

T.C.
Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

**CeO₂ NANOPARTİKÜLLERİNİN İSKEMİK
KARACİĞER HASARINDA İZLENEN İNFLAMATUAR
SÜREÇLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

DR. AKİLE ZENGİN
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. MUSTAFA CEM ALGIN
KÜTAHYA–2017

T.C.
Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

**CeO₂ NANOPARTİKÜLLERİNİN İSKEMİK
KARACİĞER HASARINDA İZLENEN İNFLAMATUAR
SÜREÇLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

DR. AKİLE ZENGİN
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. MUSTAFA CEM ALGIN
KÜTAHYA-2017

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜRLER.....	ii
KISALTMALAR.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	4
GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
BULGULAR.....	20
TARTIŞMA.....	32
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR.....	38

TEŞEKKÜRLER

Asistanlık eğitimim boyunca sundukları bilimsel, destekleyici ve verimli ortam için başta ana bilim dalı başkanımız ve aynı zamanda tez danışmanım olan Sayın Prof. Dr. Mustafa Cem Algın'a ve diğer ana bilim dalı öğretim üyelerimize çok teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum çalışma arkadaşım Dr.Bercis İmge Uçar'a ve uzman ağabeylerime; kliniğimiz hemşire ve çalışanlarına; bana ablalık ve ağabeylik yapan ameliyathane hemşirelerimize; her “vakamız var” değişimde beni kırmayıp yardımlarını esirgemeyen başta Uz. Dr. Cevher Ünsal olmak üzere tüm anestezi ekibimize; tez çalışmalarımda bana gösterdikleri sonsuz destek için Sayın Prof. Dr. Gülberk Uçar ve Dr. Bio. Açelya Erikçi'ye; zorlu eğitim ve meslek yaşantımda bana gösterdikleri sevgi, destek ve anlayış ile her zaman yanımda olan canım annem Ayşe Zengin'e, babam Nurullah Zengin'e, kardeşim Uğur Zengin'e ve ailemizin yeni üyesi Gönül Zengin'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

Dr. Akile Zengin

Kütahya, 2017

KISALTMALAR

İR:	İskemi reperfüzyon
ATP:	Adenozin 5'-trifosfat
Na ⁺ /K ⁺ ATPaz :	Sodyum/Potasyum ATPaz
SOR:	Serbest oksijen radikalleri
PMNL:	Polimorf nüveli lökositler
CeO ₂ :	Seryum dioksit
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
NADP:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
LDH:	Plazma laktat dehidrogenaz
GSH:	Redükte glutatyon
GSSG:	Okside glutatyon
MPO:	Myeloperoksidaz
NO:	Nitrik oksit
SOD:	Süperoksit dismutaz
LDH:	Plazma laktat dehidrogenaz
ALT:	Alanin aminotransferaz
AST:	Aspartat aminotransferaz
KC:	Karaciğer
ET:	Endotelin
PAF:	Platelet aktive edici faktör
LT:	Lökotrienler
ENA-78:	Protein-78 A
INF-γ:	İnterferon gamma
MCP:	Monosit kemoatraktan protein

VCAM 1:	Vasküler hücre adhezyon molekülü 1
ICAM 1:	İntersellüler adhezyon molekülü 1
E selektin:	Endotelyal selektin
P selektin:	Platelet kaynaklı selektin
MCP 1:	Monosit kemoatraktan protein 1
cGMP:	Siklik guanozin monofosfat
i.p.:	İntraperitoneal
o.g.:	Oral gavaj
MDA:	Malondialdehid
GST:	Glutatyon S transferaz
GPx:	Glutatyon peroksidaz
GR:	Glutatyon redüktaz
MMP-2:	Matrix metallopeptidaz-2
MMP-9:	Matrix metallopeptidaz-9
H&E:	Hematoksilen-eozin
PAS:	Periodik Asit Schiff
HO-1:	hemoksijenaz-1
TNB:	5-tiyo-2-nitrobenzoik asit
DTNB:	5,5 dithiobis 2-nitrobenzoik asit

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1.** Karaciğer İR hasarının fizyopatolojisi
- Şekil 2.** İskemi reperfüzyon hasarında sitokin ağ
- Şekil 3.** Karaciğerde uygulanan kısmi İR protokolünün şematik gösterimi
- Şekil 4.** Karaciğerde uygulanan kısmi İR protokolünün fotografik gösterimi
- Şekil 5.** Çalışma gruplarında plazma AST ve ALT düzeyleri
- Şekil 6.** Çalışma gruplarında plazma LDH düzeyleri
- Şekil 7.** Çalışma gruplarında MDA düzeyleri
- Şekil 8.** Çalışma gruplarında GSH ve GSSG Düzeyleri
- Şekil 9.** Çalışma gruplarında GST, GR, GPx, SOD ve Katalaz aktiviteleri
- Şekil 10.** Çalışma gruplarında MPO aktiviteleri
- Şekil 11.** Çalışma gruplarında plazma TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17 ve IFN- γ düzeyleri
- Şekil 12.** Çalışma gruplarında MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri
- Şekil 13.** Çalışma gruplarında ışık mikroskopi görüntüleri

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Çalışma grupları



ÖZET

CeO₂ NANOPARTİKÜLLERİNİN İSKEMİK KARACİĞER HASARINDA İZLENEN İNFLAMATUAR SÜREÇLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

AMAÇ: Bu çalışmada, fare karaciğer iskemi reperfüzyon (İR) modeli öncesinde uygulanan antiinflamatuvar özellikteki seryum dioksit (CeO₂) nanopartiküllerinin iskemik karaciğer hasarında izlenen inflamatuvar süreçler üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

YÖNTEM: Çalışmada kullanılan fare deney grupları, kontrol, sham, İR, çalışma grubu i.p (CeO₂ nanopartiküllerin intraperitoneal uygulandığı) ve çalışma grubu o.g (CeO₂ grubu nanopartiküllerinin oral gavaj yoluyla uygulandığı) olmak üzere 5 gruba (n=6) ayrılmıştır. İR hasarının saptanmasında plazma laktat dehidrogenaz (LDH), transaminaz (ALT, AST) düzeyleri tayin edildi. Karaciğer doku örneklerinde lipid peroksidasyonu, redükte ve okside glutatyon (GSH ve GSSG) düzeyleri, antioksidan enzim (katalaz, glutatyon-S transferaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz) aktiviteleri ve nötrofil infiltrasyonunun parametresi olarak myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi tayin edildi. İR ile indüklendiği öne sürülen proinflamatuvar sitokin/kemokinlerin (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ) ve matriks metaloproteinazlarının (MMP-2 ve MMP-9) plazma düzeyleri belirlendi.

BULGULAR: İR hasarı oluşturulan grupta kontrol ve sham gruplarıyla karşılaştırıldığında plazma LDH, AST ve ALT aktivitelerinde, doku lipid peroksidasyonunda ve doku MPO aktivitesinde artış; doku GSH düzeyinde düşüş, doku GSSG düzeyinde artış, doku antioksidan enzim düzeylerinde azalma; plazma prositokin ve kemokin düzeylerinde ve MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinde artış gözlemlendi. İR protokolünden 24 saat önce CeO₂ nanopartiküllerinin i.p. ve o.g. yolu ile uygulanmasının, çalışma gruplarında plazma LDH, AST ve ALT aktivitelerinde, doku lipid peroksidasyonunda ve MPO aktivitesinde azalmaya; doku GSH düzeyinde artışa, doku GSSG düzeyinde düşüşe; doku antioksidan enzim düzeylerinde artışa; plazma prositokin ve kemokin düzeylerinde ve plazma MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinde düşüşe neden olduğu saptandı (p<0.001). CeO₂ nanopartiküllerinin

uygulama yolunun, ölçülen parametrelerin düzeyleri açısından istatistiksel olarak bir fark göstermediği saptandı.

SONUÇ: Bu çalışmada elde edilen veriler, CeO₂ nanopartiküllerinin İR hasarını önlemede ümit verici bir terapötik ajan olabileceğini önermektedir.

Anahtar Kelimeler: İskemi reperfüzyon hasarı, CeO₂ nanopartikülleri, karaciğer, fare, inflamasyon



ABSTRACT

EFFECTS OF CeO₂ NANOPARTICLES ON INFLAMMATORY PROCESSES DURING ISCHEMIC HEPATIC INJURY

OBJECTIVE: Present study aimed to evaluate the protective effects of anti-inflammatory cerium dioxide (CeO₂) nanoparticles administered prior to the experimental hepatic ischemia-reperfusion model in mice on the inflammatory processes observed in ischemic hepatic injury.

MATERIALS AND METHODS: Animals were divided into 5 groups (n=6) as control, sham, IR, intraperitoneally administered of CeO₂ nanoparticles (i.p.) and orally administered of CeO₂ nanoparticles (o.g). Plasma levels of lactate dehydrogenase (LDH) and transaminases (ALT, AST) were determined as the indices of hepatic injury. Lipid peroxidation, reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione levels, antioxidant enzyme (catalase, glutathione-S transferase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase) activities and myeloperoxidase (MPO) activity, as the indicator of neutrophil infiltration, were measured in liver tissue samples. Plasma levels of proinflammatory cytokines/chemokines (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ) and matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) were determined.

RESULTS: Plasma LDH, AST, and ALT activities, tissue MPO activity and tissue lipid peroxidation were found to be elevated in IR group when compared with those of control and sham groups. In this group, it was found that tissue GSH level and antioxidant enzyme activities were decreased, GSSG level was increased, plasma cytokine/chemokine, MMP-2 and MMP-9 levels were increased. I.p. and o.g. administrations of CeO₂ both were resulted in significant decreases in plasma LDH, AST and ALT levels, tissue lipid peroxidation and MPO activity; significant increases in tissue antioxidant enzyme activities, plasma procytokine/chemokine, MMP-2 and MMP-9 levels (p<0.001). The route of administration of CeO₂ nanoparticles caused no statistically significant difference for the levels of the parameters tested.

CONCLUSION: The present data suggest that CeO₂ nanoparticles may be introduced as a promising therapeutic agent for the prevention of liver IR injury.

Key Words: Ischemia-reperfusion injury, CeO₂ nanoparticles, liver, mouse, inflammation.



I. GİRİŞ ve AMAÇ:

İskemi; bir organ ya da dokuyu perfüze eden kan akımındaki yetersizliğe bağlı gelişen, geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olabilen hücre ya da doku zedelenmesidir (1). İskemik dokunun tekrar kanlanmasına reperfüzyon denilir. Enerji gereksiniminin geri kazanılması ve toksik artıkların ortamdaki uzaklaştırmak için gereklidir. Fakat iskemi sırasında oluşmuş toksik artıkların ve çeşitli inflamatuvar mediatörlerin sistemik dolaşıma verilmesiyle ciddi metabolik bozukluklar oluşabilir. Bu şekilde reperfüzyon daha ileri bir doku hasarına yol açabilir (2). İskemi reperfüzyon (İR) ise doku ya da organa giden kan akımındaki bir sürelik azalma ya da kesilme sonrasında yeniden kanlanma olarak tanımlanır (3).

İskemik dönemde hücrede metabolik ve yapısal değişiklikler oluşur. Dokuya gelen kan akımının kesilmesiyle hücrede oksidatif fosforilasyon azalır. Buna bağlı adenosin 5'-trifosfat (ATP) ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfatların sentezi azalır. Hücrede enerji depolarının boşalmasıyla hücre zarında bulunan Na^+/K^+ ATPaz pompası inhibe olur. Sonuçta hücre içinde sodyum ve kalsiyum iyon konsantrasyonları artar. Hücre içinde kalsiyum iyon konsantrasyonundaki artış hücre için sitotoksiktir (4). Bu durumda sodyum ve su hücreye serbestçe girebilir, endoplazmik retikulumun genişlemesi sonucu hücre şişer. Bu genişleme ribozomlarla endoplazmik retikulumun arasındaki bağlantıyı keser. Bu da protein sentezinin azalması ile sonuçlanır. Hücre, artmış sodyum ve su konsantrasyonu ile azalmış potasyum konsantrasyonu sonucu önemli ölçüde şişer (5). İskemik periyod süresince dokuda toksik serbest oksijen radikalleri (SOR) üretilir. Reperfüzyon sırasında SOR ve süperoksit radikallerinin endotelial hasar, artmış mikrovasküler permeabilite ve doku ödeme neden olduğunu belirten yayınlar mevcuttur (3). Hücre ölümü başladığında hepatositler, endotel hücreleri ve Kupffer hücreleri adhezyon molekülleri ve kemokinleri salgılamaya başlar, buna karşılık antioksidan enzimlerin oluşumunda azalma olur. Bu şekilde nötrofiller hasara uğrar ve doku hasarı artar (5, 6). Aktive olan adhezyon kuvvet molekülleri ve sitokinlerin sistemik inflamatuvar yanıtı başlatması İR hasarı olarak adlandırılır (4).

İR hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bunlar birbiriyle ilişkileri karmaşık, hücrel ve humoral olaylar şeklindedir. SOR, polimorf nüveli lökositler (PMNL), kompleman sistemi ve endotel hücreleri olmak üzere başlıca dört faktörün hasar nedenleri arasında yer aldığı belirtilmektedir (6).Hasarda esas rolde SOR olduğuna dair görüşler mevcuttur (7). Karaciğer ile ilgili cerrahi girişimler ve karaciğer transplantasyonu gibi durumlarda geçici olarak kan akımının durması ile iskemi, kan dolaşımının tekrar sağlanması ile reperfüzyon oluşmaktadır. Bu durumlarda gelişen iskemi reperfüzyon hasarı mortalite ve morbiditenin asıl sebeplerindedir (8, 9). Serbest radikallerin zararlı etkileri bazı maddeler tarafından azaltılabilir. Hücre içinde oksijenin metabolize edildiği her yerde, antioksidanlar oksijen ara metabolitlerini azaltmak için çalışırlar. Antioksidan savunmada öncelikle etki edenler enzimatik antioksidanlardır. Bunlar glutatyon reduktaz, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimlerdir (10).

