

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI



**SIÇANLARDA KARACİĞER İSKEMİ / REPERFÜZYON
MODELİNDE ERDOSTEİNİN TRPM 2/8 KANALLARI ÜZERİNE
ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Okan TUTUK

Danışmanlar

Prof. Dr. Cemil TÜMER
Doç. Dr. Recep DOKUYUCU

HATAY – 2016

T.C
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA KARACİĞER İSKEMİ / REPERFÜZYON
MODELİNDE ERDOSTEİNİN TRPM 2/8 KANALLARI ÜZERİNE
ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Okan TUTUK

Danışmanlar

Prof. Dr. Cemil TÜMER

Doç. Dr. Recep DOKUYUCU

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
12262 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY – 2016

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA KARACİĞER İSKEMİ / REPERFÜZYON MODELİNDE
ERDOSTEİNİN TRPM 2/8 KANALLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Yüksek Lisans Tezi

Okan TUTUK

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 13.07.2016 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri Başkanı : Prof. Dr. Cemil TÜMER
Üye : Doç. Dr. Halil DÜZOVA
Üye : Doç. Dr. Recep DOKUYUCU

Bu tez, Enstitümüz Tıp Fizyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Doç. Dr. Yaşar ERGÜN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Eğitimim süresince ve asistanlığa başladığım ilk günden beri bilgi ve deneyimlerinden daima yararlandığım, alçak gönüllü, anlayışlı, sabırlı ve babacan tavırlarıyla sabrını ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen, herkese destek olan ve her türlü olanağı sağlayan Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve aynı zamanda tez danışmanım değerli hocam sayın Prof. Dr. Cemil TÜMER'e,

Asistanlığım süresince ve tez çalışmalarım esnasında, fikirleriyle bana her zaman yol gösteren, bilgi ve deneyimlerini paylasan, destekleyen ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, değerli hocam ve ikinci tez danışmanım Doç. Dr. Recep DOKUYUCU'ya ve tez çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve birikimlerini paylaştan bölümümüzün değerli öğretim üyeleri sayın Doç. Dr. Fatih SEFİL ve Yrd. Doç. Dr. Enver Ahmet DEMİR'e

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda destek olan ve yardımlarını esirgemeyen değerli abim Atakan ÖZTÜRK'e, tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli çalışma arkadaşım Arş. Gör. Hatice DOĞAN'a, asistanlığım süresince ve tez çalışmamın deney aşamasında her türlü bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan ve her konuda bana destek olan değerli abim Suphi BAYRAKTAR'a tez çalışmalarımın laboratuvar deneyleri aşamasında birlikte çalıştığım Gökhan AĞTÜRK, Kerem ÇAĞLAR, Zeynel Abidin TAŞ ve Nilüfer BİLGİÇ'e

Sonsuz Teşekkürler.

Tez çalışmamı yaptığım MKÜ-DAM personeline ve çalışmayı destekleyen Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne teşekkür ederim.

Ayrıca hayatım boyunca maddi-manevi desteklerini ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olduklarını bildiğim, daima bana güvenen ve bugünlere gelmemi sağlayan kıymetli annem, babam ve canım kardeşim'e;

Yüksek lisans eğitimim süresince ve öncesinde bana her zaman destek olan, zor zamanlarımda hep varlığını hissettiren, sıkıntılara katlanan ve büyük özveride bulunan, fedakârlığı, anlayışı ve sabrı için sevgili eşim Sümeyye'ye sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ÖZET	XI
ABSTRACT	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğer	3
2.1.1. Karaciğer Anatomisi ve Histolojisi	3
2.1.2. Karaciğer Fizyolojisi	8
2.1.2.1. Karaciğerin Fizyolojik Fonksiyonları ve Metabolik İşlevleri	10
2.2. İskemi	12
2.3. Reperfüzyon	13
2.4. Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı	14
2.5. Karaciğer İskemi / Reperfüzyon Hasarı Fiziopatolojisi	15
2.5.1. Hücresel Mekanizmalar	18
2.5.1.1. Kupffer Hücreleri	19
2.5.1.2. Nötrofiller (PNL) ve Sinüzoidal Endotelial Hücreler	19
2.5.1.3. Plateletler	20
2.5.2. Humoral Mekanizmalar	21
2.5.2.1. Komplemanlar	21

2.5.2.2. Sitokinler	21
2.5.2.3. Tümör Nekrozis Faktör (TNF- α)	22
2.5.2.4. İnterlökin-1 (IL-1) / İnterlökin-6 (IL-6)	23
2.5.3. Serbest Radikaller	23
2.5.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)	24
2.5.4. Antioksidanlar	25
2.5.4.1. Total Antioksidan Seviyesi (TAS)	26
2.5.4.2. Total Oksidan Seviyesi (TOS)	26
2.5.4.3. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)	26
2.6. Transient Reseptör Potansiyel (TRP)	27
2.6.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin (TRPM) Kanalları	29
2.7. İskemide Ca ⁺² ve TRPM Kanalları	31
2.8. Erdosteın	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Deneyin Kurgulanması	35
3.2. Deney Hayvanları	35
3.3. Deney Grupları	35
3.4. Karaciğer İ/R Modeli	37
3.5. Karaciğer Histopatolojik Preparatlarının Hazırlanması	39
3.6. Biyokimyasal Analizler	40
3.6.1. AST, ALT, LDH, GGT, Kreatinin, Üre Analizi	40
3.6.2. TNF- α ve IL-6 Analizi	40
3.6.3. Total Oksidan Seviyesi (TOS) Analizi	40
3.6.4. Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Analizi	41
3.6.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Hesaplanması	41
3.7. TRPM Gen İfadelerinin Analiz İşlemleri	41
3.7.1. Dokuların Homojenizasyonu ve Total RNA İzolasyonu	41

3.7.2. cDNA Sentezi	42
3.7.3. Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	43
3.8. İstatistiksel Analiz	44
4. BULGULAR	44
4.1. Histopatoloji Sonuçları	44
4.2. Biyokimyasal Analiz Sonuçları	46
4.2.1. AST, ALT, LDH, GGT, Üre ve Kreatinin	46
4.2.2. TAS, TOS ve OSI	47
4.2.3. TNF- α ve IL-6	49
4.3. Gen İfadesinin Sonuçları	49
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ	64
7. KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Karaciğerin ön ve arka yüz görünümü	4
Şekil 2.2. Karaciğer Ligamentleri	4
Şekil 2.3. Couinaud'ın segmental anatomisi	5
Şekil 2.4. Couinaud ve Bismuth' a göre karaciğerin segmentasyonu	6
Şekil 2.5. Karaciğer lobülü ve asinüs yapısı	7
Şekil 2.6. Karaciğer lobüllerindeki hepatositlerin organizasyonu	8
Şekil 2.7. Splanknik Dolaşım	9
Şekil 2.8. Pringle Manevrası	14
Şekil 2.9. İ/R hasarında SOR'nin oluşumu	16
Şekil 2.10. İ/R hasarının sistematiği	17
Şekil 2.11. İ/R hasarının fizyopatolojisi	18
Şekil 2.12. PMNL hücrelerinin (nötrofillerin) aktivasyonu ve gelişen olaylar	20
Şekil 2.13. TRP kanallarının alt kanal grupları	28
Şekil 2.14. TRPM2 kanallarının segmental yapısı	30
Şekil 2.15. ADPR ve TRPM2 kanal aktivasyonu ile oksidatif stres arasındaki ilişki	32
Şekil 2.16. Erd'in kimyasal yapısı	33
Şekil 4.1. Oksidatif stres indekslerinin karşılaştırılması	48
Şekil 4.2. TRPM2 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması	50
Şekil 4.3. TRPM6 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması	51
Şekil 4.4. TRPM7 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması	51
Şekil 4.5. TRPM8 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması	52
Resim 3.1. Karaciğer İ/R modeli iskemi modeli oluşturma süreci	38
Resim 3.2. Karaciğer İ/R modeli reperfüzyon süreci ve iskemik karaciğer	39
Resim 4.1. Sıçan karaciğerlerinin histopatolojik görünümü	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Deney grupları ve özellikleri	36
Çizelge 3.2. cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği	42
Çizelge 3.3. cDNA tepkime koşulları	42
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan gen bölgelerine ait primer dizi bilgileri	43
Çizelge 3.5. qRT-PCR için kullanılan karışım içeriği	44
Çizelge 3.6. qRT-PCR koşulları	44
Çizelge 4.1. Histopatolojik parametrelerin istatistiksel verileri (Ort±SH)	45
Çizelge 4.2. Biyokimyasal parametrelerin istatistiksel verileri (Ort±SH)	47
Çizelge 4.3. Oksidatif stres parametrelerinin istatistiksel verileri (Ort±SH)	48
Çizelge 4.4. TNF- α ve IL-6 plazma düzeylerinin istatistiksel verileri (Ort±SH)	49
Çizelge 4.5. Gen ifadesi sonuçlarının istatistiksel verileri (Ort±SH)	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- ADPR:** Adenozin di fosfat-Riboz
ALT: Alanin Aminotransferaz
AMP: Adenozin monofosfat
AST: Aspartat Aminotransferaz
ATP: Adenozin tri fosfat
cADPR: cyclic Adenozin di fosfat-Riboz
Erd: Erdostein
GGT: Gama Glutamil Transpeptidaz
GSH-Px: Glutasyon peroksidaz
H&E: Hematoksilen-Eozin
H₂O₂: Hidrojen Peroksit
HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü
ICAM-1: İntersellüler Adezyon Molekülü-1
IFN- γ : İnterferon-gama
IL-1: İnterlökin-1
IL-6: İnterlökin-6
IP3: İnositol Tri Fosfat
İ/R: İskemi/Reperfüzyon
KDH: Ksantin Dehidrojenaz
KO: Ksantin Oksidaz
LDH: Laktat Dehidrogenaz
MCP: Monosit Kemoatraktan Protein
MDA: Malondialdehit
NAD⁺: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NK: Natural killer
NO: Nitrik Oksit
NOS: Nitrik Oksit Sentaz
O₂^{·-}: Süperoksit Radikali
O₂^{↑↓}: Singlet Oksijen

OH[•]: Hidroksil Radikali
ONOO⁻: Peroksinitrit
OSI: Oksidatif Stres İndeksi
PAF: Trombosit Aktive Edici Faktör
PMNL: Polimorf Nüveli Lökosit
RT-PCR: Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SEC: Sinüzoidal Endotelyal Hücreler
SOR: Serbest Oksijen Radikali
TAS: Total Antioksidan Seviyesi
TGF: Transforming Growth Faktör
TNF: Tümör Nekrozis Faktör
TOS: Total Oksidan Seviyesi
TRP: Transient Receptor Potential
TRPA: Transient Receptor Potential Ankirin
TRPC: Transient Receptor Potential Canonical
TRPM: Transient Receptor Potential Melastatin
TRPML: Transient Receptor Potential Mukolipin
TRPN: Transient Receptor Potential Nompc
TRPP: Transient Receptor Potential Polisistin
VCAM-1: Vasküler Adezyon Molekülü-1

ÖZET

Sıçanlarda Karaciğer İskemi/Reperfüzyon Modelinde Erdosteinin TRPM 2/8 Kanalları Üzerine Etkisi

İskemi, kan akımının azalması veya durması ile dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu gerekli olan oksijen ve diğer metabolitlerin sağlanamadığı ve atık ürünlerin de uzaklaştırılmadığı bir süreç olarak tanımlanır. İskemiye maruz kalmış dokuda kan akımının tekrar normale dönmesi ile reperfüzyon sağlanır. İskemi ve reperfüzyon, günümüzde pek çok ciddi klinik durumun nedenidir. Karaciğer iskemisi/reperfüzyon (İ/R) hasarı, özellikle vasküler cerrahi işlemlerde ve karaciğer transplantasyonu sırasında ve sonrasında sık karşılaşılan bir durumdur. İ/R hasarının temelinde birçok fizyopatolojik mekanizma olmasına rağmen bilinen en belirgin sebebi; reperfüzyon esnasında dokunun oksijenasyonu sonucu ortaya çıkan serbest oksijen radikalleridir (SOR).

Erdostein (Erd) içerdiği tiyol grupları ile SOR'u inhibe ederek ve endojen antioksidanların yapımını artırarak güçlü antioksidan etki gösterir. Çalışmamızda, deneysel karaciğer İ/R modeli oluşturularak Erd'in İ/R hasarına ve karaciğer dokularındaki TRPM kanalları üzerine etkileri incelendi.

Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınan çalışmada, 350±50 gr olan 50 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Her grup 10 adet sıçandan oluşacak şekilde randomize olarak beş gruba ayrıldı. Grup I (Kontrol), Grup II (Sham), Grup III (İ/R), Grup IV (Erd; 100 mg/kg/gün, 2 gün oral yolla verildi), Grup V (Erd+İ/R; 100 mg/kg/gün, İ/R öncesi 2 gün oral yolla verildi). Grup III ve V'teki hayvanlara 45 dk boyunca hepatik iskemisi ve 45 dk reperfüzyon uygulandı. Reperfüzyon periyodunun sonunda biyokimyasal analiz için intrakardiyak kan örnekleri alınarak sıçanlar sakrifiye edildi. Histopatolojik ve moleküler analiz için karaciğer doku örnekleri alındı.

Histopatolojik incelemede diğer gruplara kıyasla İ/R grubunda hücresel şişme, konjesyon, polimorf nüveli lökosit ve apoptoz parametrelerinin anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. İ/R grubuna kıyasla tedavi grubunda (Erd+İ/R) ise bu parametrelerin anlamlı azalışı görüldü. Karaciğer hücre hasarını gösteren AST, ALT, LDH, TNF- α , IL-6, GGT, kreatinin ve üre düzeylerinin; yine diğer tüm gruplara kıyasla İ/R grubunda anlamlı derecede arttığı görüldü. İ/R grubuna kıyasla tedavi grubunda ise; AST, ALT, LDH, GGT, TNF- α , IL-6 ve kreatinin seviyelerinin anlamlı derecede azaldığı belirlendi. Kontrol ve sham grubuna kıyasla İ/R grubunda, TAS'da anlamlı azalma saptandı. Tedavi grubunda ise İ/R grubuna kıyasla anlamlı TAS artışı gözlemlendi. Diğer gruplara kıyasla İ/R grubunda TOS ve OSI'nin anlamlı derecede arttığı saptandı. Tedavi grubunda ise İ/R grubuna kıyasla TOS ve OSI parametrelerinde anlamlı derecede azalma gözlemlendi. Gen ekspresyonları incelendiğinde İ/R grubuna kıyasla tedavi grubunda TRPM gen ekspresyonlarının anlamlı düzeyde azaldığı saptandı.

Sonuç olarak; histopatolojik ve biyokimyasal parametreler ile TRPM gen ekspresyonlarını incelediğimizde; Erd'in hepatik İ/R sürecinde antioksidan savunma sistemlerini desteklediği ve İ/R hasarını azalttığı söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer, İskemi, Reperfüzyon, Erdostein, TRPM

ABSTRACT

The Effect of Erdosteine on TRPM 2/8 Channels in Rat Livers Ischemia/Reperfusion Model

Ischemia is defined as a process in which oxygen and other metabolites cannot be supplied owing to insufficient perfusion with decreased or ceased blood flow, and waste products cannot be removed. Reperfusion is maintained by the restoration of blood flow in the ischemic tissue. Ischemia and reperfusion are causes of several serious clinical situations. The ischemia/reperfusion (I/R) injury of the liver is a commonly observed condition in vascular surgical operations, during and after the liver transplantation. Although there are numerous underlying pathophysiological mechanisms, the most prominent cause of the I/R injury is free oxygen radicals (ROS) that emerge during the reperfusion as a result of the tissue oxygenation.

Erdosteine (Erd) exerts a strong antioxidant effect by inhibiting ROS with its thiol groups and increasing the production of endogenous antioxidants. In our study, we built an experimental liver I/R injury model and investigated the effects of Erd on I/R injury and TRPM channels in liver tissues.

Fifty male Wistar Albino strain rats, which weighed 350 ± 50 grams, were used in the study that was approved by Mustafa Kemal University Animal Experiments Local Ethical Committee. Animals were randomly divided into five groups as 10 rats in each group: Group I (Control), Group II (Sham), Group III (I/R), Group IV (Erd; 100 mg/kg/day, p.o for 2 days), and Group V (Erd+I/R; 100 mg/kg/day, p.o. for 2 days prior to I/R). The animals in Group III and V were subjected to the hepatic ischemia for 45 min and reperfusion for 45 min. At the end of the reperfusion period, the animals were sacrificed following the acquisition of intra-cardiac blood for biochemical analyses. The liver tissue samples were obtained for histopathological and molecular analyses.

In the histopathological evaluation, a significant increase of cellular swelling, congestion, polymorphonuclear leukocytes and apoptosis parameters was observed as compared to the other groups. A significant decrease of those parameters was noted in the treatment group (ERD+I/R), compared to the I/R group. The levels of AST, ALT, LDH, TNF- α , IL-6, GGT, creatinine, and urea, which are indicators of the hepatic cell damage, were significantly increased as compared to all other groups. It was noted that AST, ALT, LDH, TNF- α , IL-6, creatinine, and GGT levels were significantly lower than the I/R group in the treatment group. There was a significant decrease of TAS in the control and sham groups as compared to the I/R group. As for the treatment group, TAS was significantly increased, compared to the I/R group. It was found that TOS and OSI were significantly increased in the I/R group as compared to the other groups. Compared to the I/R group, TOS and OSI parameters were significantly decreased in the treatment group. When gene expressions were evaluated, it was found that TRPM gene expression was significantly decreased in the treatment group compared to the I/R group.

