT, Weisfeldt ML. Reperfusion injury. *Free Radic Biol Med.* 5: 409-419, 1988.
- 21- Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L, Engelhardt JF. CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *J Clin Invest.* 100:279-289, 1997.

- 22- Ghezzi P, Dinarello CA, Bianchi M, Rosandich ME, Repine JE, White CW. Hypoxia increases production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human mononuclear cells. *Cytokine*. 3:189-194,1991.
- 23- Zhou W, McCollum MO, Levine BA, Olson MS. Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology*. 16:1236-1240,1992.
- 24- Scoazec JY, Durand F, Degott C, Delautier D, Bernuau J, Belghiti J, Benhamou JP, Feldmann G. Expression of cytokine-dependent adhesion molecules in postreperfusion biopsy specimens of liver allografts. *Gastroenterology*. 107: 1094-1102,1994.
- 25- Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *J Mol Med*. 77:577-596,1999.
- 26- Kurokawa T, Nonami T, Harada A, Nakao A, Takagi H. Mechanism and prevention of ischemia/reperfusion injury of the liver. *Semin Surg Oncol*. 12:179-182,1996.
- 27- Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem*. 244:3855-3863,1969.
- 28- Rymsa B, Wang JF, De Groot H. O_2^- release by activated Kupffer cells upon hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol*. 261:G602-G607, 1991.
- 29- Connor HD, Gao W, Nukina S, Lemasters JJ, Mason RP, Thurman RG. Evidence that free radicals are involved in graft failure following orthotopic liver transplantation in the rat-an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Transplantation* 54:199-204, 1992.
- 30- Jaeschke H, Mitchell JR. Mitochondria and xanthine oxidase both generate reactive oxygen species in isolated perfused rat liver after hypoxic injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 160: 140-147, 1989.
- 31- Littauer A, De Groot H. Release of reactive oxygen by hepatocytes on reoxygenation: three phases and role of mitochondria. *Am J Physiol*. 262:G1015-G1020, 1992.

- 32- De Groot H, Littaurer A. Reoxygenation injury in isolated hepatocytes: Cell death precedes conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 155: 278-282, 1988.
- 33- Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem.* 192:245-261, 1990.
- 34- Gyenes M, De Groot H. Prostanoid release by Kupffer cells upon hypoxia-reoxygenation: role of pHi and Ca^{2+} . *Am J Physiol.* 264: G535-G540, 1993.
- 35- De Groot H. Isolated cells in the study of the molecular mechanisms of reperfusion injury. *Toxicol Lett.* 63: 111-125, 1992.
- 36- Inauen W, Granger DN, Meininger CJ, Schelling ME, Granger HJ, Kvietys PR. Anoxia-reoxygenation-induced, neutrophil-mediated endothelial cell injury: Role of elastase. *Am J Physiol.* 259:G925-931, 1990.
- 37- Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *New Engl J Med.* 320:365-376, 1989.
- 38- Gores GJ, Nieminen AL, Fleishman KE, Dawson TL, Herman B, Lemasters JJ. Extracellular acidosis delays onset of cell death in ATP-depleted hepatocytes. *Am J Physiol.* 255: C315-C322, 1988.
- 39- Currin RT, Gores GJ, Thurman RG, Lemasters JJ. Protection by acidotic pH against anoxic cell killing in perfused rat liver: Evidence for a "pH paradox". *FASEB J.* 5:207-210, 1991.
- 40- Gores GJ, Nieminen AL, Wray BE, Herman B, Lemasters JJ. Intracellular pH during "chemical hypoxia" in cultured rat hepatocytes: Protection by intracellular acidosis against the onset of cell death. *J Clin Invest.* 83: 386-396, 1989.
- 41- Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 9220-9225, 1998.
- 42- Szabo C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation and ischemia-reperfusion injury. *Shock.* 6:79-88, 1996.