Nanoteknoloji alanındaki son gelişmeler SOR'u etkili şekilde parçalayabilen ve antiinflamatuvar etki gösteren umut vaadedici bileşikler sunmaktadır. Bunlar arasından seryum dioksit (CeO_2) nanopartikülleri, biyomedikal alanda oksidatif stres ve inflamasyon içeren patolojilerin tedavisinde kullanılmaktadır (11). CeO_2 nanopartiküllerinin SOD ve katalaz gibi davrandığını gösteren çalışmalar mevcuttur (12). Ayrıca, CeO_2 nanopartikülü makrofajlar içindeki SOR düzeyini azaltır (13). CeO_2 nanopartikülü oksijen sensörleri ve otomotiv sanayiinde katalitik konverter gibi endüstriyel aplikasyonlarda kullanılmakla birlikte, son yıllarda yapılan biyolojik sistem modellerinde oksidatif stresi azaltmada etkili olduğu bildirilmiştir. Bu geniş kullanım alanlarına bağlı olarak çevresel ve inhalasyona maruz kalma sonucu insanlar üzerinde oluşan etkileri henüz açığa kavuşturulamamakla birlikte; son yıllarda yapılan çalışmalar CeO_2 'nin güçlü bir antioksidan olarak hücreleri ultraviyole ışıklardan ve gama radyasyon ışınlarından koruduğu ve kök hücre kültürlerindeki proliferasyonu uyardığı gösterilmiştir (14, 15) CeO_2 nanopartikülü, iskemik beyin hasarına bağlı inme ve diğer oksidatif rahatsızlıklarda yeni bir tedavi modeli olarak öne çıkmaktadır (16). CeO_2 'nin hipokampal nöronal hücre dizisini oksidatif stresten koruduğu ve iskemik kardiyomyopatiye NO ve peroksinitrit düzeyini azalttığı

gösterilmiştir (16). Radyoterapiden 24 saat önce verilen CeO₂'nin SOR düzeyini azalttığını belirtmişlerdir (17). CeO₂ nanopartikülüne maruziyetin hepatik hasarını önlediğine dair yayınlar mevcuttur (11, 18).

Bu çalışmada fare karaciğer iskemi reperfüzyon modeli öncesinde uygulanan antiinflamatuvar özellikteki CeO₂ nanopartiküllerin iskemik karaciğer hasarında izlenen inflamatuvar süreçler üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

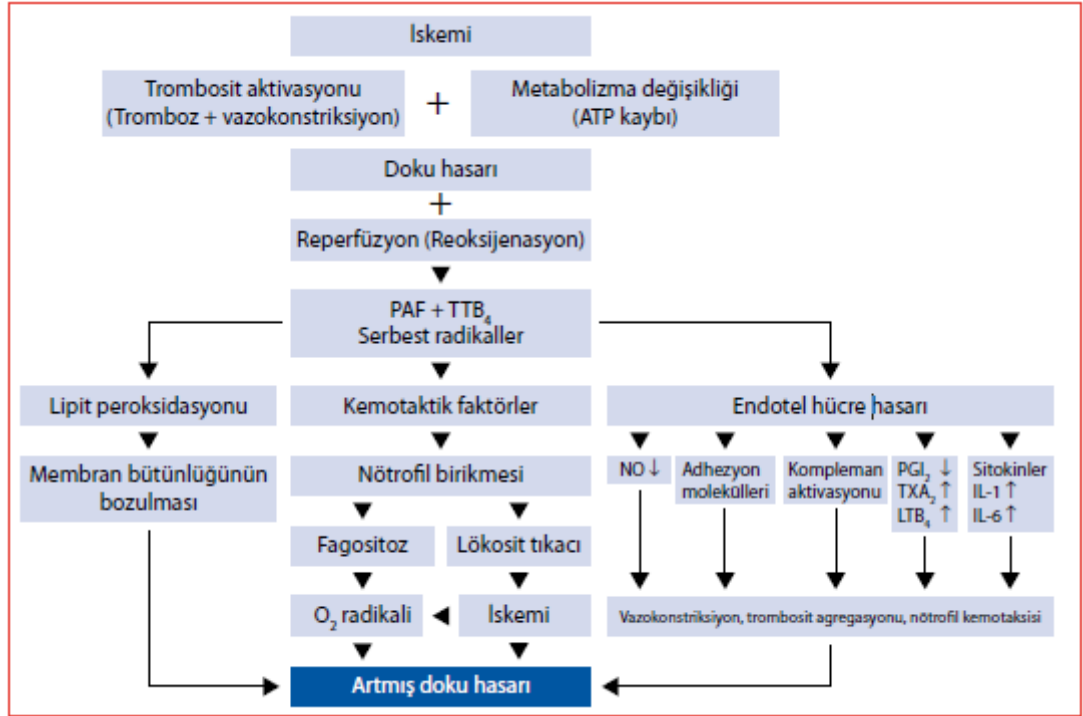


II. GENEL BİLGİLER:

A. Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı:

Karaciğerde İR hasarı ilk kez 1975 yılında Toledo Pereyra (19) ve arkadaşlarının deneysel olarak gerçekleştirdikleri karaciğer naklinde görülmüştür. Nakledilen karaciğerde konjesyon, ilerleyen tarzda trombozis, organ yetmezliği ile sonuçlanan greft nekrozu gelişmiştir. İR hasarı, hipoksik organın tekrar oksijenlenmesinden sonra ortaya çıkan hasarlanmaya denilmektedir (4). İskemi sırasında hücre membranında bulunan Na^+/K^+ ATPaz pompasının çalışması için gerekli olan enerji sağlanamaz. Potasyum iyonları hücre dışına çıkarken sodyum ve klor iyonları hücre içine girerler. Anaerobik glikolizle ATP üretilmeye çalışılır, sonuçta laktik asit üretilmektedir. Karbondioksitin birikimi karbonik asit üretimi ile sonuçlanır, böylelikle asidoz artmaktadır (20). Anaerobik glikoliz ve ATP hidrolizi nedeni ile pH düşer. Oluşan metabolik asidoz hepatositlerde hücre ölümünün başlamasına karşı koruyucu görev görür. İskemik olan hücrelerdeki pH'nın reperfüzyonla beraber normale dönmesi pH bağımlı proteaz ve fosfolipazları aktive eder, sonuçta hücre ölümüne sebebiyet verir. Bu durum pH paradoksu olarak bilinmektedir. ATP bağımlı çalışan kalsiyum pompası ise ekstrasellüler ve intrasellüler kalsiyumu dengede tutmaktadır. Kalsiyum hücre ölümünde yapısal değişikliklerin esas mediatörüdür. İntrasellüler kalsiyum artışı ile proteolitik enzimler ve fosfolipazlar aktive olmaktadır (9, 21) Fosfolipazların aktivasyonu ile araşidonik asit oluşur. Araşidonik asit direkt etkiyle mitokondriyal enzimleri inhibe ederek SOR oluşumunu arttırır. Eğer hipoksi devam ederse mitokondri fonksiyonları azalır. Bu bozuklukların tümü oksijen verildiğinde geri dönüşlüdür. Uzamış hipoksi; membran potansiyeli, iyon geçişi ve endotel hücrelerin yapısını bozmakta ve intrasellüler hacmi artırmaktadır (21). Erken dönemde endotel hücrelerinin şişmesi, vazokonstrüksiyon, PMNL birikimi, sinüzoidlerde trombosit birikimi olur ve mikrodolaşım bozulur. İntrasellüler ödem nedeniyle, sinüzoidal endotel hücreler ve kupffer hücresinde şişme meydana gelir. Vazokonstrüksiyon, nitrik oksit (NO) ve endotelin (ET) dengesindeki bozulma sonucu ortaya çıkar. ET oldukça güçlü bir vazokonstriktördür. Reperfüzyonun erken döneminde, ET plazma ve KC

parankiminde artarken NO miktarı düşer. İR hasarının reperfüzyon boyunca NO ve ET arasındaki denge bozukluğunun bir sonucu olduğu düşünülmektedir (3, 22). İR hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Nedenleri arasında SOR, PMNL, kompleman sistemi, endotel hücreleri olmak üzere başlıca dört faktör yer almaktadır. (Şekil 1) Birçok çalışma reperfüzyon hasarının başlamasından büyük ölçüde ksantinoksidaz bağımlı süperoksitin sorumlu olduğunu göstermiştir. İskemi sırasında ksantinoksidaz enziminin sentezi, etkinliği ve substratları artar ve enzim reperfüzyon sırasında dokuda konsantrasyonu birden artan oksijeni aşırı miktarda süperoksit anyonuna dönüştürür. Deneysel olarak serbest oksijen radikallerinin İR hasarındaki etkisini önlemede ksantinoksidaz inhibitörleri ve birçok serbest oksijen radikali temizleyicilerinin etkinliği gösterilmiştir (6). Poliansatüre yağ asitleri hücre membranlarında yüksek konsantrasyonda bulunur ve radikallere çok duyarlıdırlar. SOR poliansatüre yağ asitleri ile reaksiyona girerek hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna yol açar. Dolaylı olarak radikallerle etkilenmiş dokuda nötrofil birikimi oluşur ve ciddi mukozal lezyona yol açan inflamatuvar süreci başlatır (23). Şekil 1’de karaciğer İR hasarının fizyopatolojisi gösterilmiştir (6).



Şekil 1. Karaciğer İR hasarının fizyopatolojisi (6).

Karaciğere gelen kanın %70–80'i portal venden, geri kalan kısmı hepatik arterden gelmektedir. Karaciğerin dolaşım sistemindeki yeri, metabolitlerin biriktirilip taşınması, toksik maddelerin nötralize ve elimine edilmesi için oldukça uygundur (24). Portal ven ve hepatik arterden gelen kan desteği ve glikojen depolarının yüksek anaerobik metabolizma kapasitesine rağmen karaciğerde hipoksik hasarlanma meydana gelebilmektedir. Portahepatisin çapraz klemplenmesiyle hepatik arter ve portal venin oklüzyonu "Pringle manevrası" olarak adlandırılır. Elektif şartlarda yapılan karaciğer rezeksiyonlarında, portal triad klempleme süresinin 90 dakikaya kadar uzatılabileceği kabul edilir. İskeminin 90. dakikasından sonra karaciğerde geri dönüşümsüz değişikliklerin meydana geldiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir(23). Karaciğer iskemisi nakil cerrahisi, travma, malignite, safra yolu darlıkları nedeniyle opere edilen hastalarda, ayrıca cerrahi girişim olmadan hemodinamik veya kardiyojenik şok sonrasında oluşabilmektedir (25). Karaciğerde İR hasarı iki fazda meydana gelmektedir. Erken faz ilk 2 saatlik kısmı kapsamaktadır. Kalsiyum artışı ve SOR oluşumu etkilidir. Hücre içinde kalsiyum artışı, hepatosit hasarını başlatan erken mekanizmalardandır. İskeminin ardından reperfüzyonun hepatositlerdeki kalsiyum miktarını artırdığı gösterilmiştir. İskemi boyunca hücrede kalsiyum artışı saptanmazken reperfüzyon sırasında hızlı bir kalsiyum artışı görülmektedir. Geç faz 6 ile 48 saat arasını kapsamaktadır. Nötrofillerin, makrofajların, lenfositlerin ve trombositlerin karaciğere göçü ile inflamasyon yanıtı uyarılmaktadır. Hepatositlerdeki hasar SOR ve ekstrasellüler sitokinler ile meydana gelmektedir (26). Karaciğer İR hasarının erken fazında endotelial hücre şişmesi, vazokonstriksiyon, koagülasyon sisteminin aktivasyonu, trombosit agregasyonu ve lökosit infiltrasyonu sonucunda mikrosirkulasyonda bir yetersizlik görülür. Vazokonstriksiyon; NO ve ET dengesindeki bozulma sonucu ortaya çıkar. Sinüzoidal lümen daralır, sonrasında PMNL'nin dolaşım hızı yavaşlar. PMNL'nin endotel ile temas süresi artar ve böylece lökostazis gerçekleşir. Bu durumda sinüzoidal ağ dolaşımı engellenir. Bu durum hipoksiyi uzatır. Ardından kupffer hücreleri ve PMNL'ler aktive olur, inflamatuvar sitokinler ve SOR ortaya çıkar. Sonuçta hepatik hasar şiddetlenir (22). İR hasarı karakteristik olarak PMNL 'nin

aktivasyonuna, SOR'un ortaya çıkmasına, sitokinlerin salınımında artışa, eikasonoidlerin üretiminde artışa, kompleman sistemin aktivasyonuna neden olur (6).

A.1. PMNL rolü

MPO enzimi dokuda PMNL'ye özgü bir enzim olup, nötrofil düzeyinin tayininde kullanılır. İskemi reperfüzyon hasarında PMNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür (8). Bunlar, mikrovasküler oklüzyon, SOR salınması, sitotoksik enzim salınması, vasküler permeabilite artışı ve sitokin salınmasında artıştır (6). Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik antinötrofil serumlarla veya lökosit adhezyon moleküllerine karşı monoklonal antikolarla yapılan çalışmalarda reperfüzyonda mikrovasküler geçirgenlikteki artıştan başlıca nötrofillerin sorumlu olduğu gösterilmiştir. İR hasarı ile lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonu meydana gelir. Aynı zamanda PMNL SOR üretme kapasitesine de sahiptir. Biriken PMNL, içerdikleri nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz (NADPH oksidaz) ve MPO enzimleriyle iskemik dokularda SOR artışına neden olur (9). NADPH oksidaz, nikotinamid adenin dinükleotit fosfatın (NADP) katalizörlük yaptığı bir reaksiyonla moleküler oksijeni redükte ederek süperoksit anyonu oluşturur. Oluşan süperoksit, SOD ve MPO ile reaksiyona girerek hidrojen peroksit, hidroksil radikali, hipoklorat ve N-kloramin gibi daha serbest oksijen radikallerini oluşturur. Sonuçta doku hasarının artmasına neden olur (27).