Conclusively, considering the histopathological and biochemical parameters as well as the TRPM gene expressions, we assumed that Erd supports antioxidant defense systems in the hepatic I/R process, and alleviates the I/R injury.

Keywords: Liver, Ischemia, Reperfusion, Erdosteine, TRPM.

1. GİRİŞ

İskemi, dokuya giden kan akımının azalması ya da kesilmesi ile dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu gerekli olan oksijen ve diğer metabolitlerin sağlanamaması ve bu süreçte oluşan atık ürünlerin uzaklaştırılmaması şeklinde tanımlanmaktadır (Atıla ve ark. 2002). İskemi sonucu dokuda toksik metabolitlerin birikimi ve hücrel enerji depolarının boşalması hücre hasarına neden olmaktadır (Kahraman ve ark. 2003).

İskemiye maruz kalmış dokuda kan akımının tekrar normale dönmesi ile reperfüzyon sağlanır (Siemionow ve Arslan, 2004). Kan akımının tekrar başlaması ile hipoksiye maruz kalan dokuya oksijenin ulaşması sonucu serbest oksijen radikallerinin (SOR) iskemik hasardan daha fazla hasara yol açtığı bilinmektedir. Bu da reperfüzyon hasarının en önemli sebeplerinden biri olarak kabul edilmektedir (Şehirli Ö ve ark. 2008, Canbek ve ark. 2008). Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücrel yapılar; zar lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir. Özellikle iskemik dönemde azalan oksidatif fosforilasyonla beraber hücrenin enerji kaynağı olarak kullandığı Adenozin trifosfat (ATP) ve fosfokreatin sentezi de azalır. Bu da hücre membranındaki ATP bağımlı Ca^{+2} ve Na^{+}/K^{+} pompalarının inhibe olmasına neden olur. Sonuçta hücre içi serbest Ca^{+2} ve Na^{+} artışı ile hücrel yapılara hasar verdiği bilinmektedir (Jennings ve Reimer 1991, Wilhelm 1990).

Karaciğer iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı, özellikle vasküler cerrahi işlemlerde ve karaciğer transplantasyonu sırasında ve sonrasında sık karşılaşılan bir durumdur (Mandrekar ve Szabo 2011). Oluşan iskemik karaciğer hasarı ve sonrasında gerçekleşen reperfüzyon hasarını en aza indirmek için farklı ajanların kullanıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Ancak karaciğer cerrahisinde önemli bir problem olan karaciğer İ/R hasarı henüz tam olarak bir çözüme kavuşmamıştır. Karaciğer cerrahisinde sıklıkla kullanılan vasküler klempleme ile oluşan iskemi ve sonrasında gerçekleşen reperfüzyon hasarının ayrıca uzak organ hasarına da neden olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte son yıllarda birçok merkezde başarı ile uygulanan karaciğer transplantasyonları sonrasında ortaya çıkan reperfüzyon hasarlarının önemli bir mortalite nedeni olması da, İ/R hasarının engellenmesine ve mekanizmasının ortaya konmasına yönelik yeni çalışmaları gerektirmektedir. Bu konuda yapılan bütün çalışmalar mekanizmayı anlamaya ve hasarı azaltabilmek veya önlemek için bir çözüm bulmaya yöneliktir.

Erdostein (Erd) mukolitikler grubunda bulunan mukomodulator ve antiinflamatuvar gibi terapötik etkileri tanımlanan farmakolojik bir ajandır. Ayrıca Erd'nin yapısında bulunan tiyol grupları sayesinde ortamda bulunan SOR'u inhibe ederek ve endojen antioksidanların yapımını artırarak güçlü antioksidan özellik gösterdiği bilinmektedir (Fadillioglu ve ark. 2003).

Transient Receptor Potential (TRP) protein dizisinin yapılan son analizlerle Ca^{+2} 'a geçirgen yeni bir katyon kanalı olma olasılığı ortaya çıkmıştır (Phillips ve ark. 1992, Hardie ve Minke, 1992). TRP kanalları ya doğrudan plazma zarlarında bulunan Ca^{+2} kanalları gibi davranmakta ya da sitozolik serbest Ca^{+2} kanallarındaki değişime yardımcı olarak zar potansiyelini değiştirip Ca^{+2} giriş kanallarına etki etmektedir (Kraft ve Harteneck, 2005). Aminoasit dizilerine göre TRP kanalları 7 alt aileden oluşmaktadır. Bu kanalların çoğunluğu tek bir iyon kanalına seçici olmayan Ca^{+2} ve Na^{+} 'a aynı anda geçirgen olan katyon kanallarıdır (Nilius ve ark. 2007).

TRP ailesinin ilk tanımlanan üyesi bir tümör baskılayıcı protein olan Transient Receptor Potential Melastatin (TRPM)'dir. 4 grup altında sınıflandırılan TRPM'nin 8 alt üyesi bulunmaktadır (Zhang ve ark. 2003, Alexhander ve ark. 2004). Dördüncü grupta yer alan TRPM2, Adenozin di fosfat-Riboz (ADPR) ve oksidatif stres ile aktive olmaktadır (Hara ve ark. 2002, Miller 2006, Birnbaumer 2009).

Özellikle TRPM2 kanalının oksidatif stres ürünleriyle aktive olmasının ispatlanmasıyla, iskemik çalışmalarda ortaya çıkan oksidatif stres hasarından dolayı TRPM kanalı üzerinde yapılan çalışmalar oldukça önem kazanmıştır. Soğuk ve mentol reseptörü ile aktive olduğu bilinen TRPM8 kanalının da Ca^{+2} homeostazisinde bir regülatör görevi üstlendiği düşünülmektedir (Birnbaumer 2009). Bu kanallar için mevcut bir kanal blokörü olmaması ve mevcut olan Ca^{+2} kanal blokörlerinin de bu kanalları bloke edememesinden dolayı bu çalışmanın bulguları İ/R hasarının patofizyolojik mekanizmalarının daha ileri düzeyde aydınlatılmasına katkı sağlayabileceği gibi tanı ve tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

Bu bilgilerin ışığı altında, çalışmamızda deneysel karaciğer İ/R modeli oluşturularak Erd'in iskemi reperfüzyon hasarına ve karaciğer dokularındaki TRPM2 ve TRPM8 iyon kanalları üzerine etkisini araştırmayı planladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer

2.1.1. Karaciğer Anatomisi ve Histolojisi

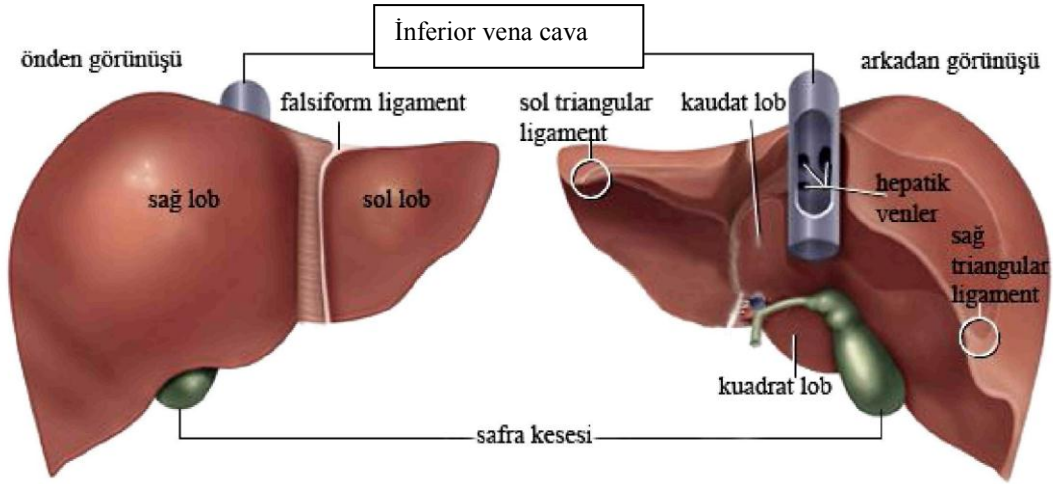
Karaciğer, gebeliğin üçüncü haftasında duodenumdan içi boş bir endodermal tomurcuk olarak oluşmaya başlar. Vücudun en büyük iç organı olup yetişkin bir bireyde 1200-1600 gr ağırlığa ulaşarak toplam vücut ağırlığının yaklaşık olarak % 2,5'ünü oluşturur (Dere 1994, Van Eyken ve Desmet, 1993).

Abdomenin sağ üst kısmında yer alan karaciğer, diyaframın altında kostalar tarafından korunmaktadır. Üst sınırı, 5. kosta hizasında sağ midklaviküler hat ile sol 6. kostonun midklaviküler hattı arasında yer alırken alt sınırı, sağ 9. kosta seviyesinden sol 8. kosta doğru eğik olarak yukarı doğru çıkacak şekilde yerleşiktir (Skandalakis ve ark. 2000).

Karaciğer yüzeyinin, inferior vena kava (IVC) ve hepatic venlere yakın arka alt kısmı hariç, tamamı bol kollajen lif ve az oranda elastik lif içeren Glisson kapsülü ya da kapsüle fibroza adı verilen periton zar ile kaplıdır. Glisson kapsülü porta hepatis bölgesinde portal triad adı verilen [hepatik arter (*Arteriola interlobularis*), portal ven (*Vena interlobularis*) ve safra kanalı (*ductus biliferi, ductus interlobularis*)] yapıyı da sararak karaciğere girer ve parankimi odacıklar şeklinde ayırıp lobüllerin sınırlarını oluşturur (Ratych ve Smith, 1996, Junqueira ve ark. 1998).

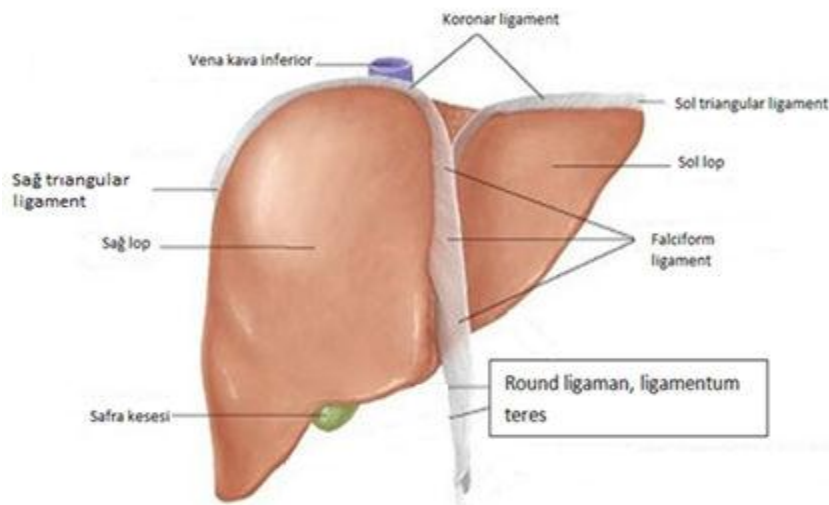
Karaciğerin, diyafram ile komşu konveks yüzüne diyafragmatik yüz ve batın içi organlarla komşu olan yüzüne visseral yüz adı verilen iki temel yüzeyi vardır (Blumgart ve Fong 2000, Skandalakis ve ark. 2000).

Glisson kapsülü iki yaprağa ayrılıp anterior ve posterior koroner ligamentleri oluşturarak diyafragmağa bağlanır (D'Angelica ve Fong, 2004). Bu ligamentler sağda ve solda birleşerek triangular ligamentleri, önde birleşerek de falsiform ligamenti oluşturur. Ayrıca falsiform ligamentin içinde embriyojenik dönemde aktif olarak bulunan umbilikal venin kalıntısı olan ligamentum teres hepatis bulunur. Bu ligamentler (falsiform ve teres hepatis ligamenti) karaciğeri yüzeysel olarak sağ ve sol olmak üzere 2 loba ayırır.



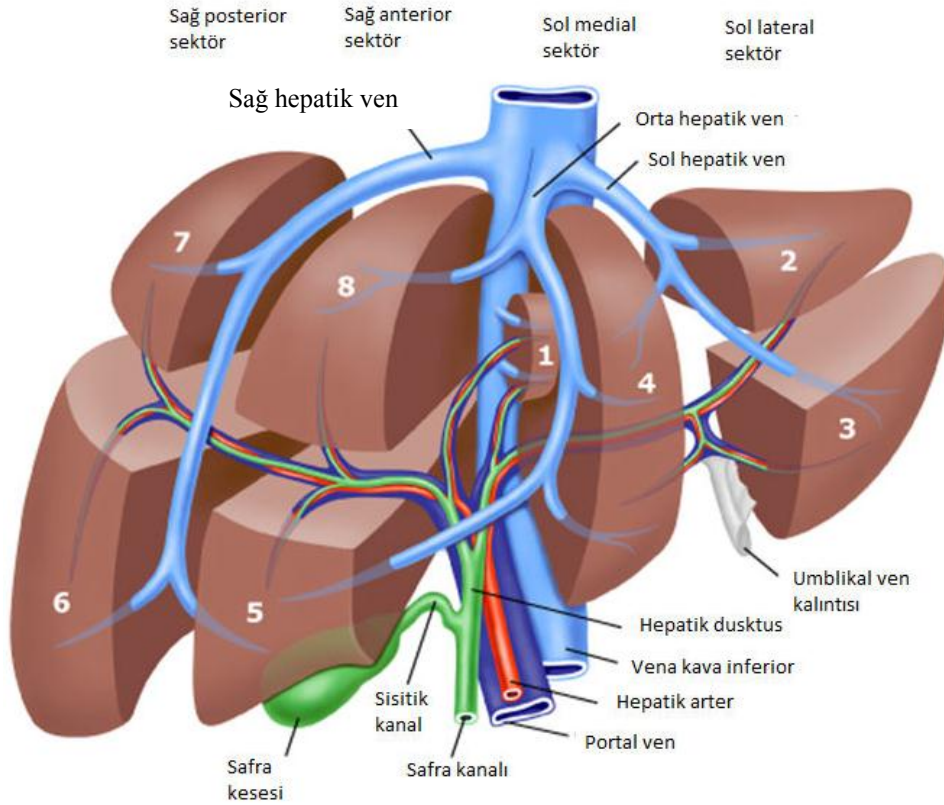
Şekil 2.1. Karaciğerin ön ve arka yüz görünümü (Britannica online, 2009).

Sağ lobun arka alt yüzeyinde, teres hepatis ligamentinin oluşturduğu aralık ile safra kesesi arasında kuadrat lob yer alırken, arka üst yüzeyinde ise porta hepatis ile kuadrat lobdan ayrılan kaudat lob yer alır. Yine karaciğerin arka kısmında sol portal ven ile sol hepatik ven arasında uzanan ve sinüs venosusun kalıntısı olan ligamentum venosum bulunmaktadır. Ayrıca portal triadı saran peritonun, duodenuma ve mide küçük kurvaturuna doğru uzantısı ile omentum minus adı verilen; portal ven ve hepatik arteri içeren gastrohepatik ligament ve biliyer elemanları içeren hepatoduodenal ligamentlerin oluşturduğu bir yapı mevcuttur. Karaciğer, bu hepatik ligamentler sayesinde çevresindeki doku ve organlara, karın ön duvarına ve diyaframa tutunur (Ratych ve Smith, 1996, Carter ve ark. 1996, Sobotta 2011, Phillip ve Gelman, 2010)

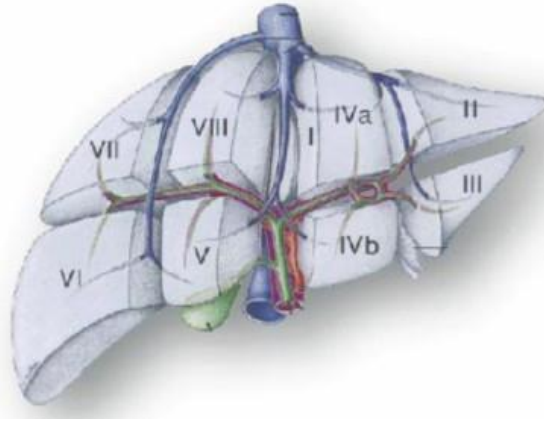


Şekil 2.2. Karaciğer Ligamentleri (Edoctoronline, 2010).

Karaciğerin fonksiyonel anatomisi için, intrahepatik ven dağılımına göre segmenter yapılar belirtilmiştir. 1898 yılında J. Cantlie, safra kesesi yatağının medialinden IVC'a doğru uzanan hayali bir Cantlie çizgisi ile karaciğerin sağ ve sola ayrıldığını belirtmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarla bu çizgide seyreden orta hepatic ven ile karaciğerin sağ ve sol loblara ayrıldığı belirtilmiştir (Goldsmith ve Woodburne, 1957, Blumgart ve Fong 2000). Özellikle 1957 yılında Couinaud'ın tanımlamasında hepatic venlerin seyri doğrultusunda 4 sektöre (Sağ Medial, Sağ Lateral, Sol Medial, Sol Lateral) ayrılan karaciğer, sağ ve sol portal dallar düzeyinden yatay bir hat ile anterior ve posterior olmak üzere ikiye bölünerek karaciğer cerrahisi için çok önemli olan subsegmentlere ayrılmıştır (Marks ve ark. 1979). Couinaud'ın segmental anatomisine göre, sağ ve sol portal pediküllerden direkt beslenen ve hepatic venöz drenajı doğrudan IVC'a dökülen kaudat lob segment 1'i oluşturur. Diğer segmentler ise sağda dört (5,6,7,8) segment, solda üç (2,3,4) segment olmak üzere diyafragmatik yüzde saat yönüne doğru segment 2'den 8'e kadar numaralandırılır ve her segmentin de kendine ait bir portal triadı bulunur. Couinaud'ın segmental anatomisine ek olarak Bismuth; sol medial segmenti, sol superomedial ve sol inferomedial olarak ayırarak segment 4'te IVa ve IVb şeklinde isimlendirme yapmıştır (Lygidakis ve Tytgat, 1989, Philip ve Gelman 2010).