- 43- Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* 268:12231-12234, 1993.
- 44- Kerr JFR. Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular death. *J Pathol.* 105: 13-20, 1971.
- 45- Kerr JFR., Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26: 239-257, 1972.
- 46- Cohen JJ. Apoptosis: Mechanism of life and death in the immune system. *J Allergy Clin Immunol.* 130: 548-554, 1999.
- 47- Starling WH, Klingholz R. Supranucleosomal structure of chromatin: Digestion by calcium/magnesium endonuclease proceeds via a discrete size class of particles with elevated stability. *Biochemistry.* 20: 1386-1392, 1981.
- 48- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 391:43-50, 1998.
- 49- Bortner CD, Cidlowski JA. Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes. *Am J Physiol.* 271:C950-961, 1996.
- 50- Costero I, Pomerat CM. Cultivation of neurons from the adult human cerebral and cerebellar cortex. *Am J Anat.* 89:405-468, 1951.
- 51- Godman GC, Miranda AF, Deich AD, Tanenbaum SW. Action of cytochalasin D on cells of established lines. III. Zeiosis and the movements of the cell surface. *J Cell Biol.* 64:644-667, 1975.
- 52- Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 4386-4391, 1998.
- 53- Squier MK, Miller AC, Malkinson AM, Cohen JJ. Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol.* 159: 229-237, 1994.
- 54- Squier MK, Cohen JJ. Calpain, an upstream regulator of thymocyte apoptosis. *J Immunol.* 158:3690-3697, 1997.

- 55- Yin T, Sandhu G, Wolfgang CD, Burrier A, Webb RL, Rigel DF, Hai T, Whelan J. Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfusion heart and kidney. *J Biol Chem.* 273: 19943-19950, 1997.
- 56- Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, Marumo F, Hiroe M. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res.* 75:426-433, 1994.
- 57- Bromme HJ, Holtz J. Apoptosis in the heart: When and why ? *Mol Cell Biochem.* 163-164:261-275, 1996.
- 58- Fellman V, Raivio KO. Reperfusion injury as the mechanism of brain damage after perinatal asphyxia. *Pediatr Res.* 41: 599-606, 1997.
- 59- Vexler ZS, Roberts TP, Bollen AW, Derugin N, Arieff AI. Transient cerebral ischemia. Association of apoptosis induction with hypoperfusion. *J Clin Invest.* 99:1453-1459, 1997.
- 60- Borghi-Scoazec G, Scoazec JY, Durand F, Bernuau J, Belghiti J, Feldmann G, Henin D, Degott C. Apoptosis after ischemia-reperfusion in human liver allograft. *Liver Transpl Surg* 3:407-415, 1997.
- 61- Sasaki H, Matsuno T, Ishikawa T, Ishine N, Sadamori H, Yagi T, Tanaka N. Activation of apoptosis during early phase of reperfusion after liver transplantation. *Transplant Proc* 29:406-407, 1997.
- 62- Leist M, Gantner F, Jilg S, Wendel A. Activation of the 55 kDa TNF receptor is necessary and sufficient for TNF-induced liver failure, hepatocyte apoptosis, and nitrite release. *J Immunol.* 154: 1307-1316, 1995.
- 63- Motoyama S, Minamiya Y, Saito S, Saito R, Matsuzaki I, Abo S, Inaba H, Enomoto K, Kitamura M. Hydrogen peroxide derived from hepatocytes induced sinusoidal endothelial cell apoptosis in perfused hypoxic rat liver. *Gastroenterol.* 144:153-163, 1998.
- 64- Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science.* 274:1672-1677, 1996.
- 65- Gould KL. Protein kinases. Woodget JR (eds), ch.5. IRL Press, Oxford, pp 149-176, 1995.