A.2.SOR rolü

İR hasarı serbest oksijen radikallerinin oluşumuyla başlar. 3 yoldan SOR oluşumu sağlanmaktadır. Bunlar, iskemi sırasında ksantin dehidrogenazın ksantinoksidaza dönmesi, NADPH oksidaz aktivasyonu, mitokondriyal elektron transport zincirinin ayrışmasıdır (8). İlk basamak hipoksi nedeniyle ATP yapımının durması, yıkım sırasında oluşan hipoksantin oksijen olmadığı için ürik aside indirgenememesi ve hücrede ksantin birikimidir. İkinci basamak iskemi sırasında büyük orandaki ksantin dehidrogenaz enzimin ksantin oksidaza çevrilmesidir.

Ksantinoksidaz enzimi oksijene direkt olarak elektron transferi yaparak süperoksitleri meydana getirir. Fazla miktardaki bu serbest oksijen radikalleri bütün hücrel makromoleküllerle reaksiyona girebilirler (4, 6). Serbest radikaller, normal metabolizma sırasında devamlı olarak üretilmektedir. Sonuçta membran fosfolipidlerinin peroksidasyonu, membran proteinlerinde, karbonhidrat ve DNA moleküllerinde çeşitli hasarlar meydana gelmektedir (9). Yapılan çalışmalarda ateroskleroz, kalp damar hastalıkları, İR hasarı, dolaşımşok hasarında, malignite, enfeksiyonlar, beyin ve deride dejeneratif oluşumlarda ve yaşlanma ile ilgili bazı hastalıklarda oksidatif hasarla ilgili bulgular saptandığı belirtilmiştir. İskemik dokunun reperfüzyonu bir taraftan iskemi sırasında kaybolan bazı fonksiyonların geri gelmesini sağlarken, diğer taraftan oksijen kaynaklı serbest radikallerin oluşumunu hızlandırarak daha ileri hasarlara yol açmaktadır. Bu SOR türevleri hücre zedelenmesinde membran lipid peroksidasyonu, nonperoksidatif mitokondriyal hasar, deoksiribonükleik asit hasarı ve proteinlerin çapraz bağları üzerine etki olmak üzere dört şekilde rol oynar (21). Serbest oksijen radikallerinin en başta gelenleri süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit, singlet oksijen ve hidroksil radikalleridir. En genel SOR kaynağı ise mitokondridir. Serbest oksijen radikalleri normalde antioksidan sistem tarafından yok edilmektedirler. Her zaman bu savunma mekanizmaları SOR üretimine karşı yeterli olamaz. Sonuçta oksidatif stres hali meydana gelir (5, 28). SOR; SOD, katalaz, glutatyon, E vitamini ve beta karoten gibi endojen antioksidanlar ile azaltılabilmektedir (9).

A.3. Sitokinlerin Rolü

Sitokinler karaciğerdeki İR hasarında antiinflamatuvar ve proinflamatuvar olmak üzere dual rol oynamaktadırlar.(şekil 3) Kupffer hücrelerinin aktivasyonu ile proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α , IL 1, IL 6, platelet aktive edici faktör (PAF) ve lökotrienler (LT) salınır. Yine aynı hücrelerden antiinflamatuvar mediatör olan prostoglandin, IL 10 ve IL 13 salınır. TNF- α aktive edilmiş kupffer hücreleri tarafından salgılanarak karaciğer dokusunu haraplar, parakrin etki ve endokrin sistem aracılığı ile uzak akciğer gibi uzak organları da etkilemektedir. Reperfüzyonda 30 dakika

A.4. Kompleman Sisteminin Rolü

Kompleman sistemi plazmada inaktif olan enzimlerin kademeli aktivasyonu ile inflamatuvar peptidlerin, opsoninlerin ve hücre zarı saldırı kompleksinin oluştuğu bir yoldur. Kompleman sisteminin aktivasyonu sonunda proinflamatuvar komponentler oluşur. Bunlar C3a, C5a, iC3b ve C5b-9'dur (8). C3a ve C5a anaflatoksindirler ve lökositleri aktive ederler. Lökosit aktivasyonu ve kemotaksisin uyarılmasına ek olarak C5a, makrofaj inflamatuvar protein-2 (MIP-2), MIP-1a, MIP-1b, monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1), TNF- α , IL 1 ve IL 6 üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı amplifiye eder. Kompleman tarafından sentezi uyarılan lökosit adhezyon molekülleri ise vasküler hücre adhezyon molekülü 1 (VCAM 1), intersellüler adhezyon molekülü 1 (ICAM 1), endotelial selektin (E selektin), platelet kaynaklı selektindir (P selektin). C5b9 endotelde IL 1a, IL 8 ve MCP 1 salgısını uyararak lökosit aktivasyonu ve kemotaksisi artırır. Aynı zamanda endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotelde siklik guanozin monofosfatı (cGMP) azaltarak vasküler tonusu bozmaktadır (6).

B. İskemi Reperfüzyon Hasarı Geri Dönüşü

İR hasarından sorumlu olduğu ve patofizyolojik mekanizmaları bloke edeceği düşünülen birçok karaciğer koruyucu ajan allopurinol, α -tokoferol, mannitol, dopamin, prostoglandin, aktive karbon hemoperfüzyonu, glukagon, melatonin, karnitin, klorpromazin, aprotonin, metilprednizolon, deferoksamin, siklosporin, katalaz, aspartik asit, ubiquinon, PAF antagonistleri, ATP, verapamil, nifedipin, SOD tanımlanmış ve bunların İR hasarı üzerine iyileştirici etkileri deneysel İR modellerinde araştırılmıştır (32, 33).

B.1. Antioksidanların İR Hasarı Geri Dönüşümündeki Rolü

Vücutta serbest radikallerin oluşumu ve bunların meydana getirdiği zararı önlemek için birçok mekanizma vardır. Bu mekanizmalar kısaca antioksidanlar

olarak bilinirler. Antioksidanlar serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek hücreleri hasara karşı korurlar (34).

Antioksidan savunma sistemi dört yolla etki göstermektedir:

- 1. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma, yok etme, "süpürücü etki". Antioksidan enzimler, küçük moleküller bu yolla etki gösterirler.*
- 2. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşim onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya "inaktif şekle dönüştürücü etki". Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.*
- 3. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller "zincir kırıcı etki" gösterirler.*
- 4. Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklinde "onarıcı etki" gösterirler (6) .*

Nanoteknoloji alanındaki son gelişmeler SOR'u etkili şekilde parçalayabilen ve antiinflamatuvar etki gösteren umut vaadedici bileşikler sunmaktadır. Bunlar arasında CeO₂ nanopartikülleri, biyomedikal alanda oksidatif stress ve inflamasyon içeren patolojilerin tedavisinde kullanılmaktadır. Seryum lantanid serisine ait toprak metalidir. Oksijenle kombine edilerek nanopartikül formuna ulaştığında CeO₂ adını alır ve CeO₂ florid kristalini yapısına katarak antioksidan özellikleri kazanır. Ce⁺⁴ ile Ce⁺³ arasındaki oksidasyon ve redüksiyon, serbest oksijen radikallerini süpürmede önemli bir rol almaktadır (16). CeO₂ nanopartiküllerin küçük boyutta olması hacme göre geniş yüzey alanı ve partikül boyutunun azaltılması, Ce⁺³ ve Ce⁺⁴ durumunda bulunabilme yeteneğine sahip olmasından dolayı yüzey oksijen defekti oluşması ile sonuçlanır. Ce⁺³ ve Ce⁺⁴ iyonlarını aynı anda bulunması nedeni ile redoks tepkimeleri oluşur; CeO₂ nanopartikülü süperoksida redükte olduğunda Ce⁺³, Ce⁺⁴ 'e okside olur ve H₂O₂ oluşur. Ayrıca, Ce⁺⁴ H₂O₂'yi O₂'ye okside ederek Ce⁺³ 'ü rejenere eder. CeO₂ nanopartiküllerin redüksiyonunu sağlayan bu avantajlı rejenerasyon yolu sayesinde SOR elimine edilir (12, 35) CeO₂ nanopartiküllerinin karaciğer hastalıklarında eksojen mediyatör gibi davrandığı belirtilmiştir. İn vitro çalışmalarda SOR, indüklenbilir nitrik oksit sentaz, TNF-α ve interlökin gibi mediatörleri azalttığı

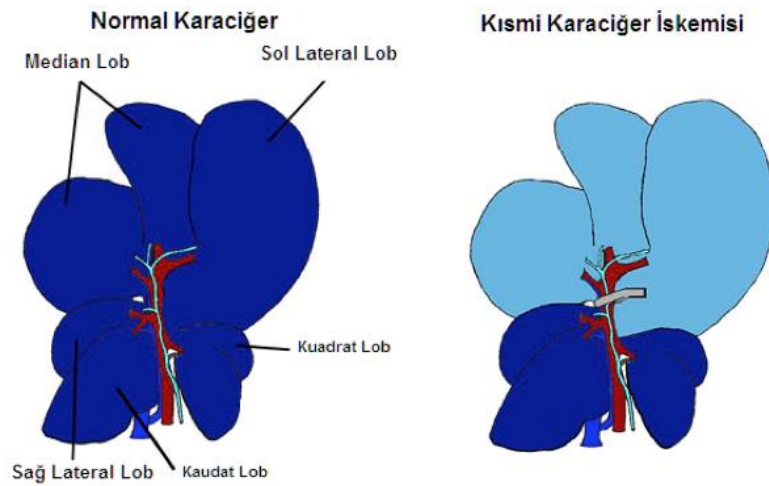
görülmüştür. Araştırmacılar antiinflamatuvar ve antioksidan etki gösteren CeO₂ nanopartiküllerinin bu özelliklerinin diyabetik kardiyomyopati, akciğer hastalıkları, retinal dejenerasyon, serebrovasküler olay ve nörodejeneratif hastalıkların önlenmesi ve/veya tedavisinde kullanılabileceği fikrini öne atmışlardır (11). CeO₂ nanopartiküllerinin epitel hücrelerinde, Nrf-2 yoluyla aracılığıyla antioksidan bir enzim olan hemoksijenaz-1 (HO-1)' in üretimini uyardığı gösterilmiştir (36).



III. GEREÇ ve YÖNTEM:

Bu çalışma, Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Komisyonu'nun 2017.04.02 karar numaralı izni ile gerçekleştirilmiştir.

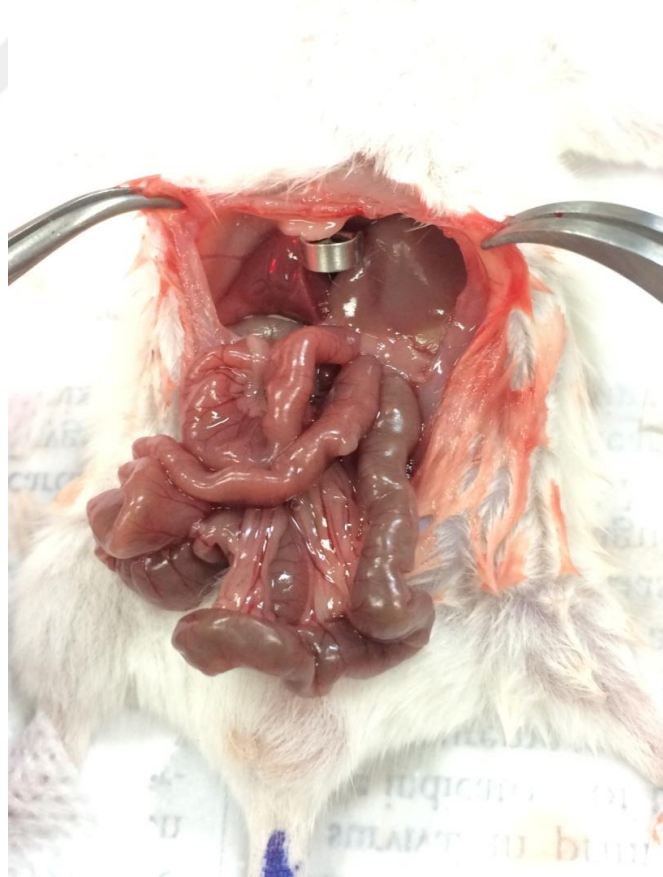
Fare İR protokolü, Abe ve diğerlerinin (37) önerdiği yöntem esas alınarak uygulanmıştır. Çalışmalarda, erkek albino fareler (8-10 haftalık, 25-30 g) kullanılmıştır. Anestezik olarak 2 ml ketamin (50 mg/ml), 1 ml ksilazin (20 mg/ml) ve 10 ml steril % 0.9'luk serum fizyolojik karışımı kullanılarak, 20 µl karışım farelere arka bacadan kas içine enjeksiyonla verilerek anestezi uygulanmıştır. Hayvanlar, karın bölgeleri yukarı bakacak şekilde kolları ve bacakları temiz bir cam yüzeye bantlanarak sabitlenmiş; abdomenin tıraş edilmesinin ardından, küçük cerrahi bir makasla abdomenden sternuma kadar bir kesi açılmıştır. Kesinin her iki yanı ve ksifoid, abdominal kaviteyi açmak ve karaciğeri daha rahat görebilmek amacıyla penslerle tutturulmuştur. % 0.9'luk steril serum fizyolojikle ıslatılmış pamuklu çubuklar yardımıyla, bağırsaklar hassas ve dikkatli bir biçimde çıkartılarak, nemli kalmalarını sağlamak amacıyla bağırsaklar % 0.9'luk steril serum fizyolojikle ıslatılmış ve kesinin sağ tarafına, 2 parça gazlı bezin arasına yerleştirilmiştir. Karaciğer net biçimde görüldükten sonra, atravmatik bir klemp karaciğer sağ lateral loba dallanmanın hemen üzerinden portal ven, hepatik arter ve safra kanalını kapsayacak şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Karaciğerde uygulanan kısmi İR protokolünün şematik gösterimi Abe ve ark. çalışmasından modifiye edilmiştir (37).