Şekil 2.3. Couinaud'ın segmental anatomisi (Segmental anatomy of liver)



Şekil 2.4. Couinaud ve Bismuth' a göre karaciğerin segmentasyonu (neu.surgicaloncology.de)

Couinaud ve Bismuth karaciğer segmentasyonunu ;

Kaudat lobu; segment I,

Sol lateral sektörde; süperiorda segment II, inferiorda segment III,

Sol medial sektörde segment IV'ü; süperiorda IVa, inferiorda IVb,

Sağ anterior sektörde; inferiorda segment V, süperiorda segment VIII,

Sağ posterior sektörde; inferiorda segment VI ve süperiorda segment VII şeklinde tanımlamışlardır (Couinaud 1957, Bismuth 1982, Van Leeuwen 1994, Blumgart ve Fong 2000).

Belirtilen bu segmentlerin her biri kendine ait ancak farklılıklar gösterebilen portal triad yapısına sahiptir. Karaciğer yüzeyini örten glisson kapsülü, hilustan organ içine girip parankimi bölerek karaciğerin loblarını meydana getiren lobüllerin sınırını oluşturur. Bir lobülün komşu lobülleri ile birleştiği köşesinde bağ dokusu daha da arttığı için altıgen şeklinde bir alan görülmektedir. Bu alana 'Portal Alan' veya 'Kiernan Aralığı' denilmektedir. Bu altıgen şeklin her köşesinde portal triad bulunmakla beraber, lobülün dışından merkeze doğru ışınal olarak karaciğer hücrelerinin %60-70'ini oluşturan hepatositler ve aralarında Kuppfer hücrelerinin oluşturduğu sinüzoidler yer almaktadır (Junqueira ve Carneiro, 2003). Santral vene doğru tek sıra endotel hücrelerinin oluşturduğu tüp şeklindeki lümeni yapıda olan asinüsler sayesinde hepatositler birbirinden ayrılmıştır. Sinüzoidlerin endoteliumu ile hepatositlerin arasındaki dar aralığa 'Disse Aralığı' denilmektedir. Disse aralığında bulunan mezenşimal kökenli İto hücreleri (yıldız hücreler), yağ içermelerinin yanı sıra vitamin A'nın depolanmasında ve metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca bu hücreler, kollajen üretiminden ve depolanmasından

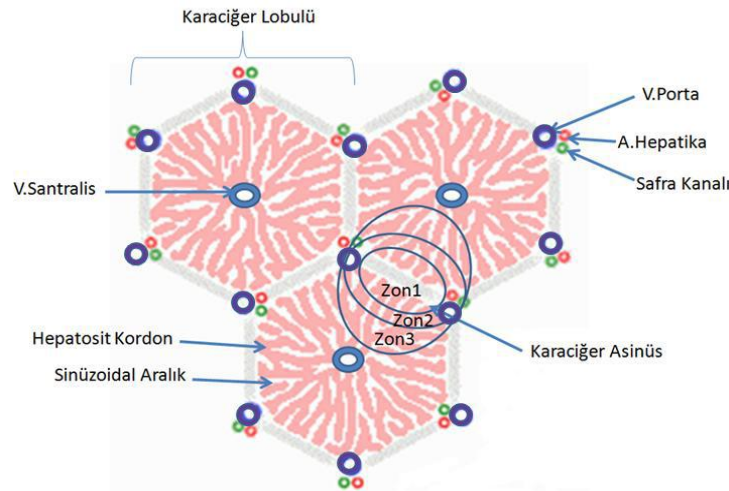
sorumlu olup, hepatitte gelişen fibrozisten sorumlu tutulmaktadır. İntrahepatik kan akımı, hepatik arter ve portal venden sinüzoidlerle santral vene doğru yavaş bir akım şeklinde gerçekleşir. Bu akım sırasında yabancı maddelerin fagositozunu, Kuppfer hücreleri gerçekleştirirken, hepatosit hücreleri de portal venin bağırsaklardan getirdiği besin zengini kanın işlevlerinden sorumludur. Sinüzoidlerin içindeki kan, endotel hücrelerinden sızıp Disse aralığına geçer ve böylece hepatositlerin madde alış verişini gerçekleştirir. Karaciğerin fonksiyonel ünitesi olarak bilinen lobülleri oluşturan hepatositler, fonksiyonlarına göre lobülün farklı alanlarına yerleşim göstermiştir ve santrale doğru portal alanı çevreleyen 3 zona ayrılmıştır. Zonlar venlere olan yakınlıklarına göre oksijenlenme ve beslenme açısından önem arz etmektedir. Kan akımının merkeze doğru olmasından dolayı; oksijenin, metabolitlerin ve bağırsaklardan emilen bütün maddelerin öncelikle lobülün periferindeki hücelere geldiği bilinmektedir (Kierszenbaum 2006, Aytekin ve Solakoğlu, 2006).

Zon 1: Periportal bölge olarak tanımlanır. Bu zondaki hücreler damarlara en yakın olan ve kan akımı değişikliklerinden en çok etkilenen hücrelerdir. Sinüzoidde gelen kandaki besin ve oksijenin en zengin olduğu bölgedir.

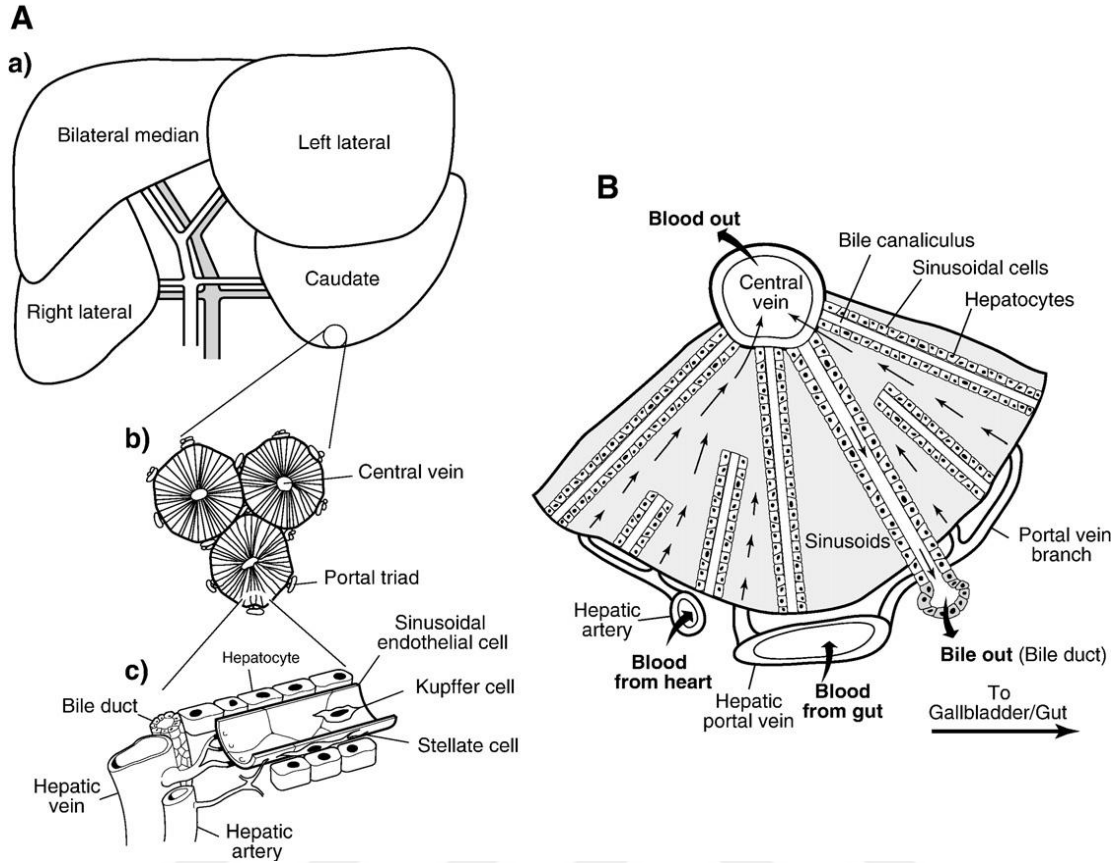
Zon 2: Geçiş zonu ya da orta zon olarak tanımlanır.

Zon 3: Perisantral zon olarak tanımlanır. Santral vene yakın olup kan akımının en son ulaştığı bölgedir ve oksijen bakımından fakirdir.

Hepatositlerin yerleşimine göre ayrıldığı bu bölgeler sayesinde, karaciğere gelen kan ilk olarak zon 1'e girer. Besin ve toksinlerle ilk önce bu kısım karşılaşır. Zon 3'e doğru detoksifikasyon işlemi gerçekleşir. Karaciğer asinüsleri hepatositlerin toksik maddelere karşı işlevlerini açıklamada veya hasar düzeyi ile ilişkili olarak bilgi vermede önem arz etmektedir.



Şekil 2.5. Karaciğer lobülü ve asinüs yapısı (Yılmaz 2010)



Şekil 2.6. Karaciğer lobüllerindeki hepatositlerin organizasyonu (Mohammed ve Khokha 2005, Barritt ve ark. 2008)

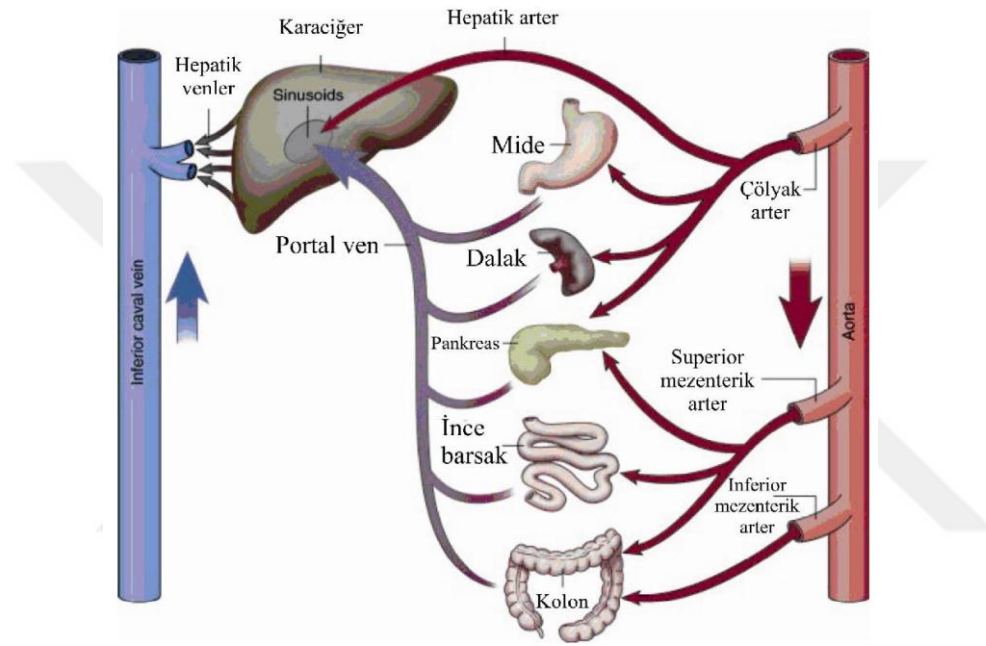
A) a: Sığan karaciğer ana lobları, b: Santral ven ve portal triad arasındaki ilişki, c: Hepatik ven, hepatic arter, safra kanalı, hepatosit ve sinüzoidal alanın düzeni B) Hepatik arter ve portal venden santral vene doğru kan akımının yönünü gösteren hepatosit alanı ve safra kanalikülü boyunca safra akışı.

2.1.2. Karaciğer Fizyolojisi

Karaciğer vücuttaki tüm sistemleri ilgilendiren, yaşamsal fonksiyonlardan sorumlu birçok metabolik işlevi gerçekleştiren ve bu işlevlerin birbiriyle bağlantısını sağlayan multifonksiyonel bir organdır.

Splanknik dolaşımın en önemli kısımlarından biri olan karaciğerin kan akımı, erişkin bir bireyde ortalama 1500 ml/dk kadar olup bu miktar dakikada kalp debisinin dörtte birine tekabül etmektedir. Kanlanmasının %70-75'i, besin zengini venöz kanı getiren portal ven ile %25-30 kadarı ise çölyak arterin gövdesinden köken alan oksijence zengin kanı taşıyan hepatic arter ile sağlanır (D'Angelica ve Fong 2004, Kierszenbaum 2006). Karaciğer bu vasküler yapılanmalar ile yaklaşık 1 grama 1ml kan hacmi düşecek

şekilde kalpten çıkan kanın %25'ini almaktadır (Schwartz 2004). Karaciğer loblarının merkezinde yer alan ve karaciğerden kalbe kanın taşınmasını sağlayan santral ven (hepatik ven), sublobüler venler ile birleşerek vena cava'ya bağlanan vena hepatica'yı oluşturmaktadır. Sağ hepatik ven ile karaciğerin sağ lobunun, sol hepatik ven ve orta hepatik venin birleşimiyle de sol lobun venöz drenajı IVC'a gerçekleşmektedir (Ratych ve Smith, 1996).



Şekil 2.7. Splanchnik Dolaşım (Phillip ve Gelman, 2010).

Vena porta içindeki basınç 7-10 mmHg arasında değişir. Hepatik venlerdeki basınç 3-6 mmHg arasında değişirken, hepatik arter içindeki basınç ise sistemik arteriyel basınç ile aynıdır. Her iki vasküler yapının geldiği sinüzoidlerdeki basınç ise 4-8 mmHg kadardır. Vena cava içerisindeki basınçta diyafram seviyelerinde 2-5 mmHg'dır. Bu basınç farkları sayesinde kan kalp yönünde akar.

Akut karaciğer hasarı ile oluşan hepatik doku kaybında veya %70'inin çıkarıldığı kısmi hepatektomiden sonra bile, karaciğer kalan loblardan büyüyerek orijinal boyutuna ulaşır. Karaciğerin kendi kendini yenilemesinde, bölünmesine ve büyümesine yol açan Hepatosit Büyüme Faktörü'nün (HGF) önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Guyton ve Hall 2011). Bu yeniden oluşum sıçanlarda 5-7 gün süren hızlı bir süreçtir. İnsan ve

sıçanlarda karaciğerin rejenerasyon süreci birbirine benzerdir. Bu nedenle sıçanlarda elde edilen sonuçlar insan karaciğeri için önemli bir yol göstericidir (Fausto 2001).

2.1.2.1. Karaciğerin Fizyolojik Fonksiyonları ve Metabolik İşlevleri

1. Karbonhidrat Metabolizması

Glikojen depolama, glikojenoliz, galaktoz ve fruktozu glikoza çevirme, glikoneojenez ve karbonhidrat metabolizmasının ara ürünlerinden birçok önemli kimyasal maddenin oluşturulması karaciğere özgü karbonhidrat metabolizmasının önemli işlevlerindedir. Karaciğer özellikle kanda normal glikoz konsantrasyonunun sağlanabilmesi için glikoneojenez gibi işlevleri ile önemli bir rol üstlenmektedir.

2. Lipid Metabolizması

Vücuttaki bütün hücrelerde yağ metabolizması olmasına rağmen, karaciğerin yağ metabolizmasına özgül önemli bazı işlevleri vardır. Enerji sağlamak için yağ asitlerinin oksidasyonu, karbonhidrat ve proteinlerden yağ sentezi, büyük miktarda fosfolipit, kolesterol ve lipoprotein sentezinin karaciğerde gerçekleşmesi dolayısıyla karaciğer, yağ metabolizmasında önemli ölçüde sorumludur.

3. Aminoasit ve Protein Metabolizması

Protein sentezinin merkezi karaciğerdir. Aminoasitlerin deaminasyonu, plazma proteinlerinin oluşumu, üre oluşumuyla amonyağın vücut sıvılarından uzaklaştırılması ve vücuttaki metabolik olaylar için önemli aminoasitlerin birbirine veya diğer öğelere dönüştürülmeleri (transaminasyon, aminasyon, esansiyel olmayan aminoasitlerin ve pürin, pirimidin gibi moleküllerin sentezi) karaciğerin protein metabolizmasındaki başlıca işlevlerindedir. Albumin ve globülin proteinleri de vücutta yalnızca karaciğerde üretilmektedir.

4. Vitamin ve Mineral Metabolizması

Karaciğerin vitaminleri depo etme özelliği vardır. A vitamini karaciğerde en fazla depo edilen vitamindir. Yüklü miktarlarda D vitamini ve B₁₂ vitamini de depo edilir. Yağda çözünen vitaminlerin karaciğerde depolanması, besinsel kaynakların bulunmadığı koşullarda kısa süreli kaynak olarak kullanılmasına imkan sağlar. Aynı zamanda karaciğerde demir ve bakır gibi bazı minerallerin de depo edildiği bilinmektedir.

5. Safra Metabolizması

Karaciğerde sentezi yapılan kolesterolün bir kısmı, lipoproteinler içinde kan yoluyla tüm doku hücrelerine taşınırken yaklaşık %80'i, safra tuzlarına çevrilerek safraya salgılanır. Böylece kolesterol vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Vücut için toksik bir madde olan bilirubin de safra yoluyla atılmaktadır.

6. Biyotransformasyon ve Detoksifikasyon Metabolizması

Pek çok ilaç ve toksinin, böbrekler tarafından eliminasyon olmamalarından dolayı karaciğer, bu maddeleri daha çözülebilir olan hidrofilik şekillere dönüştürür. Karaciğerin aracılık ettiği bu biyotransformasyon reaksiyonları, oksidasyon ve konjugasyonun gerçekleştiği 2 faz şeklinde meydana gelmektedir.