- 66- Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell*. 73:1059-1065, 1993.
- 67- Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev*. 7:812-821, 1993.
- 68- Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature*. 374:131-134, 1995.
- 69- Pines J. Cyclins and cyclin-dependent kinases, a biochemical review. *Biochem J*. 308:697-711, 1995.
- 70- Yang ZY, Perkins ND, Ohno T, Nabel EG, Nabel GJ. The p21 cyclin-dependent kinase inhibitor suppresses tumorigenicity in vivo. *Nat Med*. 1:1052-1056, 1995.
- 71- Riaux-V, Meijer L. A new screening test for antimitotic compounds using the universal M phase-specific protein kinase, p34cdc2/cyclin Bcdc13, affinity-immobilized on p13suc1-coated microtitration plates. *Anticancer Res*. 11:1581-1590,1991.
- 72- Gadbois DM, Hamaguchi JR, Swank RA, Bradbury EM. Staurosporine is a potent inhibitor of p34cdc2 and p34cdc2-like kinases. *Biochem Biophys Res Commun*.184:80-85,1992.
- 73- Kitagawa M, Okabe T, Ogino H, Matsumoto H, Suzuki-Takahashi I, Kokubo T, Higashi H, Saitoh S, Taya Y, Yasuda H, Ohba Y, Nishimura S, Tanaka N, Okuyama A. Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase. *Oncogene*. 8:2425-2432,1993.
- 74- Kitagawa M, Higashi H, Suzuki-Takahashi I, Okabe T, Ogino H, Taya Y, Nishimura S, Okuyama A. A cyclin-dependent kinase inhibitor, butyrolactone I, inhibits phosphorylation of RB protein and cell cycle progression. *Oncogene*. 9:2549-2557,1994.
- 75- Someya A, Tanaka N, Okuyama A. Inhibition of cell cycle oscillation of DNA replication by a selective inhibitor of the cdc2 kinase family, butyrolactone I, in *Xenopus* egg extracts. *Biochem Biophys Res Commun*.198:536-545,1994.
- 76- Kaur G, Stetler-Stevenson M, Sebers S, Worland P, Sedlacek H, Myers C, Czech J, Naik R, Sausville E. Growth inhibition with reversible cell

- cycle arrest of carcinoma cells by flavone L86-8275. *J Natl Cancer Inst.* 84:1736-1740,1992.
- 77- Worland PJ, Kaur G, Stetler-Stevenson M, Sebers S, Sartor O, Sausville EA. Alteration of the phosphorylation state of p34cdc2 kinase by the flavone L86-8275 in breast carcinoma cells. Correlation with decreased H1 kinase activity. *Biochem Pharmacol.* 46:1831-1840,1993.
- 78- Losiewicz MD, Carlson ba, Kaur G, Sausville EA, Worland PJ. Potent inhibition of CDC2 kinase activity by the flavonoid L86-8275. *Biochem Biophys Res Commun.*201:589-595,1994.
- 79- Bojanowski K, Nishio K, Fukuda M, Larsen AK, Saijo N. Effect of suramin on p34cdc2 kinase in vitro and in extracts from human H69 cells: evidence for a double mechanism of action. *Biochem Biophys Res Commun.*203:1574-1580,1994.
- 80- Parker CW, Entsch B, Letham DS. *Phytochemistry.* 25:303-310,1986.
- 81- Glab N, Labidi H, Qin L-X, Trehin C, Bergounioux C, Meijer L. Olomoucine, an inhibitor of the cdc2/cdk2 kinases activity, blocks plant cells at the G1 to S and G2 to M cell cycle transitions. *FEBS Lett.* 353:207-214, 1994.
- 82- Vesely J, Havlicek L, Strnad M, Blow JJ, Donella-Deana A, Pinna L, Letham DS, Kato JY, Detivaud L, Leclerc S, Meijer L. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem.* 224:771-786,1994.
- 83- Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, Wyllie AH. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature.* 362:849-852, 1993.
- 84- Yonish-Rouach E, Grunwald S, Wilder S, Kimchi A, May E, Lawrence JJ, May P, Oren M. p53-mediated cell death: relationship to cell cycle control. *Mol Cell Biol.* 13:1415-1423, 1993.
- 85- Allday MJ, Inman GJ, Crawford DH, Farren PJ. DNA damage in human B cells can induce apoptosis, proceeding from G1/S when p53 is transactivation competent and G2/M when it is transactivation defective. *EMBO J.* 14:4994-5005, 1995.