Median ve sol lateral lobların (yaklaşık olarak karaciğerin % 70'i) renginde belirgin ve hızla gelişen bir solma izlenmiştir (Şekil 4). Klemp konulup bağırsaklar dikkatlice abdominal boşluğa tekrar yerleştirildikten sonra, enjektör yardımıyla 500 µl heparinize serum fizyolojik direkt olarak peritoneal boşluğa verilerek ve kesi ıslatılmış gazlı bezle kapatılmıştır. Daha sonra fareler vücut sıcaklığını 37°C'de tutmak için ısıtıcı lambanın altında 45 dakikalık iskemi süresi boyunca takip edilmiştir. İskemik süreç sona erdikten sonra klemp dikkatlice çıkartılarak peritoneal boşluğa 500 µl steril serum fizyolojik enjekte edilerek, bu sayede cerrahi işlem sırasında olabilecek su kaybı önlenmiştir. Karın duvarı ve cilt 4/0 ipek iplikle ayrı ayrı kapatılmış ve hayvan 5 saatlik reperfüzyon süresince takip edilmiştir.

5 saatin sonunda, farelere yine yukarıda anlatıldığı şekilde anestezi uygulanarak kalpten alınan kanlardan serum/plazma örneği ve karaciğerden doku örneği elde edilmiştir. Örnekler biyokimyasal analizler için -86°C buzdolabında saklanmıştır.



Şekil 4. Karaciğerde uygulanan kısmi İR protokolünün fotografik gösterimi

Bu çalışmada, İR hasarı belirlemede, karaciğer hasarı, plazma laktat dehidrogenaz (LDH) ve aminotransferaz (ALT, AST) enzim aktivitelerinin tayini ile belirlendi. CeO₂ nanopartiküllerinin serbest oksijen radikalleri üzerindeki etkisini görmek amacıyla doku lipid peroksidasyonu, redükte (GSH) ve okside (GSSG) glutatyon düzeyleri, antioksidan enzim aktiviteleri ve lökosit infiltrasyon belirteci olarak doku myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi tayin edildi. İR ile indüklendiğini düşündüğümüz TNF- α aktivasyonu ve TNF- α aktivasyonu ile indüklendiği öngörülen proinflatuar sitokinlerin plazma düzeyleri belirlendi.

A. Deney grupları

Çalışmada kullanılan hayvanlar kontrol, sham, İR ve CeO₂ nanopartikülünün intraperitoneal (i.p.) ve oral gavaj (o.g.) uygulandığı gruplar şeklinde 5 gruba ayrılmıştır. Her grupta 6 hayvan bulunmaktadır. Kontrol grubundaki hayvanların anestezi sonrası doğrudan kan ve karaciğer dokuları alınmıştır. Sham grubundaki hayvanların anestezi sonrası orta hat kesisi açılıp; klemp koyulmaksızın 45 dakikalık iskemi süresince beklenilmiş, kesi kapatıldıktan sonra 5 saatlik reperfüzyon süresinin ardından kan ve doku örnekleri alınmıştır. İR grubu farelere İR protokolü uygulanmıştır. CeO₂ nanopartikül uyguladığımız gruplara, iskemi protokolünden 24 saat önce CeO₂ nanopartikülü (300 μ g/kg CeO₂ nanopartikül, %5'lik steril dekstroz çözeltisi içinde) i.p. olarak veya o.g. yolu ile verilmiştir. Deney grupları Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. Çalışma grupları.

Kontrol	Anestezi sonrası doğrudan kan ve karaciğer dokuları alındı.
Sham	Anestezi sonrası orta hat kesisi açılıp; klemp koyulmaksızın 45 dakikalık iskemi süresince beklenilip, kesi kapatıldıktan sonra 5 saatlik reperfüzyon süresinin ardından kan ve doku örnekleri alındı.
İR	Farelere yalnızca İR protokolü uygulandı ve kan ve doku örnekleri alındı.
CeO ₂ Nanopartikül (i.p.)	İskemi protokolünden 24 saat önce farelere CeO ₂ nanopartikülü intraperitoneal olarak verildi, ardından İR protokolü uygulandı ve kan ve doku örnekleri alındı.
CeO ₂ Nanopartikül (o.g.)	İskemi protokolünden 24 saat önce farelere CeO ₂ nanopartikülü oral gavaj yolu ile verildi, ardından İR protokolü uygulandı ve kan ve doku örnekleri alındı.

A.1. Plazma LDH ve Transaminaz Düzeylerinin Tayini

Karaciğer hasarının kantitatif belirteci olarak deney gruplarında plazma ALT ve AST ve LDH düzeyleri tayin edildi.

LDH aktivitesi, kan plazma (sitratl) örneklerinde ELISA yöntemi (SIGMA-ALDRICH Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit, Catalog Number MAK066) kullanılarak, üreticinin talimatları esas alınarak ölçüldü. Yöntem, LDH varlığında NAD nin NADH'a redüklenmesinin 450 nm'de izlenmesine dayanan kolorimetrik bir yöntemdir. Sonuçlar U/L olarak ifade edildi. Bir ünite LDH, laktatın piruvata çevrilmesi esnasında 37 °C'de 1 dakikada 1.0 mol NADH oluşturan enzim miktarı olarak tanımlandı.

ALT aktivitesi, kan plazma (sitratl) örneklerinde ELISA yöntemi (SIGMA-ALDRICH, Alanine Aminotransferase Activity Assay Kit, Catalog Number MAK052) kullanılarak, üreticinin talimatları esas alınarak ölçüldü. Yöntem, oluşan piruvatın 570 nm'de kolorimetrik ölçümüne dayanan kenetlenmiş bir reaksiyon içermektedir. Sonuçlar U/L olarak ifade edildi. Bir ünite ALT, laktatın piruvata çevrilmesi esnasında 37 °C'de 1 dakikada 1.0 mmol piruvat oluşturan enzim miktarı olarak tanımlandı.

AST aktivitesi, kan plazma (sitratl) örneklerinde ELISA yöntemi (SIGMA-ALDRICH, Aspartate Aminotransferase Activity Assay Kit, Catalog Number MAK055) kullanılarak, üreticinin talimatları esas alınarak ölçüldü. Bu yöntemde α -keto glutarat glutamata dönüşmektedir ve 450 nm'de kolorimetrik olarak ölçülmektedir. Sonuçlar U/L olarak ifade edildi. Bir ünite AST, 37 C'de 1 dakikada 1.0 mmol glutamat oluşturan enzim miktarı olarak tanımlandı.

A.2.Karaciğer Dokusunda Lipid Peroksidasyonunun Tayini

Doku örnekleri tartıldı ve cam uçlu doku homojenizatöründe 10 mM potasyum tamponu, pH 7.4 içinde homojenize edildi. Kaba homojenat, 10 000xg de 15 dk santrüfj edildi ve süpernatant kullanıldı.

Karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonu, dokuda malonilaldehidin tiyobarbitürik asitle reaksiyonu temeline dayanan ELISA yöntemi (SIGMA-ALDRICH, Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit, Catalog Number MAK085) kullanılarak, üreticinin talimatları esas alınarak tayin edildi. Bu yöntemde oluşan lipid peroksitler, MDA ve tiyobarbitürik asit (TBA) ile tepkimeye girmekte, oluşan ürün 553 nm'de kolorimetrik olarak ölçülmektedir. Sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi.

A.3.Karaciğer Dokusunda redükte ve okside glutatyon (GSH ve GSSG) Düzeylerinin Tayini

Doku süpernatantında GSH ve GSSG düzeyleri ELISA yöntemi ile (Cayman Chemicals, catalog no: 703002) üretici firmanın önerdiği uygulama ve tayin prensipleri takip edilerek tayin edildi. Yöntemde GSH'ın sülfidril grupları Ellman reaktifi ile sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB) oluşturmakta ve 405nm'de ölçülmektedir. Aynı kitle ayrıca GSSG de ölçülmektedir. Sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi.

A.4.Karaciğer Dokusunda Glutatyon-S-Transferaz, Glutatyon Redüktaz, Glutatyon Peroksidaz, Süperoksit Dismutaz ve Katalaz Aktivitelerinin Tayini

Karaciğer dokularındaki anti-oksidan enzim aktiviteleri ELISA yöntemi ile üretici firmaların önerdiği uygulama ve tayin prensipleri takip edilerek tayin edildi (SIGMA-

ALDRICH catalase assay kit CAT100, SIGMA-ALDRICH SOD assay kit 19160, SIGMA-ALDRICH, Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit CGP1, SIGMA-ALDRICH Glutathione S-Transferase (GST) Assay Kit CS0410, SIGMA-ALDRICH Glutathione Reductase Assay Kit GRSA). Katalaz, GR, SOD aktiviteleri nmol/mg protein; GST ve GPx aktiviteleri U/mg protein olarak ifade edildi.

A.5.Karaciğer Dokusunda MPO Aktivitesinin Tayini

Karaciğer dokusunda MPO aktivitesi ELISA yöntemi ile (SIGMA-ALDRICH, Myeloperoxidase Colorimetric Activity Assay Kit Catalog Number MAK068) üretici firmanın önerdiği uygulama ve tayin prensipleri takip edilerek tayin edildi. Yöntem, MPO nun hipokloröz asit varlığında taurini taurin kloramine dönüştürmesi esasına dayanmaktadır. Taurin kloramin ise TNB ile 5,5 dithiobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB)'ye dönüştürülerek ölçülmektedir. Sonuçlar, U/mg protein olarak ifade edildi. 1 ünite MPO, 25 °C'de 1 dakikada 1.0 mmol TNB oluşturan enzim miktarı olarak tanımlandı.

A.6.Plazma Sitokin Panelinin Tayini

Çalışma gruplarında plazma sitokin düzeyleri ELISA yöntemiyle (Invitrogen Mouse Cytokine 20-Plex Panel Cat. No: LMC0006) üretici firmanın önerdiği uygulama ve tayin prensipleri takip edilerek tayin edildi. Sonuçlar pg/mL olarak ifade edildi.

A.7.Plazma MMP-2 ve MMP-9 Düzeylerinin Tayini

Plazma MMP-2 (MyBiosource Mouse MMP-2 ELISA Kit MBS260996) ve MMP-9 (MyBiosource Mouse MMP-9 ELISA Kit MBS175917) düzeyleri, tayin kiti kullanılarak ve üretici firmanın önerdiği uygulama ve tayin prensipleri takip edilerek tayin edildi. Sonuçlar pg/mL olarak ifade edildi.

A.8. Dokuda protein tayini

Doku total protein düzeyi, ELISA yöntemiyle (SIGMA Total Protein kit, Micro TP0100) tayin kiti kullanılarak ve üretici firmanın önerdiği uygulama ve tayin prensipleri takip edilerek tayin edildi. Sonuçlar mg/mL süpernatant olarak ifade edildi.

B.Histolojik Analizler

B.1.Parafin Blokların Işık Mikroskobunda Değerlendirilmesi

Doku örnekleri, fosfat tamponunda (pH 7.0) hazırlanmış %10'luk formalin içinde oda ısısında tespit edildi. Dereceli alkollerde dehidrate edilen örnekler, sabit vakum uygulamalı doku takip cihazında parafine gömüldü. Bloklardan, sliding mikrotomda 5-7 mikrometrelik kesitler alınarak hematoksilen-eozin (H&E) yöntemiyle boyandı. Kesitler literatürde bildirilen karaciğer hasar kriterleri açısından bilgisayar ve dijital kamera bağlantılı ışık mikroskobu aracılığıyla yakalanarak, görüntü analiz programı ile değerlendirildi.