7. Kan Temizleme ve Depo İşlevi

Bağırsak kapillerlerinden akan kan, birçok bakteriyi de beraberinde götürerek, karaciğere girene kadar portal vende yoğun bakteri bulundurmaktadır. Ancak hepatik venöz sinüslerde yer alan, büyük fagositik makrofajlar olan Kupffer hücreleri, sinüsler içinden geçen kanı son derece etkili ve hızlı bir şekilde temizleyebilmektedir. Bakteriler Kupffer hücresine temas ettiği andan itibaren 0,01 saniyeden daha az sürede, Kupffer hücrelerinin duvarından içeriye girip sindirilinceye kadar orada tutulur. Bağırsaklardan portal kana girerek karaciğer içinden geçip sistemik dolaşıma ulaşmayı başaran bakterilerin sayısı muhtemelen %1'den fazla değildir. Karaciğer, Kupffer hücrelerinin fagositoz yoluyla kanı temizlemesinden dolayı büyük bir filtre gibi düşünülebilir.

Karaciğer aynı zamanda kan hacmi azaldığında ek kan sağlayabilme veya kan hacmi aşırı şekilde arttığında ise kendi kan damarlarında büyük miktarlarda kan depolayabilen büyük bir venöz organdır. Hepatik venlerdeki ve hepatik sinüslerdeki kan ile birlikte karaciğerin normal kan hacmi 450 mililitredir. Sağ atriyumda basınç yükseldiği zaman karaciğerde de basınç artar böylece karaciğer genişleyerek çoğunluğu sinüslerde, az bir kısmı da hepatik venlerde olacak şekilde 0,5 ile 1 litre daha fazla kanı depo edebilir.

8. Demir depolaması

Demir, vücutta kandaki hemoglobinde bulunmasının dışında, büyük bir kısmı karaciğerde ferritin şeklinde depo edilmektedir. Vücut sıvılarında demirin düzeyi azaldığı zaman, karaciğer demiri serbestleyerek kan demirinin tampon işlevini görür.

9. Koagülasyon ile İlişkisi

Plazma proteinleri, fibrinojen (FI), protrombin (FII), albumin ve diğer koagülasyon faktörlerinin (FV, FVII, FIX ve FX) sentezi karaciğerde gerçekleşmektedir. K vitamini; FII, FVII, FIX ve FX pıhtılaşma faktörlerinin karaciğerde sentezi için gereklidir. K vitamini yokluğunda bu maddelerin konsantrasyonu çok düştüğünden pıhtılaşma neredeyse tamamen ortadan kalkar.

2.2. İskemi

İskemi, bir organ veya dokuyu besleyen kan damarlarının obstrüksiyonu veya daralması sonucu, ilgili bölgeye gelen kan akımının azalması yada durmasına bağlı olarak doku ve organın yetersiz kanlanması ile; dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının sağlanamadığı ve ayrıca oluşan atık ürünlerin de uzaklaştırılmadığı bir süreç olarak tanımlanır (Atila ve ark. 2002). Bu süreçte hücrel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi neticesinde hücrel hasar meydana gelmektedir (Kahraman ve ark. 2003). Oluşan iskemik hasar, dokunun iskemiye olan duyarlılığı ve hipoksiye maruz kalma süresine bağlı olarak hücre ölümüne kadar gerçekleşen pek çok olaya neden olmaktadır (Tullis ve ark. 1996).

İskemik dönemde dokuya gelen kan akımının azalması ya da kesilmesi ile oksidatif fosforilasyon azaldığı için enerji kaynağı olan fosfokreatin ve ATP sentezi de azalmaktadır (Jennings ve Reimer 1991). ATP üretiminin durmasıyla hücre membranında bulunan ATP bağımlı pompalardan Na^+K^+ -ATPaz pompasının inhibe olması sonucunda hücre içinde K^+ iyonları azalırken, Na^+ ve Cl^- iyonları hücre içinde birikerek hücrelerde şişmeye neden olmaktadır. Diğer ATP bağımlı çalışan Ca^{+2} pompası da hücre içi ve hücre dışı Ca^{+2} dengesini sağlarken (her ATP hidrolizi için 2 Ca^{+2} hücre dışına pompalanır), ATP yoksunluğuna bağlı inhibe olmasıyla hücre içi Ca^{+2} miktarı artmaktadır. Ayrıca artan Na^+ iyonunu dengelemek için ATP bağımlı olmayan Na^+ - Ca^{+2} pompası da intraselüler Ca^{+2} miktarını artırır. Artan hücre içi Ca^{+2} miktarı hücre için sitotoksik olup, fosfolipaz ve proteolitik enzimleri aktive ederek membran fosfolipidlerinin yapısını bozar ve membran permeabilitesini değiştirir (Carini ve ark. 1999). Ayrıca hipoksi süresi uzadıkça fosfolipazların aktivasyonu sonucu oluşan araşidonik asit, mitokondriyal enzimleri inhibe edip serbest radikal oluşumunu artırarak hücrel hasara neden olmaktadır (Phillis ve O'Regan 2003).

Enerji açığına karşılamak için anaerobik glikoliz ile ATP üretilmeye çalışılır. Ancak glikojenin hızla tükenmesi ve biriken metabolitlerin kan yoluyla uzaklaştırılmaması sonucu, laktik asit ve karbondioksit birikimiyle hücre içi pH düşer ve bunun sonucunda asidoz meydana gelmektedir (Kumar ve ark. 2000).

İskemi döneminde, ATP üretimi durmuş olmasına rağmen, kullanımı devam ettiği için ATP'den, adenozin monofosfat (AMP) ve adenozin oluşumu hızla artar. Artan adenozin difüzyonla hücre dışına geçerek inozin ve hipoksantine parçalanır. Normal şartlarda hipoksantin, ksantin dehidrojenaz (KDH) tarafından elektron alıcı olarak NAD^{+} (nikotinamid adenin dinükleotid) kullanarak ürik asit ve ksantine metabolize olur. İskemi durumunda ise pürin metabolitlerinin birikmesi sonucu KDH, ksantin oksidaza (KO) dönüştüğü için; hipoksantin, KO tarafından elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanarak metabolize edilir (Parks ve ark. 1988).

2.3. Reperfüzyon

Reperfüzyon, iskemiye maruz kalmış dokuda kan akımının tekrar normale dönmesiyle ihtiyaç duyulan enerji ve oksijenin yeniden sağlandığı, toksik metabolitlerin ise uzaklaştırılmaya çalışıldığı bir süreç olarak tanımlanır (Siemionow ve Arslan, 2004). Kan akımının tekrar başlaması ile hipoksiye maruz kalan dokuya oksijenin ulaşması sonucu hızla oluşan SOR'un ciddi bir hasara yol açtığı gösterilmiştir. Oluşan SOR türlerinin rol aldığı bu hasar mekanizmasının iskemik hasardan daha fazla hasara yol açtığı bilinmektedir (Şehirli Ö ve ark. 2008, Canbek ve ark. 2008). Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücresel yapılar; zar lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir. Bu hasarın oluşumunda başlıca iki mekanizma etkilidir. Bu mekanizmalardan biri; iskemik dönemde dokuda biriken KO'nun reperfüzyon sürecindeki oksijeni kullanarak hipoksantini metabolize ederken çok miktarda serbest radikal oluşumuna neden olması. Diğeri ise; hücrenin enerji kaynağının ortadan kalkması ile ATP bağımlı iyon kanallarının işlevselliğini kaybetmesi sonucu, hücre içinde biriken Na^{+} iyonlarının reperfüzyon sürecinde Ca^{+2} iyonları ile yer değiştirmesidir. Böylece artan Ca^{+2} iyon konsantrasyonu fosfolipaz ve proteazları aktive ederek hücre membranında hasara neden olmaktadır (Jennings ve Reimer 1991, Wilhelm 1990, Udassin ve ark. 1994).

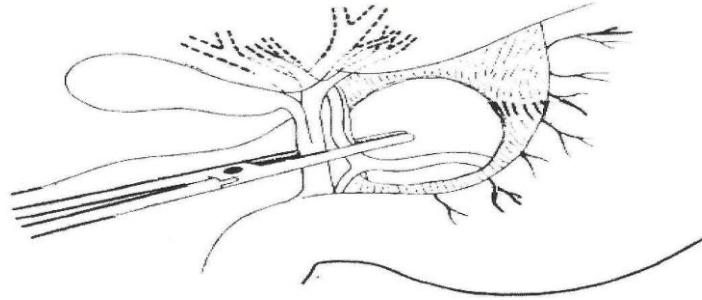
Ayrıca iskemi döneminde uzaklaştırılmayan toksik metabolitlerin birikimiyle, antioksidan mekanizmanın olumsuz etkilenmesi de reperfüzyon sürecinde hücrenin hasara karşı savunmasız kalmasına neden olur (Valko ve ark. 2007).

2.4. Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı

Dokuda gelişen İ/R hasarının şiddeti; tıkanan vasküler yapının boyutu, tıkanma süresi ve dokunun karakteristik özelliği ile değişmektedir. İskemi neticesinde oksijenin azalması söz konusu olduğu için, oksijene hassas olan beyin, kalp, karaciğer ve böbrek gibi organlar başta olmak üzere aerobik metabolizmaya sahip pek çok doku ve organ İ/R hasarının hedefindedir.

Karaciğer İ/R hasarı, özellikle vasküler cerrahi işlemlerde, karaciğer transplantasyonu sırasında ve sonrasında, hemorajik şok gibi sık karşılaşılan klinik durumlarda mortaliteyi etkileyen önemli bir hasardır (Mandrekar ve Szabo 2011). İ/R hasarı ilk olarak 1975 yılında deneysel karaciğer naklinin yapıldığı deneysel bir çalışmada ortaya çıkmıştır (Baykara ve Tekmen 2005).

On dokuzuncu yüzyılda yaşamış olan ünlü cerrah Dr. James Hogarth Pringle, karaciğer travmalarında ve karaciğer cerrahisinde hemostazı sağlamak için hepatik arter ve portal veni klemplayerek kan akımını engelleyen ve günümüzde “Pringle Manevrası” olarak bilinen tekniği geliştirmiştir.



Şekil 2.8. Pringle Manevrası (Asensio ve ark. 2000)

Portal triad klemplenerek kanama kontrol altına alındıktan sonra klempin kaldırılması ile kan akımı tekrar sağlanır. Ancak uzamış iskemik ve reperfüzyon aşamasında karaciğerde İ/R hasarı meydana gelmektedir (Kim 2003, Clarke ve ark. 2011). Karaciğer cerrahisinde kanamayı kontrol altına almak için uygulanan pringle manevrası dışında, hipoksi, konjestif kalp yetmezliği, sistemik kan basıncının düşmesi ve solunum yetmezliği de karaciğerde İ/R hasarına neden olabilir (Mandrekar ve Szabo 2011). Oluşan bu hasar hepatoselüler hasara neden olabileceği gibi yakın ve uzak organ disfonksiyonuna da neden olur. Karaciğerin metabolik fonksiyonlarını göz önünde bulundurursak İ/R hasarının mortaliteyi etkileyebileceği düşünülebilir. Bu nedenle bu konu üzerine yapılan bütün

deneysel çalışmalar da mekanizmayı açıklamaya ve hasarı azaltabilmek veya önleyebilmek için bir çözüm bulmaya yönelik olarak yoğunlaşmıştır. İskemi süresinin uzunluğu İ/R hasarının derecesi ile ilişkili olduğundan, kısa ve aralıklı iskemi çalışmalarında uzun süreli uygulamalara nazaran daha az karaciğer disfonksiyonuna neden olacağı için, özellikle kronik karaciğer hastalıklarındaki hasarı açıklamak ve önlem alabilmek açısından önem arz etmektedir.

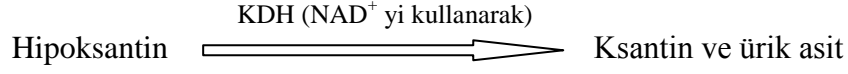
Karaciğerin İ/R hasarına tolerans derecesi ise; iskemiden önce parankimin durumu ile yakından ilişkili olup, kronik karaciğer hastalığı olanlarda, sağlıklı bireylere nazaran İ/R hasarına karşı daha hassastır. Yine yaş ve cinsiyette bu toleransı belirleyen diğer faktörlerdir. Deneysel çalışmalarda yapılan hayvan modellerinde ise erkek hayvanların iskemiye karşı daha hassas olduğu bilinmektedir (Yokoyama ve ark. 2007).

2.5. Karaciğer İskemi / Reperfüzyon Hasarı Fizyopatolojisi

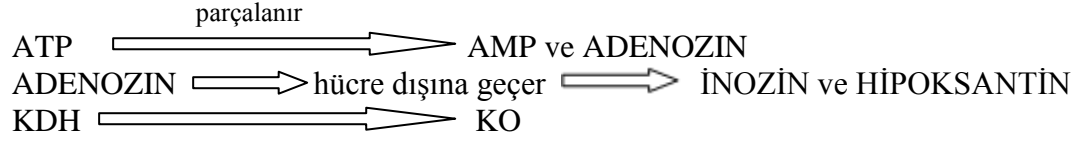
Karaciğer İ/R hasarının fizyopatolojisi, tam olarak anlaşılmış olmasa da incelendiğinde birbirleriyle ilişkili kompleks birtakım hücrel ve humoral olayların rol aldığı görülmektedir.

İskemik dönemde kan akımının kesilmesi ya da azalması ile birlikte oluşan hipoksinin ilk etkisi oksidatif fosforilasyonun azalması şeklinde başlar. Hücrenin enerji kaynağı olan ATP üretimi oldukça azalır ve anaerobik metabolitler hücrede birikmeye başlar. Membran üzerindeki ATP bağımlı Na^+/K^+ ve Ca^{+2} pompalarının inhibe olması ile hücre içinde Na^+ ve Ca^{+2} artışı devam eder. Artan Na^+ , suyun izoosmotik basıncı ile akut hücrel şişmeye neden olur. Hücre içi Ca^{+2} 'un artışı da membran hasarını ilerleten çeşitli fosfolipazları, membran proteinlerini katabolize eden proteazları, ATP kaybını hızlandıran ATPazları ve endonükleazları aktive ederek İ/R hasarını gerçekleştirir (Carini ve ark. 1999). ATP üretimi durmuş olmasına rağmen tüketimi devam ettiği için ATP'den AMP ve adenozin oluşur. Hücre dışına difüze olan adenozin, inozin ve hipoksantine parçalanır. Dokuda biriken pürin metabolitleri KDH'ın KO'a dönüşümüne yol açar. Normal şartlarda KDH elektron alıcı olarak NAD^{+1} kullanarak hipoksantini ürik asite parçalarken iskemi sırasında hipoksantin birikir. Reperfüzyonla beraber KO dokuya ulaşan oksijeni kullanarak hipoksantini metabolize ederken SOR'da aşırı bir artış gözlenir (Parks ve ark. 1988, Şener ve Yeğen 2009).

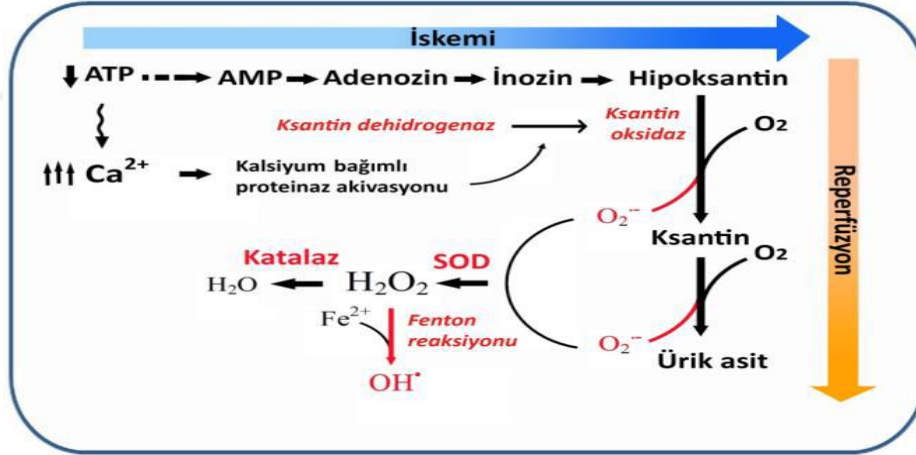
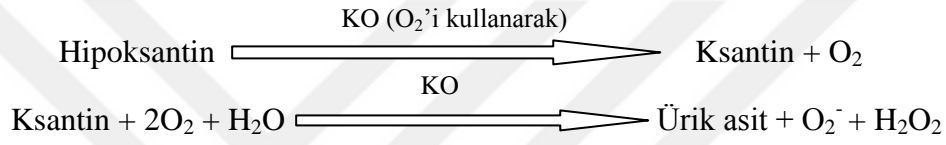
Normal şartlarda:



İskemide:

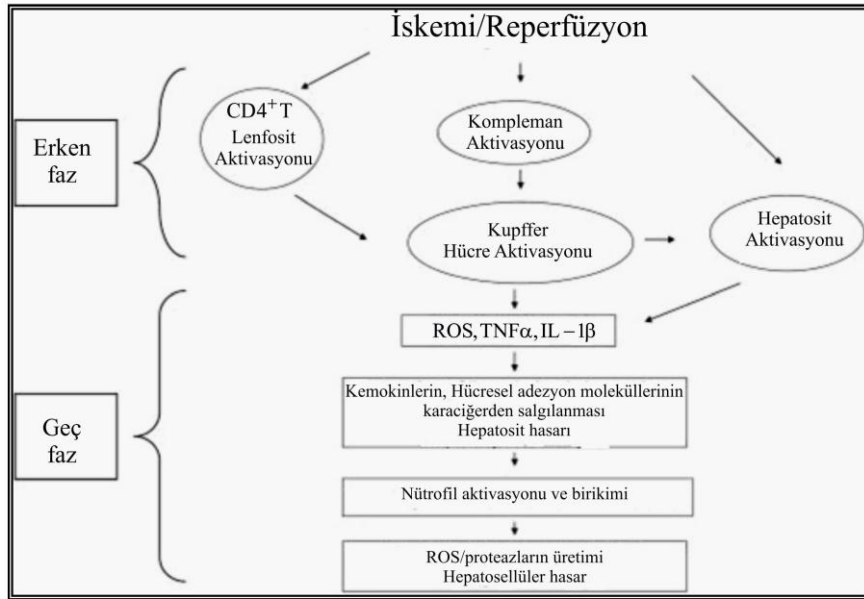


Reperfüzyon ile:



Şekil 2.9. İ/R hasarında SOR'nin oluşumu (Özcan ve ark. 2015)

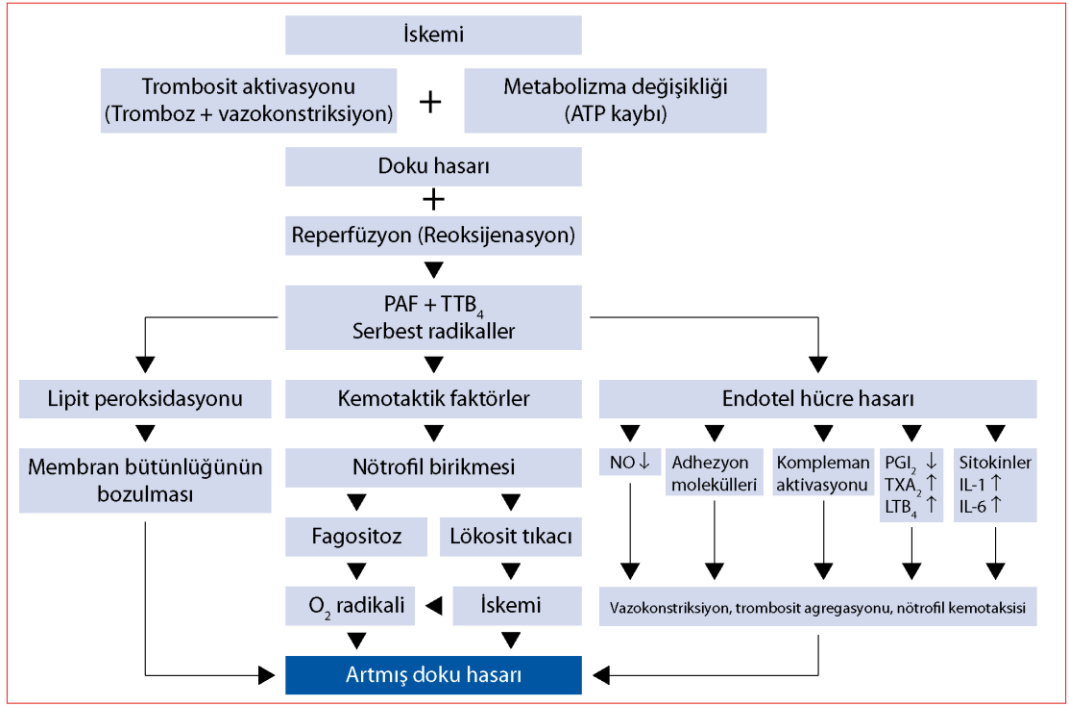
İskemik hasardan sonra oluşan reperfüzyon hasarı ise akut ve subakut faz olmak üzere iki fazda ilerler (Fondevila ve ark. 2003).



Şekil 2.10. İ/R hasarının sistematığı (Sağlık 2011)

Akut faz; reperfüzyon safhasını takiben ilk 3 ve 6 saatler arasında serbest radikal oluşumu, T lenfosit ve Kupffer hücre aktivasyonu, endotel hücre şişmesi, vazokonstriksiyon ve sinüzoidal konjesyonların oluştuğu, hepatik mikrosirkülasyonun bozularak hepatosellüler hasarın ortaya çıktığı fazdır. Akut fazda hücre içinde Ca^{+2} artışı da hepatosit hasarını başlatan önemli mekanizmalardan biridir ayrıca apoptoz ve nekroz oluşumunu da aktive etmektedir. İskemi boyunca hücrede Ca^{+2} artışı gözlenmezken, reperfüzyon sürecinin ilk dakikasından itibaren aşırı Ca^{+2} artışı gözlenir.

Subakut faz ise; reperfüzyon sonrası 18 ve 24. saatler arasında masif nötrofil infiltrasyonu ile geniş nekrozlar oluşarak geri dönüşümsüz hasarın oluştuğu fazdır. Fazların bu süreçlerinden dolayı İ/R hasarının tedavi potansiyelini araştıran deneysel çalışmalarda nötrofil aracılı inflamasyon, doku nekrozu ve organın disfonksiyonunu önlemek amacıyla erken dönemler yani akut faz hedef olarak alınmaktadır (Fondevila ve ark. 2003).



Şekil 2.11. İ/R hasarının fizyopatolojisi (Şener ve ark. 2007)

Tüm bu süreçlerden anlaşılmaktadır ki iskemik süreçte başlayan hücre hasarı, reperfüzyon sürecinde artarak devam eden hücre hasarı ve humoral olaylar serisidir. Özellikle; SOR, Polimorf Nüveli Lökositler (PNL), kompleman sistem ve endotel hücreleri hasarın başlıca nedenleri arasında sayılmaktadır.

2.5.1. Hücresel Mekanizmalar

İskemi sürecinde kan akımının azalması ya da kesilmesi sonucu oksijen kaynağının kesilmesi ile glikojen tüketimi neticesinde Kupffer hücreleri, Sinüzoidal endotel hücreleri (SEC) ve hepatositlerde ATP üretimi azalır. ATP üretiminin durmasıyla hücre membranında bulunan ATP bağımlı pompalardan Na^+K^+ -ATPaz pompası çalışmaz ve hücre içi Na^+ birikimini hücre hasarı ve şişlik takip eder. Kupffer hücreleri ve SEC’de şişme gerçekleşirken endotelin, tromboksan A_2 gibi vazokonstrüktörlerde artış ve nitrik oksit gibi vazodilatörlerde azalma meydana gelmektedir. Oluşan bu yapısal değişiklikler ile sinüzoidler daralır (Carden ve Granger 2000).

İskemi sonrası reperfüzyon ile kan akımı yeniden sağlanmasına rağmen, daralmış olan sinüzoidlerde nötrofil ve trombosit agregasyonu artışından dolayı mikrosirkülasyon bozulur, hatta bazı alanlarda no-reflow fenomeni olarak adlandırılan kan akışının olmadığı görülür (Summers ve Jamison 1971).

2.5.1.1. Kupffer Hücreleri

Sinüzoidal endotelin üstünde yer alan Kupffer hücreleri, retikuloendotelial sisteme ait önemli bir hücre grubudur. Hepatik İ/R sürecinde, interlökin-1 (IL-1) ve tümör nekrozis faktör (TNF- α) salgılayarak hücrel hasarın başlatılmasında ve yayılmasında kilit rol oynayan hücrelerdir (Wu ve ark. 2003).

Kupffer hücreleri, iskemi sürecine göre reperfüzyon sürecinde daha çok aktive olan hücrelerdir. Bu hücreler aktive olarak, İ/R hasarının oluşumunda önemli rol oynarlar; reaktif oksijen ve nitrojen radikalleri, proinflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-1 β gibi) veya antiinflamatuvar sitokinlerin (IL-10, IL-13 gibi) sentez ve aktivasyonunu da artırır (Baykara ve Tekmen 2005).

Reperfüzyonun akut fazında, artan Ca²⁺ miktarı fosfolipaz A₂'yi aktive eder. Fosfolipaz A₂ membran fosfolipitlerini araşidonik asite çevirir. Araşidonik asitin son ürünleri olan eikozanoidler ise Kupffer hücreleri tarafından salınırlar. Dolayısıyla reperfüzyon sürecindeki eikozanoidlerin plazma konsantrasyonundaki artışı Kupffer hücrelerinin aktivasyonu ile gerçekleşmektedir (Astarcioglu 1998).

2.5.1.2. Nötrofiller (PNL) ve Sinüzoidal Endotelial Hücreler

İ/R süreci ile birlikte lökositlerin aktivasyonu ve migrasyonunu takiben lökosit endotel hücre adezyonu meydana gelmektedir. PNL özellikle yüksek oranda SOR artışına neden olmasının yanı sıra vasküler permeabiliteyi artırarak mikrovasküler sirkülasyonu engellemesi ve proteolitik enzimleri salgılamasıyla bilinmektedir (Frangogiannis 2007).

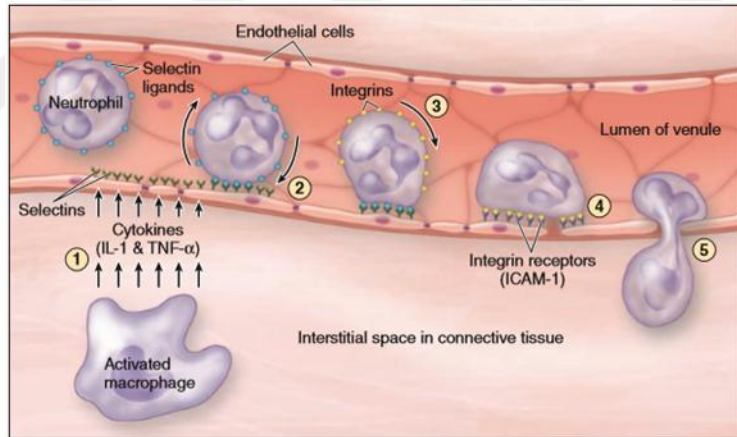
Reperfüzyonun ilk dönemlerinde birikmeye başlayan nötrofiller subakut dönemde oldukça önem kazanırlar. Sinüzoidlerde nötrofil birikimi ile SEC'de şişme, platelet adezyonu ve sinüzoidlerde tıkanma meydana gelmesiyle birlikte; SOR'un salınması, KO enzim aktivasyonu ve sitoplazmik veziküllerde bulunan bazı enzimlerin de ortama salgılanması ile hepatositlerde apoptoza doğru giden progresif bir süreç olarak gerçekleşir. Bu süreci başlatan nötrofillerin SEC'e yapışması adezyon molekülleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Nötrofillerin yüzeyinde bulunan selektin ve integrinler ile SEC ve hepatositlerin yüzeyinde bulunan intersellüler adezyon molekül-1 (ICAM-1) ve vasküler adezyon molekül-1 (VCAM-1) etkileşimleri ile nötrofillerin, epitel hücrelerine adezyonu gerçekleşir (Smith ve Jaeschke 1995). Selektinlerin L, P ve E olmak üzere üç alt tipi bulunmaktadır. İ/R süreci ile endotelde P-selektin ekspresyonu artar ve nötrofil yüzeyinde bulunan reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteli lökosit endotel bağlantısını oluşturur.

Nötrofil üzerinde bulunan L-selektin, kan akımının kesilmesi ile hücreyi ölüme götürebilecek bir reseptördür. Nötrofiller aktive olduğunda β -integrin reseptörleri artar ve L-selektinler membrana yayılarak adezyon moleküllerinin aktive olmasıyla hasar derinleşmeye başlar. Nötrofillerin yapıştığı endotelial hücrelerin yüzeyinde bulunan ICAM-1, immünoglobülin ailesinden olup özellikle nötrofil aracılı hasarın önemli bir belirteçidir.

Hepatik İ/R sürecinde artan TNF- α ve IL-1 gibi proinflamatuvar ve immünoregülatör sitokinler, ICAM-1 üretimini transkripsiyonel olarak uyarılmaktadırlar. Bundan dolayı karaciğer İ/R hasarında, TNF- α ve IL-1'in artışı ile beraber ICAM-1 salınımında da artış gözlenir (Montalvo-Jave 2008).

Yapılan çalışmalarda, anti ICAM-1 ve P-selektin antikorlarının uygulandığı ratlarda karaciğer İ/R hasarında azalma görülmüştür (Yadav ve ark. 1999).

Yine karaciğer transplantasyonlarındaki transplante doku reddi de reperfüzyonun akut fazında salınan ICAM-1 düzeyi ile ilişkili olduğu gösterilen çalışmalar arasındadır (Warle ve ark. 2003).



Şekil 2.12. PNL hücrelerinin (nötrofillerin) aktivasyonu ve gelişen olaylar (Ersöz 2015)

2.5.1.3. Plateletler

Plateletler, sinüzoidlere yapışarak reperfüzyon sürecinde mikrosirkülasyonun bozulmasına yol açar. Trombosit aktive edici faktör (PAF), fosfolipid mediatörü olarak vasküler permeabilite artışını sağlamasının yanında, nötrofillerin dokuya gelebilmeleri için gerekli kemotaktik faktörlerden birisidir (Frangogiannis 2007).

Yapılan çalışmalarda reperfüzyon öncesi PAF reseptör antagonisti uygulanan ratlarda, PAF reseptör antagonisinin, TNF- α 'yı baskılayarak hasarı azalttığı gösterilmiştir (Oğuz 2010).

2.5.2. Humoral Mekanizmalar

2.5.2.1. Komplemanlar

Hepatik İ/R hasarında proteinlerin salınımına bağlı olarak 3 farklı yolakla (klasik, alternatif ve mannoz bağlayıcı lektin) aktive olan kompleman sistemin aktivasyonu sonucu; C3a, C5a, iC3b ve C5b-9 proinflamatuvar komponentler oluşur. Bu komponentlerden özellikle C3a ve C5a lökositleri aktive eden anaflatoksinlerdir.

Ayrıca C5a kompleman faktör; makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b, TNF- α , IL-1, IL-6 ve monosit kemoatraktan protein (MCP)-1 üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı aktive eder.

C5b-9 da, endotelde IL-1 ve IL-8 sentezini uyararak lökosit aktivasyonunu ve kemotaksisi artırırken; endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek endotelde siklik guanozin monofosfatı (cGMP) azaltır ve böylece vasküler tonusu bozar (Zhang ve ark. 1999).

Genel olarak da hepatik İ/R hasarının başlangıcı ile birlikte aktive komplemanlar, membran atak kompleksini oluşturarak direk hücre hasarı oluşturabilirler. Aynı zamanda kemotaktik ajanların ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini uyararak veya nötrofil ve Kupffer hücre aktivasyonunu uyararak da hasar mekanizmasının oluşumunda rol alırlar (Sawaya ve ark. 1999).

2.5.2.2. Sitokinler

Sitokinler, hastalıkların fizyopatolojisinde rol alan ve terapötik potansiyeli bulunan multi fonksiyonel polipeptidlerdir. İmmün sistem hücrelerinin aktivitelerini dikkate alarak, inflamatuvar yanıtları desteklediği ve hematopoez gibi birçok fizyolojik olayda önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Sitokinler, aralarındaki fonksiyonel benzerliklere ve etki mekanizmalarına göre isimlendirilerek, başlıca şu ana gruplara sınıflandırılmıştır:

A) Doğal İmmünite Mediatorleri Olan Sitokinler;

Tip 1 İnterferonlar TNF IL-1 IL-6 Kemokinler

B) Lenfosit Aktivasyonu, Büyüme ve Farklılaşmayı Düzenleyen Sitokinler;

IL-2 IL-4 Transforming Growth Faktör (TGF)

C) İnflamasyon Durumunda Düzenleyici Rol Oynayan Sitokinler;

İnterferon-gama (IFN- γ) Lenfotoksin (Nötrofil aktivatörü)

IL-5 (Eozinofil aktivatörü) IL-10 IL-12

Sitokinler, hedef hücrede membran reseptörlerine bağlanarak, karaciğer İ/R hasarında inflamatuvar yanıtın başlaması ve sürdürülmesinde proinflamatuvar ya da antiinflamatuvar olarak önemli role sahiptirler. İnflamasyonun başlangıcında proinflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-1) salınarak inflamasyonun şiddetini artırırlar (Tao ve ark. 2016). Yardımcı sitokinlerin (IL-6, IL-8) salınımıyla beraber inflamatuvar hücreleri aktive ederek immün yanıtı oluştururlar. İnflamasyonun sonraki evrelerinde ve iyileşme sürecinde de antiinflamatuvar sitokinler (IL-10, IL-11, IL-13) salınır (Chen ve ark. 2006).

Hepatik İ/R hasarı ile beraber Kupffer hücrelerinin aktivasyonu ile TNF- α , IL-1 ve IL-6 salgılanır. TNF- α ile IL-1, IL-8 sentezini uyarır ve adezyon molekülleri sentezini artırır (Liu ve ark. 2015, Güner ve ark. 1997).

2.5.2.3. Tümör Nekrozis Faktör (TNF- α)

İnflamasyon ile birlikte makrofaj, nötrofil, aktive T hücreleri, Natural killer (NK) hücreleri, endotel hücreleri ve aktive mast hücreleri tarafından TNF- α salgılanmaktadır. Salgılanan bu protein, vasküler endotel hücrelerinin adezyon molekülleri sentezini artırarak makrofajların, hücreler arasında kemotaksiye aracılık eden kemokin (IL-8) salgılamasını sağlar. Böylece nötrofil ve monositlerin inflamasyon alanına göçünü sağlamaktadır. Ayrıca TNF- α , IL-1 salınımını da arttırarak IL-1 ile birlikte nötrofilleri aktive ederek, İ/R sürecinde hasarın derinleşmesine neden olan serbest radikal oluşumunu da tetiklemektedir (Güner ve ark. 1997, Montalvo-Jave 2008).