- 86- Ongkeko W, Ferguson DJP, Harris AL, Norbury C. Inactivation of Cdc2 increases the level of apoptosis induced by DNA damage. *J Cell Sci.* 108:2897-2904, 1995.
- 87- Arguello F, Alexander M, Sterry JA, Tudor G, Smith EM, Kalavar NT, Greene JF, Koss WJr, Morgan CD, Stinson SF, Siford TJ, Alvord WG, Kalabansky RL, Sausville EA. Flavopiridol induces apoptosis of normal lymphoid cells, causes immunosuppression, and has potent antitumor activity in-vivo against human leukemia and lymphoma Xenografts. *Blood.* 91: 2482-2490, 1998.
- 88- Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong JP, Blow JJ, Inagaki N, Inagaki M, Delcros JG, Moulinoux JP. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem.* 243: 527-536, 1997.
- 89- Pippin JW, Qu Q, Meijer L, Shankland SJ. Direct in vivo inhibition of nuclear cell cycle cascade in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis with roscovitine, a novel cyclin dependent kinase antagonist. *J Clin Invest.* 100: 2512-2520, 1997.
- 90- Humbel RE. Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem.* 190:445-462, 1990.
- 91- Hofert JF, Goldstein S, Philips LS. Nutrition and somatomedin XXVII. Total and free IGF-I and IGF binding proteins in rats with streptozocin-induced diabetes. *Metabolism.* 38:594-600, 1989.
- 92- Bach MA, Chin E, Bondy CA. The effects of subcutaneous insulin-like growth factor-I infusion in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 79:1040-1045, 1994.
- 93- Blair LA, Marshall J. IGF-1 modulates N and L calcium channels in a PI 3-kinase dependent manner. *Neuron.* 19: 421-429, 1997.
- 94- Blair LA, Bence-Hanulec KK, Mehta S, Franke T, Kaplan D, Marshall J. Akt-dependent potentiation of L channels by insulin-like growth factor-1 is required for neuronal survival. *J Neurosci.* 19: 1940-1951, 1999.
- 95- Yu H, Berkel H. Insulin like growth factor and cancer. *J La State Med Soc.* 151: 218-223, 1999.

- 96- Li Q, Li B, Wang X, Leri A, Jana KP, Liu Y, Kajstura J, et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest.* 100: 1991-1999, 1997.
- 97- Bhat RV, Engber TM, Zhu Y, Miller SM, Contreras PC. Identification of insulin-like growth factor binding protein-2 as a biochemical surrogate marker for the in vivo effects of recombinant human insulin-like growth factor-1 in mice. *J Pharmacol Experiment Ther.* 281: 522-530, 1997.
- 98- Bradford LU, Marotto M, Lemasters JJ, Thurman RG. New, simple models to evaluate zone-specific damage due to hypoxia in the perfused rat liver: time course and effect of nutritional state. *J Pharmacol Experiment Ther.* 236: 263-268, 1986.
- 99- Belinsky SA, Popp JA, Kaufmann FC, Thurman RG. Trypan blue uptake as a new method to investigate hepatotoxicity in periportal and pericentral regions of the liver lobule: Studies with allyl alcohol in the perfused liver. *J Pharmacol Experiment Ther.* 230: 755-760, 1984.
- 100- Leers MPG, Kölgen W, Björklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Björklund P, et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol.* 187: 567-572, 1999.
- 101- Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Annal Biochem.* 132:345-352, 1983.
- 102- Demirpençe E, Köksoy C, Kuzu A, Kılınç K. A spectrophotometric assay for tissue-associated myeloperoxidase activity and its application to intestinal ischemia-reperfusion. *27:197-200, 1997.*
- 103- Suematsu M, Suzuki H, Ishii H, Kato S, Yanagisawa T, Asako H, Suzuki M, et al. Early midzonal oxidative stress preceding cell death in hypoperfused rat liver. *Gastroenterology.* 103: 994-1001, 1992.
- 104- Topaloğlu S, Abbasoğlu O, Ayhan A, Sökmensüer C, Kılınç K, Sayek İ. İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 ve roskovitinin sıçan karaciğerinde

iskemi reperfüzyon hasarına etkisi. Organ Nakli Kuruluşları Koordinasyon Derneği Kongresi Özetler Kitabı. S-33, 2000.

- 105- Jungermann K, Katz N. Functional hepatocellular heterogeneity. *Hepatology*. 2: 385-395, 1982.
- 106- Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology : analysis of apoptosis and accidental cell death(necrosis). *Cytometry*. 27: 1-20, 1997.
- 107- Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res*. 53: 1945-1951, 1993.
- 108- Engeland M, van Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. 31: 1-9, 1998.