C. Biyokimyasal Verilerin İstatistiksel Analizleri

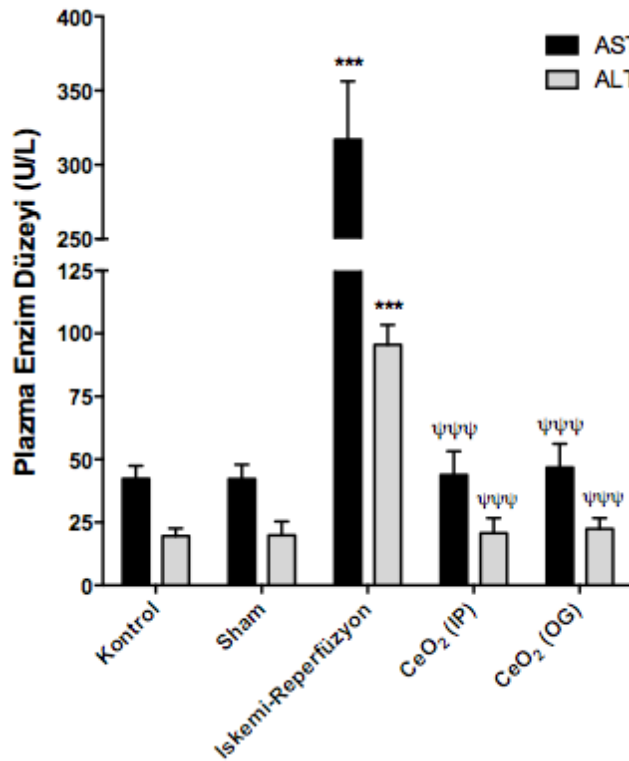
Biyokimyasal sonuçlar, ortalama \pm standart hata olarak gösterilerek ve veriler Prism 6.0 paket programı ile analiz edildi. Ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılık derecesinin değerlendirilmesinde Mann Whitney-U testi; ikiden fazla grupların karşılaştırılmasında varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. $P<0.05$ istatistiksel olarak önemli kabul edildi

IV. BULGULAR

A.1. Farede Karaciğer İR Protokolüne ve Plazma Transaminaz ve LDH Düzeylerine İlişkin Bulgular

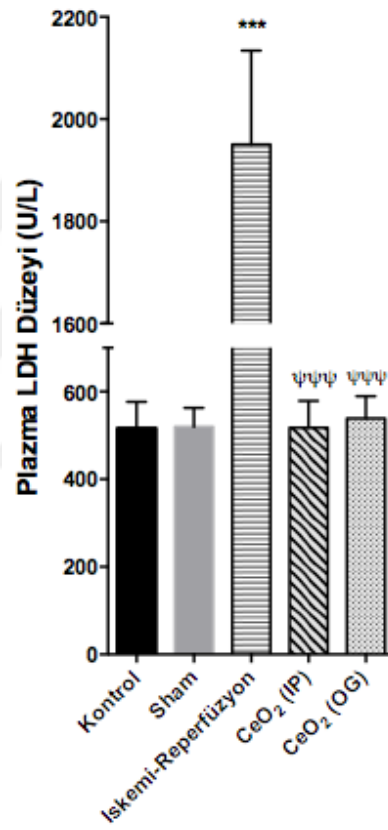
Çalışmada, 8–10 haftalık, 25–30 g ağırlığında erkek albino fareler kullanılmıştır. Çalışma gruplarının her biri için 6 fare olmak üzere toplam 30 fareye deney protokolü uygulanmıştır. Fare İR modelinde karaciğer hasarının kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla çalışma gruplarında plazma ALT ve AST düzeyleri ölçülmüştür. Uygulanan İR protokolü fare karaciğerinde hasara yol açarak plazma ALT ve AST aktivitelerinde dramatik artışlara neden olmuştur ($p<0,001$) (Şekil 5).

İR protokolü öncesinde CeO₂ nanopartikülü uygulanacak çalışma gruplarındaki farelere protokolden 24 saat önce steril dekstroz çözeltisi içerisinde 300 µg/kg dozda CeO₂ nanopartikülü i.p. veya oral gavaj yolu ile verilmiştir. Bu uygulama ile farelerin plazma AST ve ALT düzeylerinde belirgin düşüş görülmüştür ($p<0,001$). CeO₂ nanopartiküllerinin i.p veya oral gavaj yolu ile uygulanmaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (Şekil 5).



Şekil 5. Çalışma gruplarında plazma AST ve ALT düzeyleri (***) $p<0,001$ kontrole karşı; ΨΨΨ $p<0,001$ İR'ye karşı).

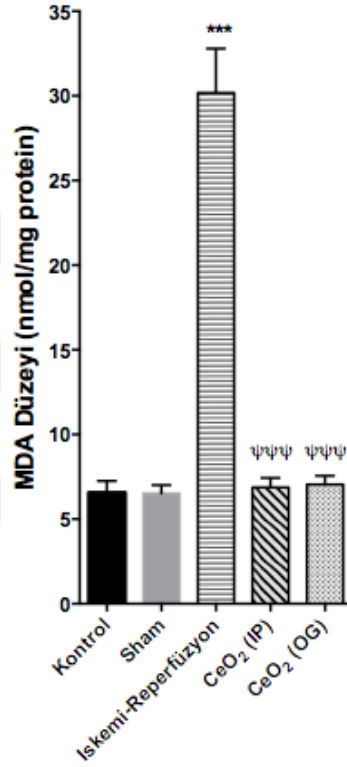
Karaciğerde İR hasarının göstergesi olan plazma LDH aktivitesi de tayin edilmiştir. İR çalışma grubunda ortalama plazma LDH aktivitesi, kontrol ve sham gruplarınıninkine oranla istatistiksel olarak önemli derecede artmış bulunmuş ($p<0,001$); farelere İR protokolünden 24 saat önce CeO_2 nanopartikülü uygulandığında ise plazma LDH aktivitelerinin istatistiksel olarak önemli derecede azaldığı ($p<0,001$), hatta kontrol ve sham gruplarındaki aktivite düzeyine kadar indiği gösterilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Çalışma gruplarında plazma LDH düzeyleri (***) $p<0,001$ kontrole karşı; ΨΨΨ $p<0,001$ İR'ye karşı).

A.2. Karaciğer Dokusunda Lipid Peroksidasyonuna İlişkin Bulgular

Lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olarak oluşan MDA'nın doku düzeyi, İR grubunda kontrol ve sham gruplarına kıyasla artmış olarak bulunmuştur ($p<0,001$). İR protokolünden 24 saat önce CeO_2 nanopartikülü uygulanan çalışma gruplarında ise MDA düzeylerinin İR grubunun değerlerine oranla anlamlı ölçüde azaldığı ($p<0,001$); hatta kontrol ve sham gruplarındaki düzeye kadar indiği gösterilmiştir (Şekil 7).

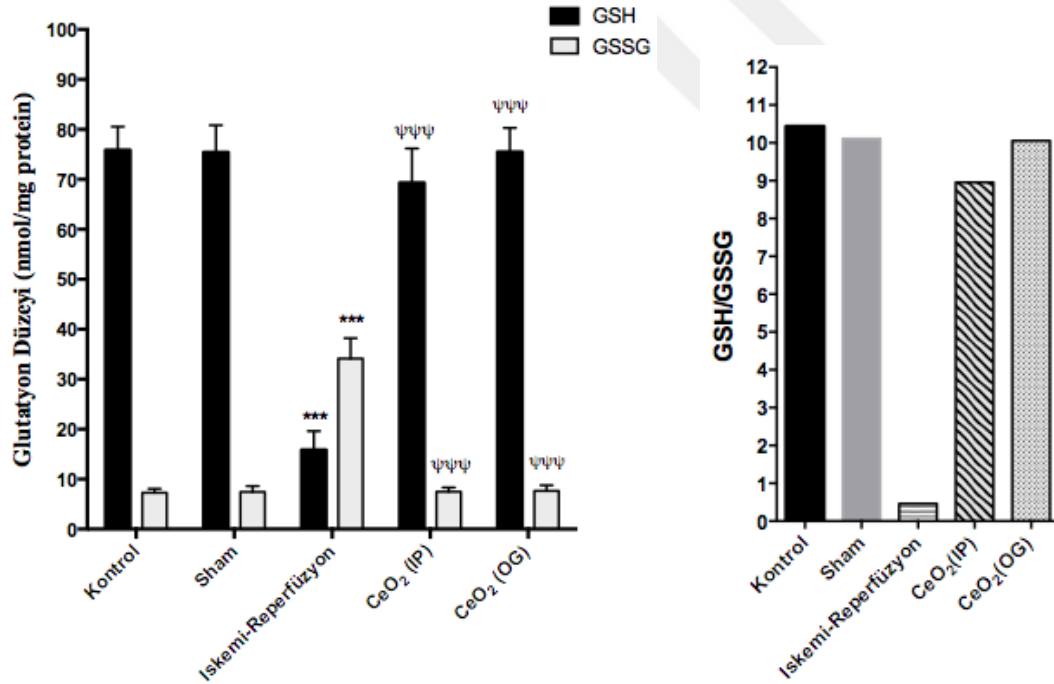


Şekil 7. Çalışma gruplarında MDA düzeyleri (***) $p<0,001$ kontrole karşı; ΨΨΨ $p<0,001$ İR'ye karşı).

A.3. Karaciğer Dokusunda Glutasyon İçeriğine İlişkin Bulgular

İR hasarında doku glutasyon düzeyinin nasıl etkilendiğini görmek ve CeO₂ nanopartikül uygulamasının bu düzeye etkisini saptamak amacıyla çalışma gruplarında karaciğer dokusunda redükte glutasyon (GSH) ve okside glutasyon (GSSG) içerikleri tayin edilmiştir.

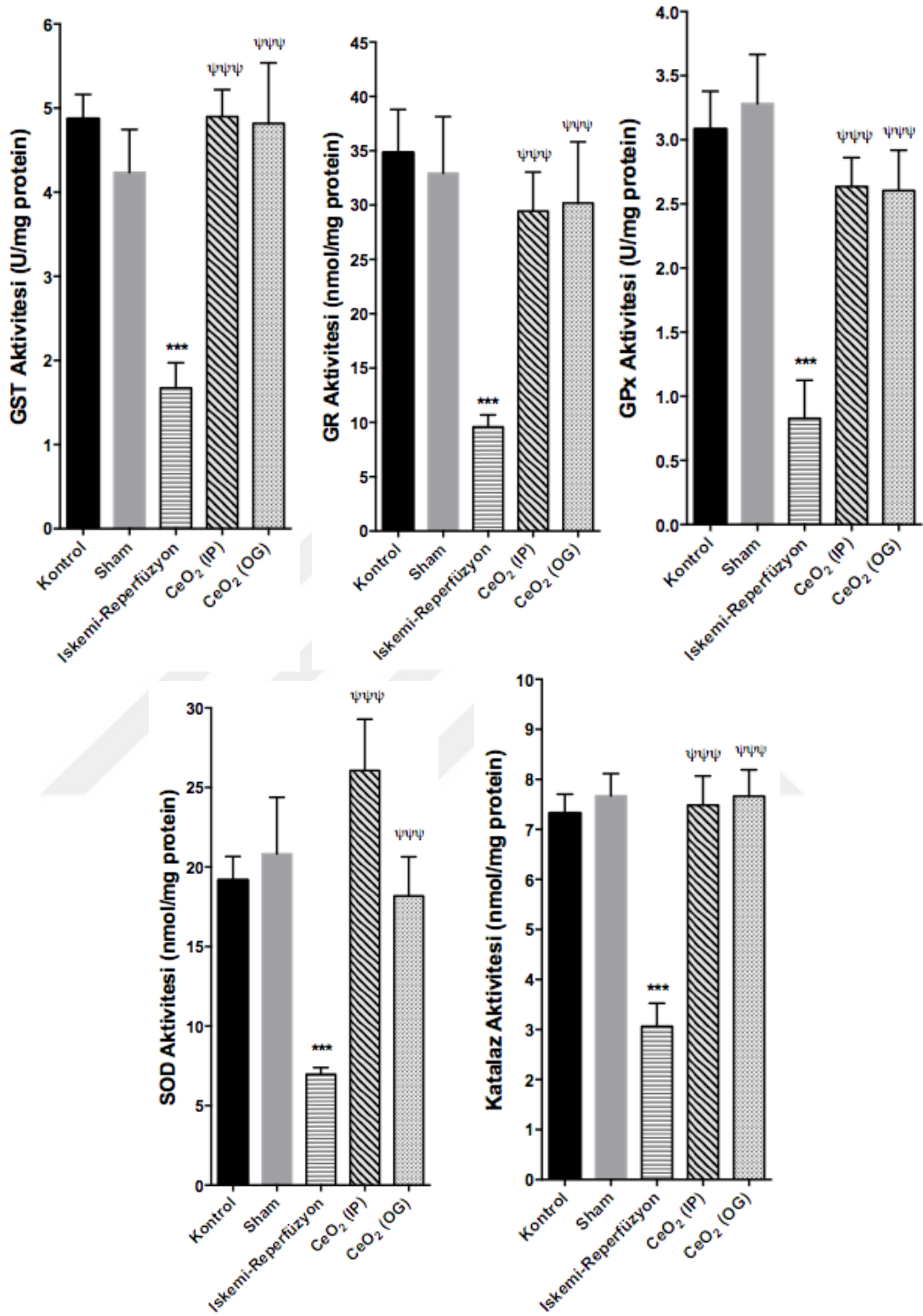
Kontrol ve sham gruplarıyla karşılaştırıldığında, İR grubunda karaciğer GSH içeriğinin belirgin biçimde azaldığı; doku GSSG içeriğinin ise arttığı görülmüştür. İR protokolünden 24 saat önce CeO₂ nanopartikül uygulanan çalışma gruplarında, doku GSH içeriğinin, İR grubuyla karşılaştırıldığında arttığı; doku GSSG düzeyinin ise azaldığı belirlenmiştir (p<0,001). CeO₂ nanopartikül uygulaması, doku glutasyon değerlerini kontrol ve sham gruplarının glutasyon içeriği değerlerine yaklaştırmıştır. CeO₂ nanopartiküllerinin uygulama yolu glutasyon düzeyleri açısından istatistiksel olarak bir fark yaratmamıştır (Şekil 8).



Şekil 8. Çalışma gruplarında GSH ve GSSG düzeyleri (***) p<0,001 kontrole karşı; ΨΨΨ p<0,001 İR'ye karşı).

A.4. Karaciğer Dokusunda Antioksidan Enzim Düzeylerine (GST, GR, GPx, SOD ve Katalaz) İlişkin Bulgular

İR hasarında doku antioksidan enzim sisteminin durumunu gözlemlemek ve CeO₂ nanopartikül uygulamasının bu düzeye etkisini saptamak amacıyla çalışma gruplarında karaciğer dokusunda antioksidan enzim (GST, GR, GPx, SOD ve katalaz) düzeyleri tayin edilmiştir. Kontrol ve sham gruplarının karaciğer antioksidan enzim düzeyleri ile karşılaştırıldığında, İR grubunda karaciğer antioksidan enzim düzeylerinin istatistiksel olarak önemli ölçüde azaldığı görülmüştür ($p<0,001$). İR protokolünden 24 saat önce CeO₂ nanopartikül uygulanan çalışma gruplarında doku antioksidan enzim düzeyleri önemli ölçüde artış göstermiş ($p<0,001$); kontrol ve sham gruplarının değerlerine yaklaşmıştır. CeO₂ nanopartiküllerinin uygulama yolu antioksidan enzim düzeyleri açısından istatistiksel olarak bir fark yaratmamıştır (Şekil 9).