TNF- α , vasküler düz kasları gevşeterek kan basıncını azaltma yoluyla ve vasküler endotelin prokoagülan ve antikoagülan aktiviteleri arasındaki dengeleri değiştirerek intravasküler koagülasyona neden olarak doku perfüzyonunu azaltmaktadır (Vasalli 1992).

Kupffer hücreleri tarafından üretilen TNF- α , hepatik İ/R sürecinde artış gösterip hasarı da beraberinde getirirken; ICAM-1 ve VCAM-1 gibi adezyon moleküllerini de aktive ederek hasarın daha da artmasına neden olmaktadır (Montalvo-Jave 2008).

2.5.2.4. İnterlökin-1 (IL-1) / İnterlökin-6 (IL-6)

Kupffer hücrelerinden salgılanan IL-1, endotel hücrelerine etki ederek pıhtılaşmayı artırması ve adezyon moleküllerinin sekresyonunu artırması gibi birçok etkisi ile TNF- α 'nın birçok inflamatuvar özelliğini paylaşmaktadır. Hepatik İ/R hasarında TNF- α 'nın oluşturduğu doku zararını, SOR üretimi ile nötrofil göçü ve adezyonunu artırarak potansiyalize etmektedir (Montalvo-Jave 2008).

Ayrıca IL-1, endotel hücrelerini uyararak kemokinlerin sentezini uyarır ve böylece nötrofil gibi inflamatuvar lökositleri aktive ederek nötrofillerden SOR üretimini tetiklemektedir. TNF- α ve IL-1'in, IL-8 sentezini uyararak adezyon moleküllerinin sentezini artırdığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda IL-1 reseptör antagonistlerinin, TNF- α seviyesini düşürdükleri gösterilerek İ/R hasarını azalttıkları belirtilmiştir (Kato ve ark. 2002). Dolayısıyla hepatik İ/R hasarında, TNF- α ve IL-1 artışı, İ/R hasarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.

İnflamasyonun başlangıcında Kupffer hücrelerinin aktivasyonu ile proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α ve IL-1 salınarak inflamasyonun şiddetini artırmaktadır. TNF- α ve IL-1'e göre nispeten biraz daha gecikmeli olarak SEC ve Kupffer hücrelerinden yardımcı sitokinlerden IL-6 salınır ve inflamatuvar hücreleri aktive ederek immün yanıtı oluşturduğu bilinmektedir (Baykara ve Tekmen 2005, Dogan ve Aslan 2011). IL-6'nın inflamatuvar süreçteki rolü hakkında hala tartışmalar olsa da özellikle reperfüzyonun akut fazında protein sekresyonunu düzenlediği bilinmektedir (Berber ve ark. 2008). Ayrıca lökositlerin inflamasyon alanına göçlerinde rolü olduğu belirtilerek IL-6 eksikliği olan sıçanların hücre infiltrasyonununun tam olmadığı gösterilmiştir (Hurst ve ark. 2001).

Yapılan çalışmalarda IL-6'nın hepatosit artışını düzenlediği gösterilerek muhtemelen akut fazda regüle edici bir faktör olduğu düşünülmektedir (Wang ve ark. 2012).

2.5.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, aerobik metabolizma sürecinde hücrel fonksiyonun bir elemanı olup fizyolojik olarak antioksidan dengesini koruyacak şekilde, düşük seviyelerde

hücrelerden üretilmektedir. İ/R sürecinde, hücre ve doku hasarına yol açan en önemli faktörlerden biri olup hepatik İ/R sürecinde Kupffer hücreleri, PNL ve endotel hücreleri tarafından sürekli olarak üretilmektedir (Çakatay ve Kayalı 2006).

Serbest radikallerin artışı ile antioksidan dengesinin bozulması sonucu, oldukça reaktif olan serbest radikaller, yağ asidi açısından zengin olan hücreler ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna neden olur ve membran yapısını bozarak membran permeabilitesini artırır, bu da iyon geçişlerinde bozulmaya neden olur (Akkuş 1995).

2.5.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)

Solumuyla alınan oksijenin % 95'i, ATP üretimi için mitokondrilerde kullanılırken yaklaşık % 5'i, ortaklanmamış elektron bulunduran ve hücreler için sitotoksik olan toksik SOR'a dönüşür (Şener ve Yeğen 2009). Aerobik koşullarda oluşan SOR hücrenin sahip olduğu antioksidan sistemi sayesinde sitotoksik olmayan ürünlere dönüştürülür. Ancak aşırı SOR artışı ya da antioksidan sistemin yetersizliği ile oksidatif stres meydana gelmektedir (Çakatay ve Kayalı 2006).

İ/R hasarı ile plazmada artan; komplemanlar, sitokinler, araşidonik asit türevleri ve PAF gibi proinflatuar ajanlar olsa da hasarın temelinde reperfüzyon sürecinde dokunun oksijenlenmesi sonucu oluşan SOR bulunmaktadır (Bless ve ark. 1999). İskemi sürecinde oluşan KO aktivitesi sonucu ve reperfüzyon sürecindeki dokunun oksijenasyonu sonucu artan SOR, lipid peroksidasyonunu başlatarak hücre hasarına neden olmaktadır. Özellikle İ/R sürecinin akut fazı oksidatif stres ile karakterize olduğu için hepatik İ/R hasarının en belirgin göstergelerinden biri de oksidatif stres parametrelerinin artışıdır (Lentsch ve ark. 2000).

En önemli SOR; Süperoksit radikali (O_2^-), Hidrojen Peroksit (H_2O_2), Hidroksil radikali (OH^\cdot) ve Singlet Oksijen ($O_2^{\uparrow\downarrow}$)'dir. Mitokondriyel enerji metabolizmasında tüketilen oksijenin % 1-5 kadarı süperoksit radikali olarak sonlanmaktadır. Direk olarak fazla zarar vermeyip hidrojen peroksit kaynağı olarak dolaylı yoldan hem lipid peroksidasyonunu başlatır hem de antioksidanları oksitleyebilmektedir.

Hidrojen peroksit, serbest radikal olmayıp özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile ya da bakır ile reaksiyon vererek güçlü oksitleyici özelliği olan demir formlarını oluşturarak hücre membranında lipid peroksidasyonunu başlatır ve hidroksil radikalini oluşturur (Günaydın ve Çelebi 2003, Halliwell ve ark. 2000).

Metal iyonlarının varlığında hidrojen peroksitten oluşan hidroksil radikali, serbest radikaller içinde en reaktif molekül olup birçok molekülle reaksiyon verebilir. Yarılanma ömrü çok kısa olduğu için reaksiyonu ciddi hasarlar oluşturur (Günaydın ve Çelebi 2003, Halliwell 1994).

Singlet oksijen, radikal olmayıp ancak oldukça reaktif olan bir moleküldür. Doymamış yağ asitleri ile direk olarak reaksiyona girerek peroksil radikalini oluşturabilirken hidroksil radikali kadar etkili bir şekilde, lipid peroksidasyonunu başlatabilmektedir (Akkuş 1995).

2.5.4. Antioksidanlar

Farklı mekanizmalar sonucu oluşan serbest radikallere karşı vücudun savunma mekanizması antioksidanlar sayesinde sağlanmaktadır. Organizmada sürekli serbest radikal üretimi olmasına rağmen antioksidan sistem ile dengede olduğu için oksidasyon engellenerek hücreler, hasara karşı korunmaktadırlar. Antioksidan savunma ile serbest radikal üretiminin önlenmesi, oluşan aşırı serbest radikallerin detoksifikasyonu, hücre hasarının giderilmesi ve sekonder radikal oluşumunun engellenmesi sağlanır. Bu dengenin oksidanlar açısından artışı durumunda ise oksidatif hasar meydana gelmektedir (Halliwell 1994).

Antioksidanlar genel olarak endojen ve ekzojen kaynaklı olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılırken; endojen antioksidanlar, enzimatik ve non-enzimatik olarak iki gruba ayrılmaktadır. Enzim olan endojen antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), glutatyon transferaz (GST), glutatyon redüktaz ve mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemden oluşmaktadır (Valko ve ark. 2007). Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar ise; bilirubin, albümin, ürik asit, melatonin, α -tokoferol (E vitamini), askorbik asit (C vitamini), transferrin, ferritin ve glutatyon (GSH) gibi maddeler ile savunma sistemini oluşturmaktadırlar. Bu antioksidanlardan hücre membranında bulunan α -tokoferol, lipid peroksidasyon zincirini kırarak; ürik asit, KO'ı inhibe ederek; askorbik asit ise suda eriyebilirliği ile serbest radikal toplayıcılığı yanında, α -tokoferol'ün etkisini artırarak; sekonder serbest radikal oluşumunu zincir kırıcı reaksiyonlar ile engellemekte veya serbest radikal oluşumunu azaltmaktadır (Glantzounis ve ark. 2005).

2.5.4.1. Total Antioksidan Seviyesi (TAS)

Solunum ile alınan oksijenin yaklaşık % 5'i, ortaklanmamış elektron bulundurduğu için serbest radikal olarak hücre için sitotoksik olup oksidatif stres oluşturabilecekken; antioksidan savunma sistemi ile bu hasar tolere edilmektedir. Total antioksidan kapasiteyi oluşturan antioksidanların büyük çoğunluğu plazmada bulunmaktadır. Plazmada bulunan bu antioksidanlar serbest radikalleri tutarak ya da zincir kırıcı reaksiyonlar göstererek oksidatif hasarı engellerler. Plazmada bulunan total antioksidan kapasitesinin % 85'inden fazlasını albümin, ürik asit ve askorbik asit gibi antioksidan moleküller teşkil etmektedir (Yao ve ark. 1998). Büyük çoğunluğu plazmada bulunan antioksidanlar, sinerjistik bir etki göstererek tek başlarına yaptıkları etkiden daha büyük bir etki oluşturmaktadır. SOD'un hidroksil radikalini hidrojen peroksit'e çevirmesi, CAT'ın da peroksit nötralizantı olması ya da glutatyonun askorbik asiti koruyup aktifleştirmesi yine askorbik asitin de α -tokoferolü aktive etmesi ve neticesinde peroksidasyonun önlenmesi, total antioksidanların sinerjistik etkisi olarak gösterilmektedir. Bu sinerjistik etkinin yanı sıra antioksidan miktarındaki azalışın diğer bir antioksidandaki artış ile dengelendiği de göz önünde bulundurulunca TAS'ın ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli veriler elde etmemizi sağlamaktadır. Bundan dolayı son yıllarda kandaki antioksidan seviyesini belirlemede, total antioksidan seviyelerini veren bu ölçüm oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Erel 2004, Ghiselli ve ark. 2000).

2.5.4.2. Total Oksidan Seviyesi (TOS)

Serbest radikal seviyesinin antioksidan seviyesine göre artışı, hücrelerde oksidatif hasarlara yol açar ve bu durum oksidatif stres olarak tanımlanır. Pek çok yöntem ile oksidan moleküllerin konsantrasyonları ayrı ayrı ölçülebilmektedir. Ancak oksidatif stresin arttığı durumlarda oksidan etkilerin birbiri üzerine eklenmesi göz önünde bulundurularak yine son yıllarda oksidan konsantrasyonlarının tek tek ölçümünden ziyade, toplam oksidan kapasitesinin ortaya konduğu yeni bir yöntem ile ölçümler gerçekleştirilmektedir (Erel 2005).

2.5.4.3. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

Oksidatif stres ve antioksidan durumun değerlendirilmesi için birçok farklı yöntem olmasına rağmen bu belirteçlerin ayrı ayrı ölçülmesi, hem sinerjistik etkilerinin hem de oksidan ve antioksidan dengelerinin totalde değerlendirilmesi açısından ve ayrıca hem

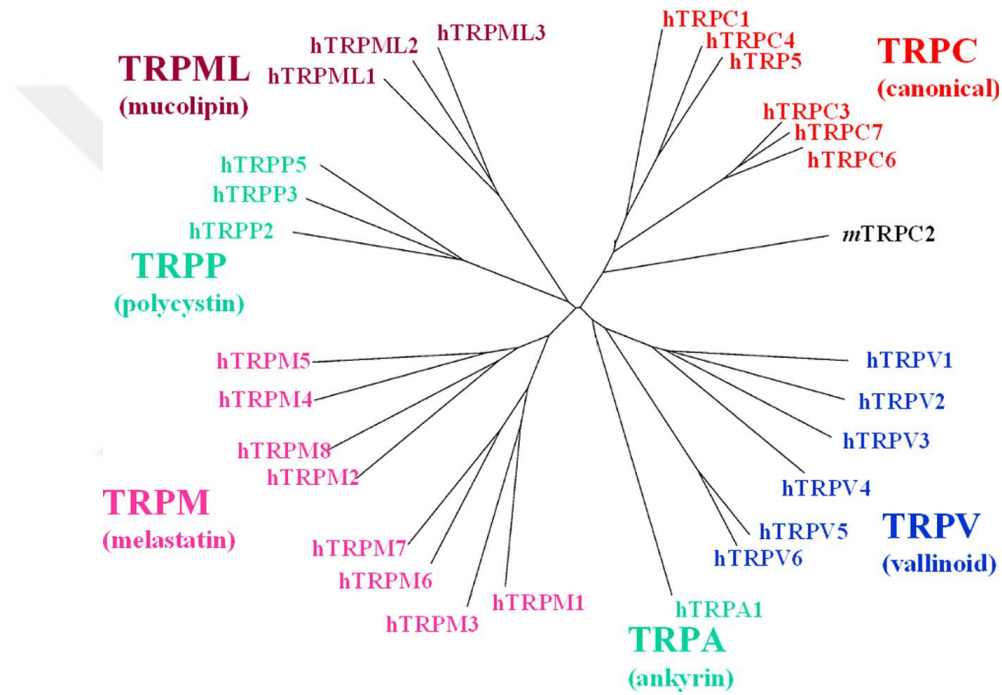
zaman hem de ekonomik olarak çok tercih edilmemektedir. Bundan dolayı son yıllarda TAS ve TOS ölçülerek oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplanmaktadır. OSI, oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılmakta olup oksidatif stres artışında, OSI değerinde anlamlı bir artış görülmektedir (Harma ve Erel 2003).

2.6. Transient Reseptör Potansiyel (TRP)

Transient reseptör potansiyel (TRP) kanalları ilk olarak 1998 yılında *Drosophila Melanogaster* türü sirke sineklerinin göz hücrelerinde bulunmuştur (Clapham 2003, Saygın ve Nazıroğlu 2010). *Drosophila* türünde fotoreseptör hücreleri ışık ile aktive edildiği zaman, membran devamlı olarak depolarize olmaktadır yani sürekli aydınlatmaya karşılık hücrelerden alınan cevap da sürekli olarak oluşmaktadır (Clapham 2003, Dadon ve Minke 2010). Ancak TRP proteinini kodlayan genlerde, ışığa karşı sürekli voltaj yerine 'transient' yani geçici bir voltaj cevabı oluşmakta ve bu mutasyona bağlı olarak da görsel defekt ortaya çıkmaktadır (Dadon ve Minke 2010). *Drosophila* türünde TRP olmadığı halde ışığa karşı voltaj yanıtının oluşumu, TRP'ye genetik yönden çok fazla benzerlik gösterdiği için 'TRP-Like' (TRPL) kanalları ile açıklanmıştır (Kraft ve Harteneck 2005, Montell ve Rubin 1989). Işık uyarımına karşı fotoreseptör hücrelerinin cevabı olan kuantum pikleri, yakalanan tekli ışığa karşı birçok kanalın aynı anda aktive olmasıyla oluşmaktadır. Kanalların birlikte aktivasyonu ile önce sinyal transdüksiyonu, sonra da oluşan sinyalin yükseltgenerek ilerlemesi ile kuantum pikleri oluştuğu için, hem TRP hem de TRPL'nin her ikisinin de Ca^{+2} 'a karşı geçirgen bir kanal veya ışıkla aktive olabilen taşıyıcı proteinler olabileceği düşünülmüştür (Montell 2001). Yapılan bu çalışmalar ve son analizlerle TRP protein dizisinin Ca^{+2} 'a geçirgen yeni bir katyon kanalı olma olasılığını arttırmıştır (Phillips ve ark. 1992, Hardie ve Minke 1992, Nilius ve ark. 2007). Memelilerde bulunan TRP kanalları, çevresel uyarılardaki değişiklikleri belirleyen biyolojik sensörler olarak günümüzde oldukça önem arz etmektedir. Sıcak, soğuk, mentol, acı ve çeşitli mekanik uyarımlarla açılan TRP kanalları; dokunma, duyma, görme, tat alma ve termal hassasiyet gibi duyuların algılanmasında; ya doğrudan plazma zarlarında bulunan Ca^{+2} kanalları gibi davranmakta ya da sitozolik serbest Ca^{+2} kanallarındaki değişime yardımcı olarak zar potansiyelini değiştirip Ca^{+2} giriş kanallarına etki ederek pek çok önemli mekanizmada çok önemli bir role sahiptir (Nilius ve ark. 2007, Özgül ve Nazıroğlu 2010, Kraft ve Harteneck 2005).

Yapılan çalışmalar sonucu aminoasit dizilerine göre TRP kanalları 7 alt aileden oluşmaktadır. Bu alt ailelerden altı tanesi memelilerde bulunur ki bunlar; TRP canonical (TRPC), TRP vanilloid (TRPV), TRP melastatin (TRPM), TRP mukolipin (TRPML), TRP polisistin (TRPP), TRP ankirin (TRPA). Sadece omurgasızlarda bulunan diğer alt kanal ise TRP nompc (TRPN)'dir.