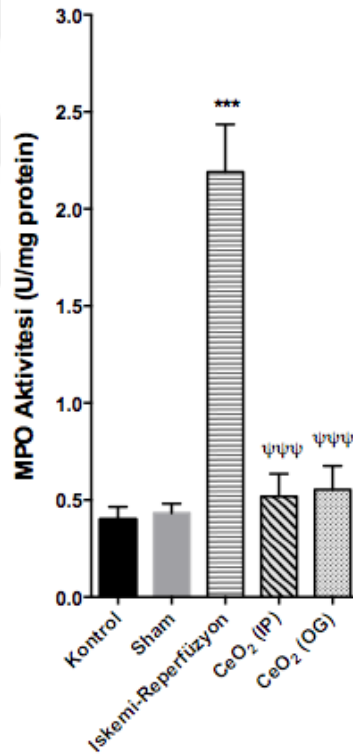


Şekil 9. Çalışma gruplarında GST, GR, GPx, SOD ve Katalaz aktiviteleri (***) p<0,001 kontrole karşı; ΨΨΨ p<0,001 İR'ye karşı).

A.5. Karaciğer Dokusunda MPO Aktivitesine İlişkin Bulgular

Myeloperoksidaz enzimi, patojen mikroorganizmalara karşı önemli bir savunma sistemi kabul edilmekte ve dokuda nötrofil filtrasyonunun, dolayısıyla inflamasyonun en önemli göstergelerinden biri olarak önem taşımaktadır.

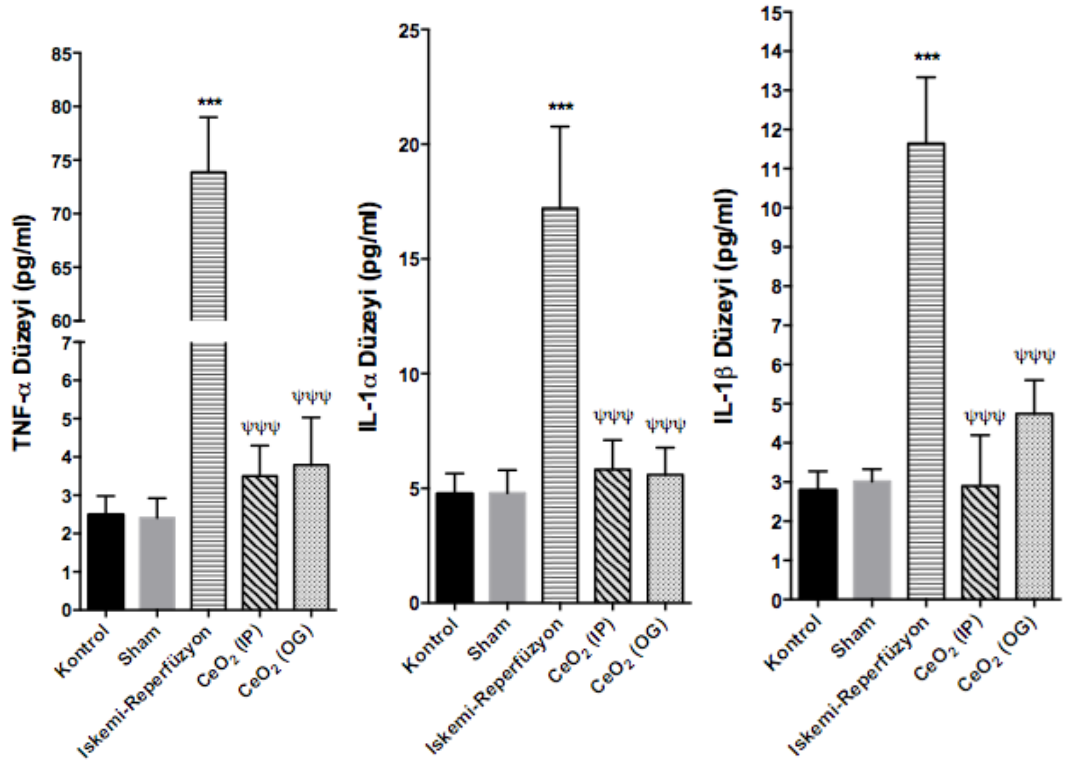
İR protokolü uygulanan çalışma grubunda doku MPO aktivitesi kontrol ve sham grubundaki doku MPO aktivitelerine göre anlamlı biçimde yüksek bulunurken İR protokolünden 24 saat önce CeO₂ nanopartikül uygulanan çalışma gruplarının doku MPO düzeylerinin İR grubununkine oranla düşük olduğu görülmüştür (p<0,001). CeO₂ nanopartiküllerinin uygulama yolu antioksidan enzim düzeyleri açısından istatistiksel olarak bir fark yaratmamıştır (Şekil 10).

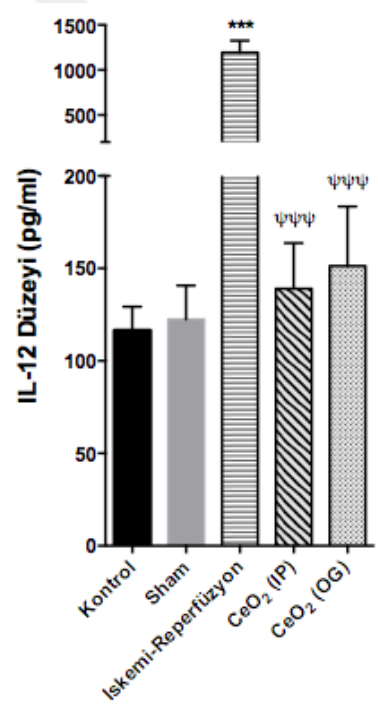
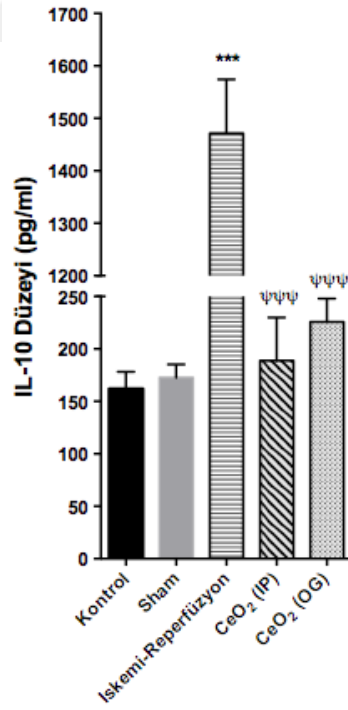
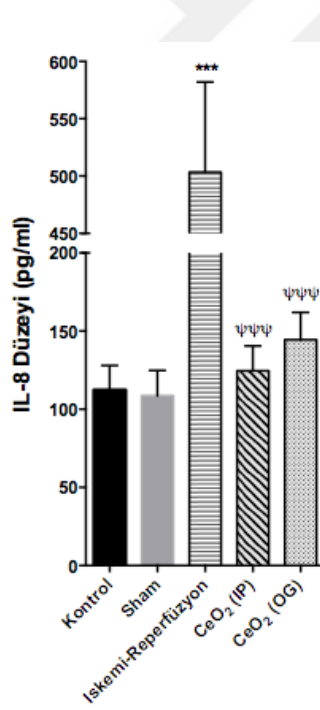
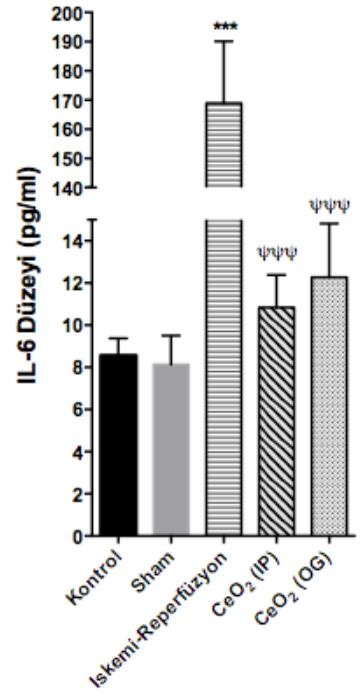
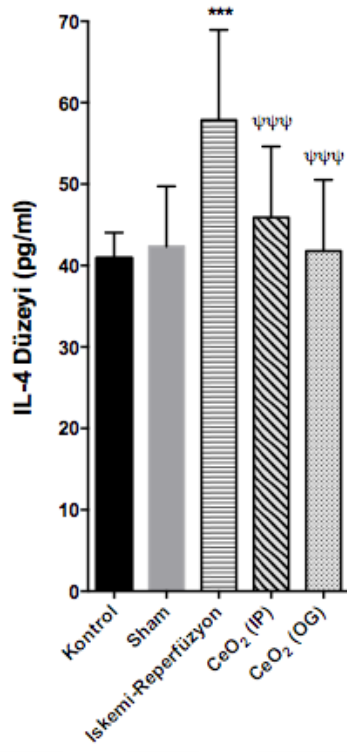
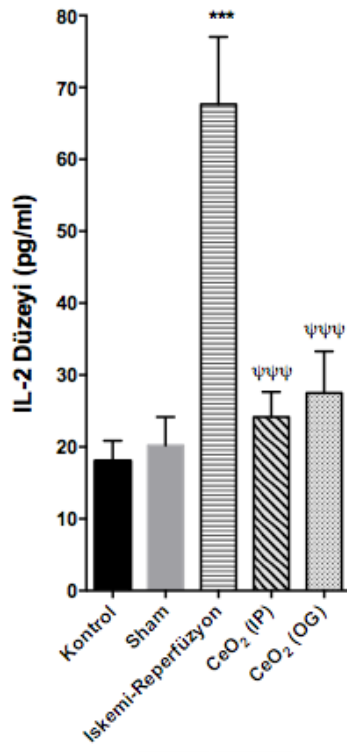


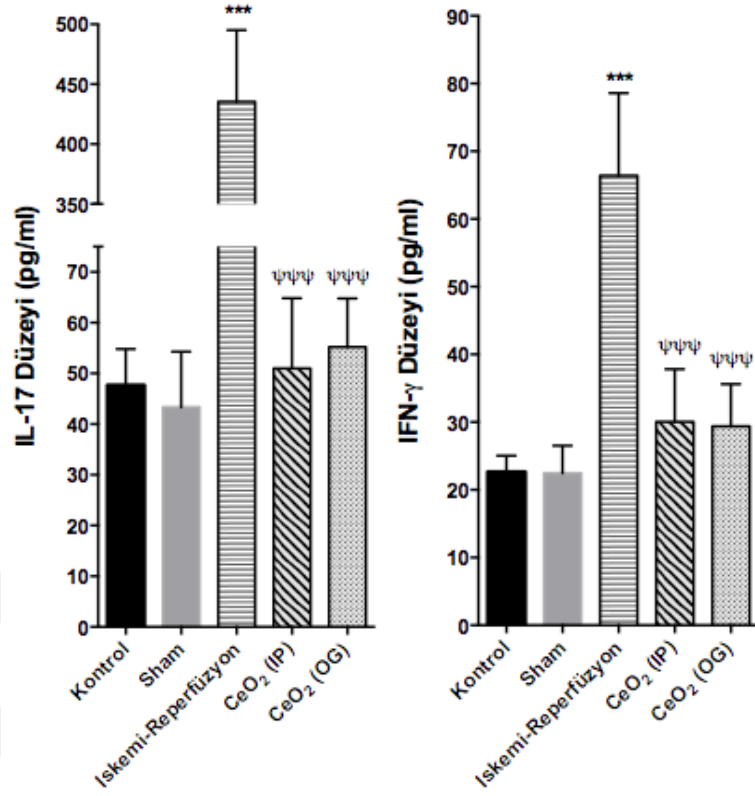
Şekil 10. Çalışma gruplarında MPO aktiviteleri (*** p<0,001 kontrole karşı; ΨΨΨ p<0,001 İR'ye karşı).

A.6. Plazma Sitokin Düzeylerine İlişkin Bulgular

İskemiye bağlı olarak dokuda proinflamatuvar sitokinlerin üretimi artmakta, PMNL aktivasyonu ve dokuya invazyonu görülmektedir. İskemi, aktif makrofajlardan proinflamatuvar sitokinlerin salınımını tetikleyerek erken reperfüzyon hasarı oluşturmaktadır. IL-8, IL-12, IL-18, TNF- α , IFN- γ gibi bazı diğer sitokinler ise geç dönemde nötrofil ve T-lenfosit aktivasyonuna yol açarak geç dönem reperfüzyon hasarı oluşturmaktadır. Bu çalışmada, çalışma gruplarında TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17 ve IFN- γ 'nın plazma düzeyleri tayin edilerek CeO₂ nanopartikül uygulamasının bu sitokin düzeylerine, dolayısıyla erken reperfüzyon hasarına etkisi araştırılmıştır. İR grubunun plazma TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17 ve IFN- γ düzeyleri, kontrol ve sham grubunun düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş ($p < 0,001$); İR protokolünden 24 saat önce CeO₂ nanopartikül uygulanan çalışma gruplarında ise bu düzey, İR grubunun değerlerine kıyasla azalmıştır ($p < 0,001$). İR protokolünden 24 saat önce CeO₂ nanopartikül uygulanan grupta plazma sitokin düzeylerinin kontrol ve sham gruplarındaki düzeylere yaklaştığı gözlemlenmiştir (Şekil 11).