Ayrıca TRPM, 8 farklı alt kanal grubuna, TRPC 7 farklı alt kanal grubuna, TRPV 6 farklı alt kanal grubuna, TRPML 3 farklı alt kanal grubuna, TRPP 3 farklı alt kanal grubuna, TRPA ise 1 farklı alt kanal grubuna sahiptir.



Şekil 2.13. TRP kanallarının alt kanal grupları (Nilius ve ark. 2007)

Bu kanalların çoğunluğu tek bir iyon kanalına seçici olmayan kanallardır. İstisnai durumlar olmakla beraber Na^+ ve Ca^{+2} 'a aynı anda geçirgen olan bu kanallardan özellikle, TRPM4 ve TRPM5 tek değerlikli katyonlara, TRPM6 ve TRPM7 Mg^{+2} 'a, TRPV5 ve TRPV6 Ca^{+2} 'a, TRPV1, TRPML6 ve TRPP3 ise H^+ 'a oldukça geçirgendir (Nilius ve ark. 2007, Miller 2006).

2.6.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin (TRPM) Kanalları

TRP ailesinin ilk tanımlanan üyesi bir tümör baskılayıcı protein olan TRPM'dir. 4 grup altında sınıflandırılan TRPM'nin 8 alt üyesi bulunmaktadır (Zhang ve ark. 2003, Alexhander ve ark. 2004).

1.Grup; TRPM1 - TRPM3

TRPM1'i aktive eden hala bilinmese de; TRPM3, Ca^{+2} ile aktive olmaktadır ve hücre içi Mg^{+2} düzeyi ile aktivasyonu düzenlenmektedir (Clapham 2003, Miller 2006).

2.Grup; TRPM6 - TRPM7

TRPM6 ve TRPM7'nin karboksi ucu ($COOH^-$) serin – treonin ile aktive olmaktadır ve bu kanallar Mg^{+2} 'a oldukça geçirgendir (Saygın ve Nazıroğlu 2010).

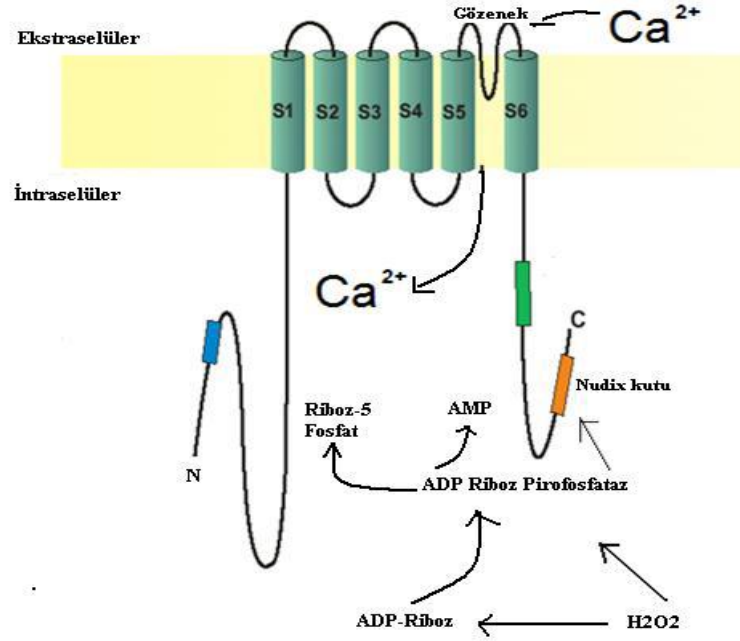
3.Grup; TRPM4 - TRPM5

Bu kanalların tek değerlikli kation iyonlarına karşı geçirgen olduğu ancak Ca^{+2} 'a geçirgen olmadığı bildirilmiştir (Saygın ve Nazıroğlu 2010).

4.Grup; TRPM2 - TRPM8

TRPM2 ADP-Riboz, oksidatif stres ve ısı ile aktive olurken; TRPM8 de soğuk reseptörü ile aktive olmaktadır (Miller 2006, Birnbaumer 2009, Saygın ve Nazıroğlu 2010). TRPM2 çoğunlukla beyin hücrelerinde olmak üzere, karaciğer, kalp, kemik iliği ve dalak gibi birçok doku ve hücrede yaygın olarak bulunmaktadır (Hecquet ve ark. 2008).

Diğer iyon kanallarında olduğu gibi bu kanallarda da transmembran olarak adlandırılan 6 segmentli geçiş bölgeleri mevcut olup, iyon akışı 5. ve 6. segmentler arasından gerçekleşmektedir (Nilius ve ark. 2007). Kanalın N-terminal ve C-terminal olmak üzere iki ucu bulunmaktadır. Bu iki uç ile beraber transmembran segmental geçiş bölgesi kanalın temel yapısını teşkil etmektedir. TRPM alt kanallarından TRPM2, 6 ve 7 kanalları hem iyon kanalı hem de aynı proteinde enzimatik aktivite içermektedir. TRPM2 kanallarının en önemli özelliği C-terminal üzerinde bulunan nudix bölgesidir. Bu bölgede, ADPR'den AMP ve Riboz 5-fosfat oluşumunu katalizleyen ADPR pirofosfataz enzimi bulunmaktadır. Oksidatif stresin belirteci olan ADPR'nin nudix bölgesine spesifik bağlanmasıyla aktive edilen ADPR pirofosfataz enzimi; Na^+ , K^+ ve Ca^{+2} 'a geçirgen seçici olmayan TRPM2 kanallarının açılmasını sağlamaktadır (Clapham 2007, Saygın ve Nazıroğlu 2010, Nazıroğlu ve Lückhoff 2008). TRPM6 ve TRPM7 kanallarının uç kısmında da alfa-kinaz enzim bölgeleri mevcuttur (Watanabe ve ark. 2008).



Şekil 2.14. TRPM2 kanallarının segmental yapısı (Clapham 2007)

TRPM8 kanalının yapısı da, hücre içi amino ve karboksil uçları bulunan 6 segmentli transmembran yapıdan oluşmaktadır. S2 ve S3 segmentleri, sırasıyla mentol ve icilin için bağlanma yerleri olup S4 segmenti ve S4-S5 arasındaki bölge, voltaj algılama fonksiyonuna sahiptir. S5 ve S6 arasındaki bölge kanal porunu oluşturmaktadır (Voets ve ark. 2007). TRPM8 prostat bezi, karaciğer, dorsal kök gangliyonu ve trigeminal ganglion nöronlarında bulunmuştur (Almaraz ve ark. 2014).

TRPM8, bir prostat cDNA'sının görüntülenmesinde yeni bir spesifik prostat geni olarak kopyalanmıştır (Tsavaler ve ark. 2001). Daha sonra TRPM8'in trigeminal ve dorsal kök ganlion nöronlarında soğuğu algılamada önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (McKemy ve ark. 2002, Peier ve ark. 2002). İnsan melanosit ve melanoma hücrelerinde eksprese edilen TRPM8 kanallarının aktivasyonu, sürekli Ca⁺² akışı ile sağlanır (Yamamura ve ark. 2008). TRPM8'in trozinaz ve trozinaz ilişkili protein-1 ekspresyon düzeylerini azaltarak melanositlerin pigment üretme aktivitesini azaltabildiği de gösterilmiştir (Botchkarev ve Shander 2007). Doza bağımlı mentol uygulamasından sonra melanoma hücrelerinin canlılığındaki azalmanın da TRPM8'in aktivasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Yamamura ve ark. 2008).

Ca⁺² homeostazisinin bir regülatörü olan TRPM8 kanallarının, esas olarak duyu sinir sistemi sinyalizasyonunda soğuk ve mentol ile aktive olduğu düşünülmektedir. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada TRPM8 mRNA ve proteininin aort, mezenterik, kuyruk

ve femoral arter miyositlerinde mevcut olduğu gösterilmiştir. Mentolün, mezenterik ve kuyruk arterlerinde olduğu gibi aortta da dilatatör bir yanıt oluşturduğu belirtilse de bazı durumlarda mentolün aortta küçük kontraksiyonlara neden olabileceği de gösterilmiştir (Johnson ve ark. 2009). Yapılan çalışmalar gösteriyor ki özellikle soğuk ve mentol ile aktive olan TRPM8'in sürekli Ca^{+2} akışı ile aktivasyonu sağlanmaktadır.

2.7. İskemide Ca^{+2} ve TRPM Kanalları

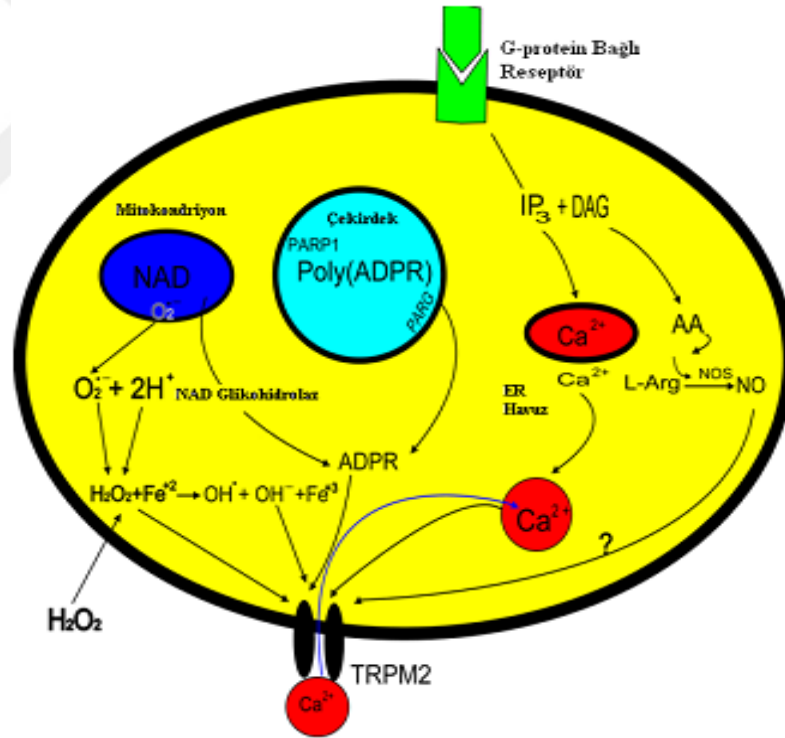
Dokuya gelen kan akımının azalması ya da kesilmesi ile oluşan hipoksiyle beraber enerji açığına karşılamak için hücreler, anaerobik metabolik yollara başvurmaktadır. İskemi sürecini takiben hücrede enerji depolarının boşalması ile Na^+/K^+ pompası inhibe olmaktadır. Sonuçta hücre içi Ca^{+2} artışı gerçekleşirken özellikle biriken metabolitlerin uzaklaştırılmaması, laktat birikimi ve doku pH'ında düşüş gibi etkenlerle, membran permeabilitesinde bozulmalara yol açarak iyon transport sisteminde büyük dengesizliklere neden olmaktadır. Bozulan iyon transport sistemi ile normalde hücre içinde hücre dışına nazaran çok az bulunan Ca^{+2} iyonlarında artış meydana gelir. Artan Ca^{+2} ikincil haberciler üzerinden enzimlere etki ederek membran fosfolipidlerinin yapısını bozar ve membranın işlev ve bütünlüğüne zarar verir (Carini ve ark. 1999, Jennings ve ark. 1991).

Oksidatif stres oluşumuna neden olan süperoksit, hidrojen peroksit ve singlet oksijen içeren aşırı SOR üretimi ya da antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığı durumlar, hücre hasarı ve ölümüne neden olan en önemli faktörlerdir. Yapılan çalışmalarda hidrojen peroksit uygulaması ile oksidatif stres modeli oluşturularak TRPM2 kanallarının aktivasyonu gösterilmiştir. Bu modelde TRPM2 kanal aktivasyonuna bağlı olarak pankreasın β hücrelerinde, nötrofil granülosit hücrelerinde ve monosit hücrelerinde hücre içi serbest Ca^{+2} artışı gözlenmiştir (Inamura ve ark. 2003, Heiner ve ark. 2003, Perraud ve ark. 2001, Özgül ve Nazıroğlu 2010). Yine bu model üzerinden yapılan çalışmaların bir kısmı; hidrojen peroksitin hücre içine girerek TRPM kanalını aktive etmesiyle hücre içine Ca^{+2} girişini artırdığını belirtirken (Hara ve ark. 2002, Wehage ve ark. 2002) diğer bir kısmı da; hidrojen peroksitin hücre içi organellerde (özellikle mitokondride) ADPR sentezini artırdığını ve bu artan ADPR'nin kanalı açtığını belirtmektedir (Perraud ve ark. 2001, Heiner ve ark. 2003, Kolisek ve ark. 2005).

Yapılan çalışmalarda TRPM2 kanallarının oksidatif stres ile aktive olabildiği ispatlandıktan sonra NAD^+ 'ın da TRPM2 kanalını uyardığı bildirilmiştir (Hara ve ark. 2002) ve böylece etki mekanizmaları derince araştırılmaya başlanmıştır. TRPM2 kanallarını aktive eden ADPR başlıca 3 yolla sentezlenmektedir:

- 1- NAD^+ , poliADPR polimeraz (PARP) enzimi aracılığı ile poliADPR'e, poliADPR de glikohidrolaz enzimi aracılığı ile ADPR'i oluşturur.
- 2- NAD^+ , cyclic ADPR (cADPR)'ye, cADPR dehidrolaz aracılığı ile ADPR oluşturur.
- 3- NAD^+ , NADaz enzimi aracılığı ile ADPR oluşmaktadır.

Oksidatif stres ürünü olan SOR, bu üç mekanizma üzerinden ADPR'yi aktive etmektedir. Aslında Ca^{+2} serbest ryanodin reseptörleri aracılığı ile uyarılan ADPR, TRPM2'nin nudix bölgesine yapışarak enzimatik faaliyetlerle hidroliz edilirken (NAD^+ ve cADPR) aynı zamanda TRPM2 kanalını da aktive etmektedir (Özgül ve Nazıroğlu 2010).



Şekil 2.15. ADPR ve TRPM2 kanal aktivasyonu ile oksidatif stres arasındaki ilişki (Özgül ve Nazıroğlu 2010)

ADPR üretimi, G proteine bağlı reseptörlerin ligand kanal aktivasyonu ile başlatılır. Reseptör aktivasyonu ve intrasellüler Ca^{+2} yoğunluğunun yükselmesi “inositol trifosfat (IP3)” tarafından hücre içi organellerden Ca^{+2} serbestlenmesini sağlamaktadır. TRPM2 hücreye doğru güçlenen TRPM2 aktivasyonu ile bir pozitif geri bildirim ile Ca^{+2} girişi

sağlar. Alternatif kaynaklar ADPR içeren mitokondri ve çekirdektir. ADPR polimerlerinin stimülasyon sonrası poliADPR polimeraz-1 (PARP-1)'e ve sonrasında poliADPR glikohidrolaz (PARG) tarafından ADPR'ye hidroliz edilir. Bu olay hücreyi apoptozise gidinceye kadar uyarabilir. Sitozolde Ca^{+2} artışı, mitokondride depolarizasyon ve porların açılması veya hücre dışından sitozole hidrojen peroksitlerin gelişi ile daha fazla nitrik oksit sentaz (NOS) ve SOR üretilir. ADPR ve SOR geri bildirim mekanizması ile TRPM2 kanallarının açılması yoluyla sitozolde Ca^{+2} artışını sağlamaktadır (Saygın ve Nazıroğlu 2010).

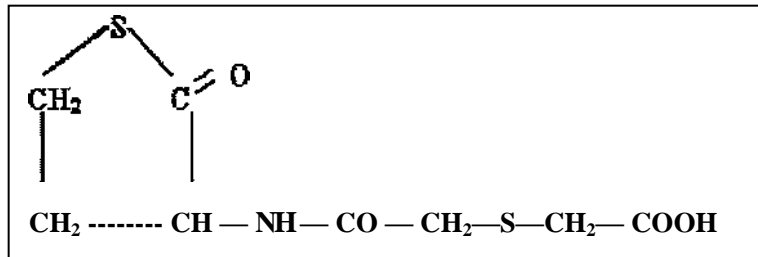
TRPM8 kanalı $15^{\circ}C$ ve $25^{\circ}C$ arasındaki sıcaklıklarda aktive edilebilir ve bu aktivasyon hücre içi Ca^{+2} seviyesinde geçici bir artışa yol açar (McKemy ve ark. 2002).

Hücre içi Ca^{+2} artışı hücreyi ölüme kadar götüren fizyopatolojik olayların başlatıcısı olarak kabul edilmektedir. Günümüzde kullanılan Ca^{+2} kanal blokörleri TRPM kanallarını bloke edememektedir.

Yapılan çalışmalarda oksidatif stresin özellikle mitokondri üzerinden ADPR üretimini artırdığı gösterildikten sonra bu kanalın ADPR ve oksidatif stres ile aktive olmasından dolayı özellikle iskemi çalışmalarında önem arz ettiği belirtilmektedir (Nilius ve ark. 2007, Alexander ve ark. 2004). Farklı TRP proteinlerinin, farklı uyarılara ve uyarının şiddetine göre, Ca^{+2} ve Na^{+} iyonlarının geçirgenliğini de değiştirdiği bilinmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında özellikle TRPM kanallarının oksidatif stres ürünleri ile aktive olmasından dolayı TRPM2 kanallarının İ/R hasarı ile arasındaki ilişki oldukça önem arz etmektedir.

2.8. Erdostein

Erdostein (Erd) mukolitikler grubunda bulunan mukomodülatör ve antiinflamatuvar gibi terapötik etkileri tanımlanan farmakolojik bir ajandır. Erd, doğal bir aminoasit olan homosisteinin bir formu olup kimyasal olarak N-(karboksimetil tiyoasetil) homosistein tiyolaktan şeklinde isimlendirilir. Kapalı formülü ise $C_8H_{11}O_4N_1S_2$ 'dir.