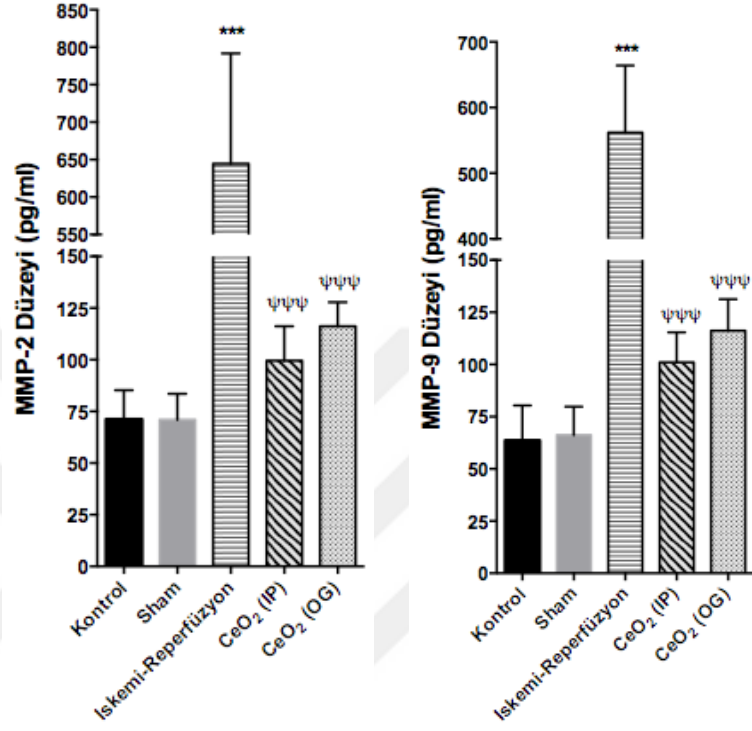
Şekil 11. Çalışma gruplarında plazma TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17 ve IFN- γ düzeyleri (***) p<0,001 kontrole karşı; ΨΨΨ p<0,001 İR'ye karşı).

A.7. Plazma MMP-2 ve MMP-9 Düzeyleri

İR hasarında, hasara yanıt olarak dolaşıma verilen inflamatuvar düzenleyicilerin PMNL ve hücre adhezyon moleküllerini aktive ettikleri, damar geçirgenliğini değiştirdikleri ve doku tekrar düzenlemesini tetikledikleri bilinmektedir. MMP ailesinin üyeleri olan MMP-2 ve MMP-9 nötrofil ve T lenfositler tarafından üretilmekte olup karaciğer hasarında düzeylerinin arttığı öne sürülmektedir. Fare İR modelinde plazma MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri tayin edilmiş ve CeO₂ nanopartikül uygulamasının bu iki MMP'nin plazma düzeyine etkisi araştırılmıştır.

İR grubunda plazma MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri, kontrol ve sham grubunun düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş (p<0,001); İR protokolünden 24 saat önce CeO₂ nanopartikül uygulanan çalışma gruplarında ise bu düzey, İR grubunun değerlerine kıyasla azalmıştır (p<0,001). İR

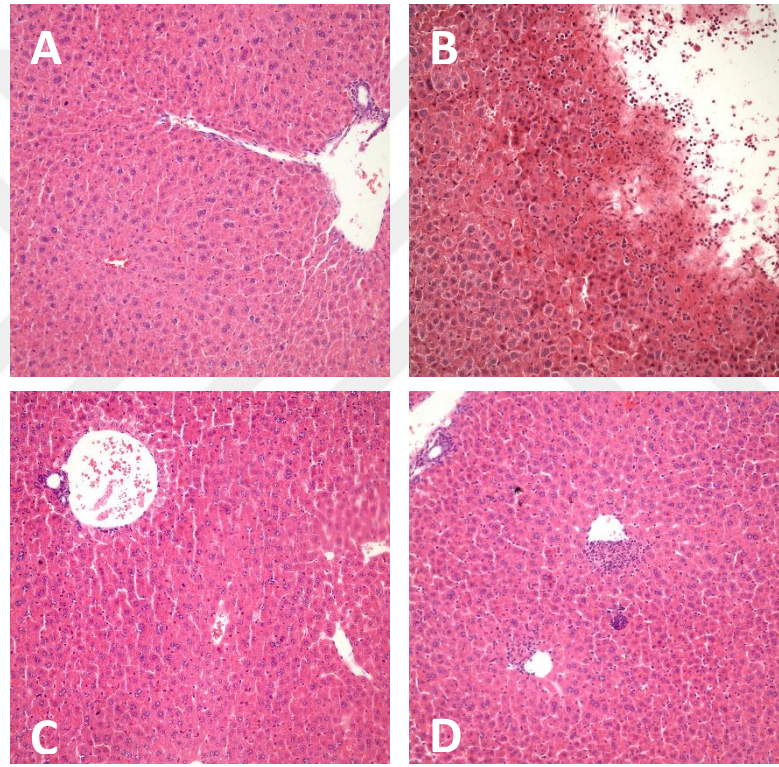
protokolünden 24 saat önce CeO₂ nanopartikül uygulanan gruplarda plazma MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinin kontrol ve sham gruplarındaki düzeylere yaklaştığı görülmüştür (Şekil 12).



Şekil 12. Çalışma gruplarında MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri (***) p<0,001 kontrole karşı; ΨΨΨ p<0,001 İR'ye karşı).

B. Histolojik Bulgular

Hazırlanan doku örneklerinde ışık mikroskobu düzeyinde yapılan analizlerde, İR grubunda sinüzoidlerde hafif ile orta derecede dilatasyonla giden sinüs konjesyonu saptanmış; hepatositlerde vakuolizasyon, hafif derecede fokal karaciğer nekrozu ve steatozunu içeren İR hasarı bulgularına rastlanmıştır. İR grubunda kontrol ve sham gruplarına kıyasla daha fazla sinüzoid konjesyonu ve sitoplazmik vakuolizasyon gözlemlenmiştir. CeO₂ nanopartikül uygulanan gruplarda hasar bulguları geri dönmüştür (Şekil 13).



Şekil 13. Çalışma gruplarında ışık mikroskopi görüntüleri (A-Kontrol grubu, B-İR grubu, C-CeO₂ (i.p.) grubu, D- CeO₂ (o.g.) grubu).

V. TARTIŞMA

İR hasarı klinik olarak transplantasyon, miyokard enfarktüsü, hipovolemik şok, iskemik serebrovasküler olaylar, turnike uygulaması gibi durumlar sonrasında görülmektedir. KC ile ilgili girişimlerde ve KC transplantasyonu gibi durumlarda kan akımının geçici olarak durması durumuna iskemi, kan akımının yeniden başlamasına ise reperfüzyon ismi verilmektedir (38).

Bu dönemde hücre içi enzimlerin hücre dışına geçmesi, hücre içine kalsiyum alınımı, biyolojik zarlarda lipid peroksidasyonu ve yıkım, sonuçta nekroz ortaya çıkmaktadır. Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla oluşan SOR, PMNL aktivasyonu, endotel ve kompleman sisteminin aktivasyonu gibi birçok mekanizma rol oynamaktadır (6).

İskemik ön koşullama, hücre veya dokuların İR'ye kısa süreli maruz kalması ve sonrasında daha uzun süreli iskemi ile oluşan doku hasarında belirgin olarak azalma oluşturan bir fenomendir. Karaciğerde uygulanan sistemik ön koşullama hepatositler ve sinüzoidal endotel hücrelerinde reperfüzyon sonrası meydana çıkan inflamatuvar yanıtı baskıladığı savunulmaktadır. Bu işlem sayesinde hepatosellüler ve endotelyal hücrelerin hasarında azalma ve ATP, KC kan akımı ve hücre içi oksijenasyonla ilgili olduğu belirtilmiştir (39).

İskemik ön koşullanmanın hücresel mekanizmaları aydınlatıldıkça araştırmacılar bu fenomenin etkilerini kimyasal ajanlarla taklit etme ve farmakolojik önkoşullama oluşturma çabasına girmişlerdir.

Nanoteknoloji alanındaki son gelişmeler serbest oksijen radikallerini etkili şekilde parçalayabilen ve antiinflamatuvar etki gösteren umut vaadedici bileşikler sunmaktadır. Bunlar arasından CeO₂ nanopartikülleri, biyomedikal alanda oksidatif stres ve inflamasyon içeren patolojilerin tedavisinde kullanılmaktadır (11). Seryum lantanid serisine ait toprak metalidir. Oksijenle kombine edilerek nanopartikül formuna ulaştığında CeO₂ adını alır ve CeO₂ florid kristalini yapısına katarak antioksidan özellikleri kazanır. Ce⁺⁴ ile Ce⁺³ arasındaki oksidasyon ve redüksiyon, serbest oksijen radikallerini süpürmede önemli bir rol almaktadır (16). CeO₂ nanopartiküllerin küçük boyutta olması hacme göre geniş yüzey alanı ve partikül

boyutunun azaltılması, Ce^{+3} ve Ce^{+4} durumunda bulunabilme yeteneğine sahip olmasından dolayı yüzey oksijen defekti oluşması ile sonuçlanır. Ce^{+3} ve Ce^{+4} iyonlarını aynı anda bulunması nedeni ile redoks tepkimeleri oluşur; CeO_2 nanopartikülü süperoksida redükte olduğunda Ce^{+3} , Ce^{+4} 'e okside olur ve H_2O_2 oluşur. Ayrıca, Ce^{+4} H_2O_2 'yi O_2 'ye okside ederek Ce^{+3} 'ü rejenere eder. CeO_2 nanopartiküllerin redüksiyonunu sağlayan bu avantajlı rejenerasyon yolu sayesinde serbest oksijen radikali elimine edilir (12, 35). CeO_2 nanopartiküllerinin SOD ve katalaz gibi davrandığını gösteren çalışmalar mevcuttur (12). Ayrıca, CeO_2 nanopartikülü makrofajlar içindeki serbest oksijen radikali düzeyini azaltır (13). CeO_2 nanopartiküllerinin oksidatif stresi azaltmada etkili olduğu bildirilmiştir. Bu geniş kullanım alanlarına bağlı olarak çevresel ve inhalasyona maruz kalma sonucu insanlar üzerinde oluşan etkileri henüz açığa kavuşturulamamakla birlikte; son yıllarda yapılan çalışmalar CeO_2 'nin güçlü bir antioksidan olarak hücreleri ultraviyole ışıklardan ve gama radyasyon ışınlarından koruduğu ve kök hücre kültürlerindeki proliferasyonu uyardığı gösterilmiştir (14, 15). CeO_2 nanopartikülü, iskemik beyin hasarına bağlı inme ve diğer oksidatif rahatsızlıklarda yeni bir tedavi modeli olarak öne çıkmaktadır (16). CeO_2 'nin hipokampal nöronal hücre dizisini oksidatif stresten koruduğu ve iskemik kardiyomyopatiye NO ve peroksinitrit düzeyini azalttığı gösterilmiştir (16). Radyoterapiden 24 saat önce verilen CeO_2 'nin SOR düzeyini azalttığını belirtmişlerdir (17).

Bu çalışmada, iskemiden 24 saat önce oral gavaj veya intraperitoneal yolla 300 $\mu g/kg$ dozda CeO_2 nanopartikül uygulamasının tedavisinin karaciğerde İR hasarına karşı olası koruyucu etkisi araştırılmış; bu etkinin biyokimyasal mekanizmaları hakkında bazı ön veriler elde edilmeye çalışılmıştır.

ALT ve AST düzeylerindeki artış sıklıkla akut hepatik hasarın varlığının bir belirteci olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada karaciğerde iskemik hasar oluşturulmak amacıyla atravmatik bir klemp karaciğerde sağ lateral loba dallanmanın hemen üzerinden portal ven, hepatik arter ve safra kanalını kapsayacak şekilde yerleştirilmiştir. Bu hasarın oluştuğunu doğrulayabilmek amacıyla plazma ALT ve AST düzeylerine bakılmıştır. Bu sonuçlara göre çalışma gruplarının

tamamında başarıyla karaciğer iskemisi oluşturulmuş ve bu hasarın çok büyük bir bölümünün CeO₂ nanopartikül uygulanan çalışma gruplarında geri döndüğü saptanmıştır. CeO₂ nanopartikül uygulanan gruplarda, plazma ALT ve AST düzeyleri kontrol grubuna yakın bir düzeye gerilemiştir. Sonuçlar karaciğer hasarının bir başka belirteci olarak kullanılan plazma LDH enzim aktivitesi bulguları ve histolojik bulgularla da desteklenmiştir.

Hepatik iskemide mitokondri esas rolü üstlenmektedir. İR'de SOR seviyesi artar ve bu radikaller çeşitli inflamatuvar sinyal salınımını ve karaciğer dokusundaki metabolik süreci olumsuz yönde etkiler. Hepatik iske mi süresince aerobik metabolizma anaerobik metabolizma tarafına kayar. ATP üretimi için gerekli mitokondriyal antioksidan enzimlerin etkinliği azalırken lipid peroksidasyonu ve kalsiyum birikimi görülür. Ek olarak bu olumsuz etkilere karşı inflamatuvar hücreler ve çeşitli sitokinler salınır (40).

İske mi sırasında ATP depolarındaki azalma ve ATP bağımlı hücre zarı pompalarında fonksiyon bozukluğuna sebep olarak hücre dışı potasyum kaybı ve hücre içi ani sodyum kalsiyum ve klor artışı sonucu hücre sel şişmeye neden olur. Hücre sel şişme, mikroskopik olarak stoplazmada vakuolizasyonla kendini gösterir (5). Bu çalışmada elde edilen histolojik bulgular, kontrol ve sham gruplarının sağlıklı görünümde olduğunu, bununla birlikte İR protokolü uygulanan grupta iskemik hasar belirteçlerinin fazlaştığını göstermiştir.

Nötrofil ve monositler, primer lizozomal granüllerinde bir hem enzimi olan, oksijen bağımlı mekanizmalarla ilgisi olan MPO içerirler. İR hasarının tetiklediği lökosit aktivasyonu ve inflamatuvar mediatörler dokuda ödem oluşumu ve damar geçirgenliğinde artışa sebep olmaktadır (6). Bu çalışmada İR grubunda KC dokusunda MPO aktivitesinin dramatik bir artış gösterdiği, İR protokolü öncesinde CeO₂ nanopartikül uygulamasının doku MPO düzeyini azalttığı bulunmuştur. İR protokolünden 24 saat önce 300 µg/kg CeO₂ nanopartikül uygulamasının karaciğer MPO aktivitesini neredeyse kontrol ve sham grubundaki düzeyine kadar azalmıştır. Bu sonuç, CeO₂ nanopartikül uygulamasının reperfüzyon hasarında tetikleyici rolü

bulunan nötrofillerin aktivasyon ve infiltrasyonunu engellediğini ve inflamatuvar yanıtı azalttığını göstermektedir.

Karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonu düzeyi, lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA'nın ölçümü ile yapılmıştır. İR protokolü sonrasında artış izlenen MDA düzeyi karaciğer fonksiyonlarının bozulduğunu işaret etmektedir. CeO₂ nanopartikül uygulaması ise bu artışın geri dönmesine neden olmuş ve karaciğer fonksiyonları hemen hemen kontrol grubuna yakın şekilde normale dönmüştür.

Hücre serbest oksijen radikallerinin üretimi, inflamatuvar hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, İR hasarı ve kanser gibi hastalıklarla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Mekanizmaları net olarak açıklanamamış olsa da normalde var olan antioksidan enzim sistemlerinin etkilendiği; üretilen SOR ve antioksidan sistem arasındaki dengenin bozulduğu öne sürülmektedir (41). Bu çalışmada GST, GR, GPx, SOD ve katalaz gibi antioksidan enzim aktivitelerinin ve GSH düzeyinin farelere uygulanan karaciğer İR protokolünü takiben kontrol grubuna kıyasla azaldığı; iskeminin 24 saat öncesinde CeO₂ nanopartikül uygulamasının ise bu antioksidan enzim düzeylerinde artışa neden olduğu saptanmıştır. CeO₂ nanopartikül uygulanan çalışma gruplarında lipid peroksidasyonu, GSSG içeriği azalmış; GSH içeriği, katalaz aktivitesi, GST, GR, GPx, SOD aktiviteleri kontrol grubuna ait düzeylere yaklaşacak şekilde artmış olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla CeO₂ nanopartikülünün sitoprotektif etkisinin serbest oksijen radikali üretim mekanizmaları ve antioksidan enzim düzeyleriyle bağlantılı olduğu düşünülebilir. Karaciğer İR hasarı boyunca hepatik GSH derişiminin hızla azalmasının GSH'ın artmış serbest oksijen radikallerini nötralize etmesinden kaynaklandığı öne sürülmektedir (42).

Sitokinler karaciğerdeki İR hasarında antiinflamatuvar ve proinflamatuvar olmak üzere dual rol oynamaktadırlar. Sitokinler, inflamatuvar yanıtı başlatarak, düzenleyerek ve şiddetini belirleyerek İR hasarında önemli rol oynarlar (8). Sitokinlerin İR hasarı üzerindeki rollerini bildiren bugüne dek yapılmış çalışmalarda hasar sırasında ve sonrasında görülen inflamatuvar sürecin karışık olduğu; ancak bu sürecin herhangi bir aşamasında oluşacak müdahalenin organizmanın yararına olacağını savunulmaktadır. Bu nedenle karaciğer nakli sonrasında uygulanması için

çeşitli antiinflamatuvar tedavi yöntemleri geliştirilerek inflamasyon sürecinin etkisi hafifletilmek istenmiştir (43). Bu çalışmada ise CeO₂ nanopartikülünün bu sitokin düzeyleri üzerine etkileri araştırılmıştır. İR hasarıyla artış gösteren TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17 ve IFN- γ sitokin düzeylerinin CeO₂ nanopartikül uygulanmış farelerde kontrol grubuna yakın düzeye azaldıkları tespit edilmiştir. CeO₂ nanopartikülünün sitoprotektif etkisinin sadece antioksidan sistemler üzerinden gerçekleşmediği aynı zamanda inflamatuvar süreç üzerine de etkisi olduğu ortaya konmuştur.

Herhangi bir doku hasarı sırasında oluşan inflamatuvar sürecin devamında organizma hasara cevap olarak fibrozis yanıtını oluşturmaktadır. Fibrozis sürecinde görev alan temel enzimler ise MMP'ler ve bunların doku inhibitörleri TIMP metallopeptidaz inhibitör 1 (TIMP)'lerdir. Yapılan çalışmalar MMP'lerin İR hasarında da önemli rolleri olduğunu göstermiştir (44). Bu çalışmada da farelerde gerçekleştirilen karaciğer İR hasarında MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinin nasıl etkilendiği ve CeO₂ nanopartikül uygulamasının bu sonuçlar üzerine etkileri araştırılmıştır. MMP'ler arasında özellikle MMP-2 ve MMP-9 disse aralığının iki önemli bileşeni olan tip 4 kollajen ve fibronektin degradasyonunda görev aldıklarından karaciğer açısından önemlidirler (44). Elde edilen sonuçlara göre İR sonrasında MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri protein düzeyinde belirgin şekilde artış göstermiş CeO₂ nanopartikül uygulaması ile birlikte söz konusu düzeyler kontrol grubu düzeyine gerilemiştir. Bu sonuçlar iskemi öncesinde CeO₂ nanopartikül uygulamasının ekstrasellüler matriks bileşenleri üzerinden de bir koruyucu etkisi olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmada elde edilen veriler, CeO₂ nanopartiküllerinin İR hasarını önlemede ideal bir terapötik ajan olabileceğini önermektedir.

VI. SONUÇ ve ÖNERİLER

Her ne kadar bu çalışma bir öncül araştırma niteliğinde olsa da CeO₂ nanopartiküllerinin gösterdiği sitoprotektif etkinin mekanizmasının ayrıntıları daha ileri düzeyde araştırılmalıdır. Ayrıca, protein düzeyinde incelenen sitokin ve MMP düzeyleri, gen düzeyinde de incelenerek etkinin gen düzeyinde mi protein düzeyinde mi olduğu belirlenerek mekanizmanın ayrıntıları açıklığa kavuşturulmalıdır.



KAYNAKLAR:

1. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery*. 2004;24(6):468-75.
2. Tüfek A, Tokgöz O, Aliosmanoglu İ, Alabalik U, Evliyaoglu O, Çiftçi T, et al. The protective effects of dexmedetomidine on the liver and remote organs against hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *International journal of surgery*. 2013;11(1):96-100.
3. Siriussawakul A, Zaky A, Lang JD. Role of nitric oxide in hepatic ischemia-reperfusion injury. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2010;16(48):6079.
4. Massip - Salcedo M, Roselló - Catafau J, Prieto J, Avila MA, Peralta C. The response of the hepatocyte to ischemia. *Liver International*. 2007;27(1):6-16.
5. Patel RP, Lang JD, Smith AB, Crawford JH. Redox therapeutics in hepatic ischemia reperfusion injury. *World journal of hepatology*. 2014;6(1):1.
6. Şener G, BÇ Y. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Derg*. 2009;22(3):5-13.
7. Zhang W, Wang M, Xie H, Zhou L, Meng X, Shi J, et al., editors. Role of reactive oxygen species in mediating hepatic ischemia-reperfusion injury and its therapeutic applications in liver transplantation. *Transplantation proceedings; 2007: Elsevier*.
8. Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: insights from transgenic knockout models. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2013;19(11):1683.
9. Guan L-Y, Fu P-Y, Li P-D, Li Z-N, Liu H-Y, Xin M-G, et al. Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide. *World journal of gastrointestinal surgery*. 2014;6(7):122.
10. Morisue A, Wakabayashi G, Shimazu M, Tanabe M, Mukai M, Matsumoto K, et al. The role of nitric oxide after a short period of liver ischemia-reperfusion. *Journal of Surgical Research*. 2003;109(2):101-9.
11. Oró D, Yudina T, Fernández-Varo G, Casals E, Reichenbach V, Casals G, et al. Cerium oxide nanoparticles reduce steatosis, portal hypertension and display anti-inflammatory properties in rats with liver fibrosis. *Journal of hepatology*. 2016;64(3):691-8.
12. Hirst SM, Karakoti A, Singh S, Self W, Tyler R, Seal S, et al. Bio - distribution and in vivo antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice. *Environmental toxicology*. 2013;28(2):107-18.
13. Horie M, Nishio K, Kato H, Fujita K, Endoh S, Nakamura A, et al. Cellular responses induced by cerium oxide nanoparticles: induction of intracellular calcium level and oxidative stress on culture cells. *The Journal of Biochemistry*. 2011;150(4):461-71.
14. Forest V, Leclerc L, Hochepped J-F, Trouvé A, Sarry G, Pourchez J. Impact of cerium oxide nanoparticles shape on their in vitro cellular toxicity. *Toxicology in Vitro*. 2017;38:136-41.
15. Popov AL, Popova NR, Selezneva II, Akkizov AY, Ivanov VK. Cerium oxide nanoparticles stimulate proliferation of primary mouse embryonic fibroblasts in vitro. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;68:406-13.
16. Estevez A, Pritchard S, Harper K, Aston J, Lynch A, Lucky J, et al. Neuroprotective mechanisms of cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;51(6):1155-63.
17. Colon J, Hsieh N, Ferguson A, Kupelian P, Seal S, Jenkins DW, et al. Cerium oxide nanoparticles protect gastrointestinal epithelium from radiation-induced damage by reduction of reactive oxygen species and upregulation of superoxide dismutase 2. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2010;6(5):698-705.

18. Kumari M, Kumari SI, Kamal SSK, Grover P. Genotoxicity assessment of cerium oxide nanoparticles in female Wistar rats after acute oral exposure. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2014;775:7-19.
19. Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Najarian JS. Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation. *The American Journal of Surgery*. 1975;129(5):513-7.
20. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *The British journal of surgery*. 1994;81(5):637-47.
21. V K, R C, SL R, Pathology) TPB. *Temel Patoloji (Basic Pathology)*. 5th edition. U. ÇeÇ, editor: İstanbul Nobel Tıp Kitabevleri Ltd ğti; 1995. 5-9, 36-8, 497 p.
22. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *The American Journal of Surgery*. 2001;181(2):160-6.
23. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Critical care medicine*. 1993;21(9):1376-86.
24. Junqueira LC, J C. *Basic Histology Text & Atlas*. Tenth Edition. ed. USA: McGraw-Hill Companies; 2003. 332-44 p.
25. Kaplowitz N. Mechanisms of liver cell injury. *Journal of hepatology*. 2000;32:39-47.
26. Nieuwenhuijs VB, De Bruijn MT, Padbury RT, Barritt GJ. Hepatic ischemia-reperfusion injury: roles of Ca²⁺ and other intracellular mediators of impaired bile flow and hepatocyte damage. *Digestive diseases and sciences*. 2006;51(6):1087-102.
27. Schoenberg M, Fredholm B, Haglund U, Jung H, Sellin D, Younes M, et al. Studies on the oxygen radical mechanism involved in the small intestinal reperfusion damage. *Acta Physiologica*. 1985;124(4):581-9.
28. Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *Journal of molecular medicine*. 1999;77(8):577-96.
29. Rüdiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor α , but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology*. 2002;122(1):202-10.
30. Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M, Oshima A, Shito M, Kawachi S, et al. Up-Regulation Of Oxygen-Derived Free Radicals By Interleukin-1 In Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury1. *Transplantation*. 1997;64(10):1398-403.
31. Lentsch AB, Yoshidome H, Kato A, Warner RL, Cheadle WG, Ward PA, et al. Requirement for interleukin - 12 in the pathogenesis of warm hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Hepatology*. 1999;30(6):1448-53.
32. Tredger JM. Ischaemia—reperfusion injury of the liver: treatment in theory and in practice. *Biofactors*. 1998;8(1 - 2):161-4.
33. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2003;18(8):891-902.
34. Steenvoorden DP, van Henegouwen GMB. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1997;41(1-2):1-10.
35. Chen S, Hou Y, Cheng G, Zhang C, Wang S, Zhang J. Cerium oxide nanoparticles protect endothelial cells from apoptosis induced by oxidative stress. *Biological trace element research*. 2013;154(1):156-66.
36. Eom H-J, Choi J. Oxidative stress of CeO₂ nanoparticles via p38-Nrf-2 signaling pathway in human bronchial epithelial cell, Beas-2B. *Toxicology letters*. 2009;187(2):77-83.

37. Abe Y, Hines IN, Zibari G, Pavlick K, Gray L, Kitagawa Y, et al. Mouse model of liver ischemia and reperfusion injury: method for studying reactive oxygen and nitrogen metabolites in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009;46(1):1-7.
38. ŞAHİN E, Olguner C, Bodur HA, KOCA U, TUNCEL P, ÖRMEN M, et al. Uzak ve Doğrudan İskemik Önkoşullamanın Karaciğerin Reperfüzyon Hasarı Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2009;29(2):381-7.
39. Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. *Digestive surgery*. 2003;20(5):383-96.
40. Hu C, Li L. Pre - conditions for eliminating mitochondrial dysfunction and maintaining liver function after hepatic ischaemia reperfusion. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2017.
41. Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, Davidson BR, Seifalian AM. The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia - reperfusion injury: a review. *Liver Transplantation*. 2005;11(9):1031-47.
42. Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, Meissner H, Michl P, Leiderer R, et al. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia. *Annals of surgery*. 2004;239(2):220.
43. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, et al. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology*. 1996;23(3):506-14.
44. Hamada T, Fondevila C, Busuttil RW, Coito AJ. Metalloproteinase - 9 deficiency protects against hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*. 2008;47(1):186-98.