Şekil 2.16. Erd'in kimyasal yapısı (Söğüt 2002)

Emilip dolaşıma geçtikten sonra hepatik dolaşımda üç metabolitine dönüşerek aktif hale geçer. Aktif metabolitlerinin yapısında bulunan –SH (tiyol) radikalleri glikoproteinlerin birbirine bağlandıkları disülfid bağlarını kırarak, mukus elastikiyetinde ve viskozitesinde azalma oluşturarak mukolitik etki göstermektedir (Titti ve ark. 2000). Yapılan birçok deneysel çalışmada, bronşiyal sekresyonların mukus viskozitesini azaltıcı çok kuvvetli bir etkisinin olduğu gösterilerek sekresyonların normal viskozitesini ayarlayarak hızlı bir şekilde balgam hacmini azalttığı belirtilmiştir (Hosoe ve ark. 1999).

Erd oral yolla alındıktan sonra hızla absorbe olmaya başlar ve yaklaşık 1,2-1,4 saat sonra plazma konsantrasyonunda pik seviyesine ulaşır.

Üç aktif metaboliti bulunan Erd, bağırsaklardan emilip dolaşıma geçtikten sonra karaciğerde; Metabolit I : N-tiyoglikolil homosistein, Metabolit II : N-asetil homosistein ve Metabolit III : Homosistein'e dönüştürülerek başlangıçta bloke olan tiyol grupları serbestleştirilerek, mukolitik ve serbest radikal temizleyici aktivite göstermektedir.

Bu 3 aktif metabolitin plazmada en üst seviyeye ulaşması için geçen süre:

Met I; 1.1 – 2.2 / Met II; 2.5 – 4.6 / Met III; 2.3 – 4.8 saat iken, eliminasyonu ise idrarda sadece Met I ve sülfatlar şeklinde görülmektedir ve atılımı için yarılanma ömrü Erd için 1.4, Met I için ise 1.6 saat olarak belirlenmiştir (Erd prospektusu)

Erd'nin yapısında bulunan tiyol grupları sayesinde ortamda bulunan SOR'u inhibe ederek ve endojen antioksidanların yapımını artırarak güçlü antioksidan özellik gösterdiği bilinmektedir (Fadillioğlu ve ark. 2003). Ayrıca Erd'in antioksidan özelliğinin yanı sıra bakteri adezyonunu azaltıcı özelliği de gösterilmiştir (Braga 1999).

Oluşan iskemik karaciğer hasarı ve sonrasında gerçekleşen reperfüzyon hasarını en aza indirmek için farklı ajanların kullanıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Ancak karaciğer cerrahisinde önemli bir problem olan karaciğer İ/R hasarı henüz tam olarak bir çözüme kavuşmamıştır. Karaciğer cerrahisinde sıklıkla kullanılan vasküler klempleme ile oluşan iskemi ve sonrasında gerçekleşen reperfüzyon hasarının ayrıca uzak organ hasarına da neden olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte son yıllarda birçok merkezde başarı ile uygulanan karaciğer transplantasyonları sonrasında ortaya çıkan reperfüzyon hasarlarının önemli bir mortalite nedeni olması da, İ/R hasarının engellenmesine ve mekanizmasının ortaya konmasına yönelik yeni çalışmaları gerektirmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deneyin Kurgulanması

Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'ndan 27.02.2014 tarihli 2014-02/4 nolu karar sayıısı ile oy birliğiyle onay alınan bu alışma Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar ve Uygulama Merkezinde yapıldı. Çalışmanın histopatolojik incelemeleri Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakóltesi Patoloji Anabilim Dalı'nda, biyokimyasal parametrelerin analizi Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakóltesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda ve moleküler genetik analizleri de Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyoloji ve Moleküler Genetik Anabilim Dalı'nın laboratuvarlarında bulunan cihazlar kullanılarak yapıldı.

3.2. Deney Hayvanları

Bu deneysel alışma, Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen 350 – 400 gr ağırlığındaki 50 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar kullanılarak Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar ve Uygulama Merkezi'nde yapıldı. Deney öncesi tüm hayvanlar 12 saat gece 12 saat gündüz sirkadiyan ritimde, ortam sıcaklığı $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve nem oranı %50-60 olacak şekilde odalarda tutuldu. Sıçanların beslenmesinde standart ticari pellet yemi ve şehir içme suyu kullanıldı.

3.3. Deney Grupları

Oluşabilecek fireler ve istatistiksel anlamlılık göz önünde bulundurularak, her grup randomize olarak 10 adet sıçandan oluşacak şekilde beş gruba ayrıldı. Sıçanların hepsinin ağırlıkları hassas tartı ile belirlendi ve tedavi için uygulanacak ilaç ağırlıklarına göre hazırlandı. Laparotomiler öncesi deneklerin anestezisi için 10 mg/kg ksilazin (Rompun, Bayer, Türkiye) ve 60 mg/kg ketamin (ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) kombinasyonu kullanıldı.

Grup I: Kontrol grubu: Bu gruptaki deneklere herhangi bir tedavi verilmedi. Kontrol grubu olarak değerlendirildi. Bu deneklere genel anestezi sonrası laparotomi uygulanarak kan ve karaciğer doku örnekleri alındı.

Grup II: Sham grubu: Bu gruptaki deneklere herhangi bir tedavi verilmedi. İskemi oluşturulmadan yalancı cerrahi prosedürü uygulandı. Genel anestezi sonrası sadece laparotomi yapıldı ve diğer gruplarda uygulanan iskemi süresi göz önüne alınarak 45

dakika sonra laparotomi kapatıldı. Sonra diğer gruptaki reperfüzyon süresi göz önüne alınarak 45 dakika sonra genel anestezi uygulaması tekrarlandı. Kan ve karaciğer doku örnekleri alındı.

Grup III: İ/R Grubu: Bu gruptaki deneklere herhangi bir tedavi verilmedi. Genel anestezi sonrası laparotomi yapıldı. Karaciğerin sol ve median lobuna giden portal ven ve hepatik artere, atravmatik vasküler klemp konarak 45 dk. boyunca iskemi uygulandı. İskemi sonlandırıldıktan sonra batın kapatıldı ve 45 dakikalık reperfüzyon uygulanan sıçanlara, tekrar genel anestezi yapıldı. Daha sonra laparotomi yapılarak kan ve karaciğer doku örnekleri alındı.

Grup IV: Erd Grubu: Bu gruptaki deneklere iki gün 100 mg/kg/gün oral yoldan Erd (İlsan, Türkiye) tedavisi verildikten sonra genel anestezi sonrası laparotomi uygulanarak kan ve karaciğer doku örnekleri alındı.

Grup V: Erd + İ/R Grubu: Bu gruptaki deneklere İ/R'dan iki gün önce 100 mg/kg/gün oral yoldan Erd tedavisi verildikten sonra karaciğerin sol ve median lobuna giden portal ven ve hepatik artere atravmatik vasküler klemp ile 45 dk. boyunca iskemi uygulandı. İskemi sonlandırıldıktan sonra batın kapatıldı ve 45 dakikalık reperfüzyon uygulanan sıçanlara, tekrar genel anestezi yapıldı ve laparotomi yapılarak kan ve karaciğer doku örnekleri alındı.

Deney grupları

GRUPLAR		Denek Sayısı
1. Grup	Kontrol grubu	10
2. Grup	Sham grubu	10
3. Grup	İ/R grubu (45 dk. İskemi / 45 dk. Reperfüzyon)	10
4. Grup	Erd grubu (2 gün önceden oral gavaj ile 100 mg/kg/gün)	10
5. Grup	Erd+ İ/R grubu (2 gün oral gavaj ile 100 mg/kg/gün + 45 dk.İ / 45 dk.R)	10

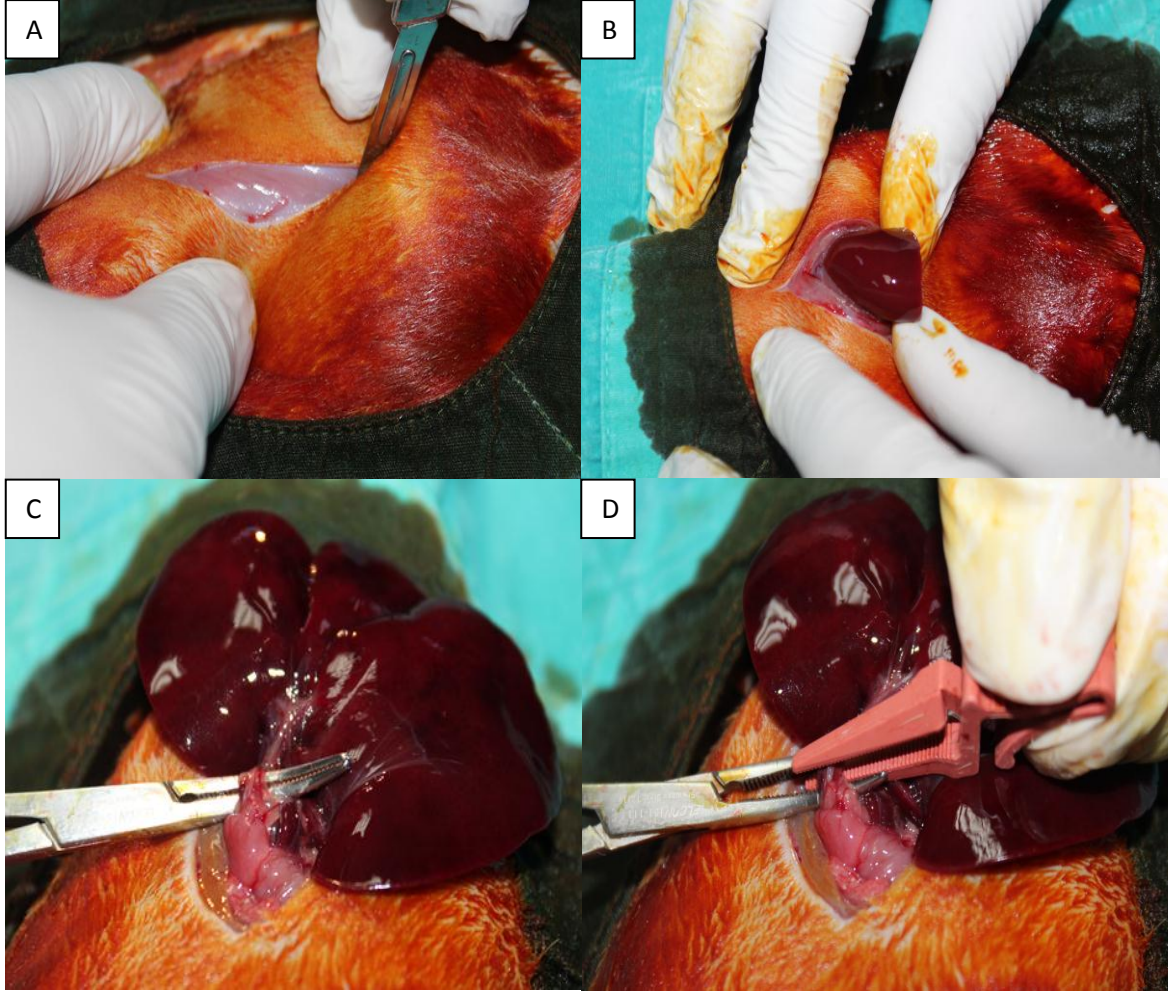
Çizelge 3.1. Deney Grupları ve Özellikleri

3.4. Karaciğer İ/R Modeli

Diurnal hormonal değişimlerin sıçanlar üzerine olası etkileri dikkate alınarak tüm cerrahi işlemler 09:00-12:00 saatleri arasında yapıldı (Watanabe 2001).

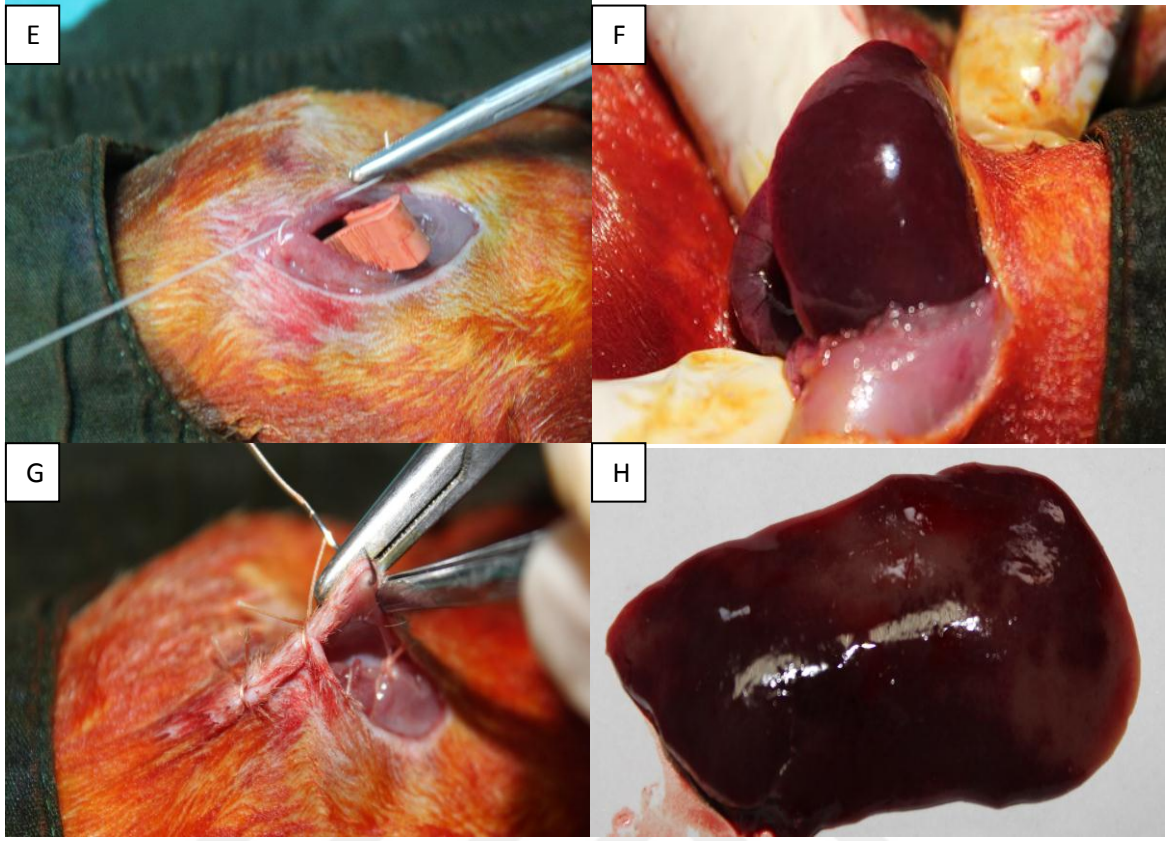
Deneklerin anestezisi için 10 mg/kg ksilazin (Rompun, Bayer, Türkiye) ve 60 mg/kg ketamin (ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) intraperitoneal (İ.P) olarak uygulandı. Anestezi sağlandıktan sonra karın ön duvarındaki tüyler tıraş edildi ve %10'luk polivinilpirolidon iyot kompleksiyle (Batticon, Adeka) cilt sterilize edildi. Sterilize edilen abdominal bölgeye, orta hattan yaklaşık 3 cm'lik insizyon ile laparotomi yapıldı. Karın içi görünür hale getirildikten sonra karaciğerin sol ve median lobuna giden hepatic arter ve portal ven eksplore edildi ve atravmatik vasküler klemp ile klemlenerek kan akımı kesildi ve iskemi başlatıldı. Atravmatik vasküler klemp yardımı ile 45 dakika iskemi uygulandı böylece segmental %70 (segment 2-5) ve non-lethal hepatic iskemi meydana getirildi. İskemi sürecinin başında insizyon tek tabaka halinde çift sütür ile yaklaştırıldı ve iskemi süresince açıkta kalan abdomen bölge üzerine ılık serum fizyolojik ile ıslatılmış spanç örtüldü. 45 dakika sonunda klemler alınarak iskemi sonlandırıldı.

Reperfüzyon safhası başlayan ratların laparotomi insizyonu, 3/0 atravmatik ipek sütür ile kapatıldı. 45 dakikalık reperfüzyon periyodunun sonunda hala anestezi altında olan sıçanlara tekrar laparotomi uygulandı ve intrakardiyak kan örneği alınarak sıçanlar kurban edildi (Resim 3.1. ve Resim 3.2.). Alınan kan örnekleri biyokimyasal analizler için satrifüje edilerek ependorf tüplere alınıp, ölçüm gününe kadar -20 °C'de saklandı. Karaciğerin sol ve median lobundan alınan doku örneklerinin bir kısmı histopatolojik analiz için %10'luk formalin solüsyonuna konuldu ve diğer bir kısmı ise moleküler analiz (RNA izolasyonu ve gen ekspresyonları) yapılmaya kadar -80 °C'de saklandı.



Resim 3.1. Karaciğer İ/R modeli iskemi modeli oluşturma süreci.

A: Anestezi sonrası abdominal bölgeleri tıraş edilen sıçanlar deney masasına alınarak, %10'luk polivinilpirolidon iyot kompleksiyle cilt sterilizasyonu yapıldı ve insizyon gerçekleştirildi. **B:** Laparotomi yapılarak karaciğer dokusu ortaya çıkarıldı. **C:** Hepatik arter ve portal venin geçtiği hepatoduodenal ligament diseke edildi. **D:** Diseke edilen hepatic arter ve portal venin geçtiği portal triad yapısı klemlendi (Pringle Manevrası) ve böylece 45 dk'lık iskemi süresi başlatıldı.



Resim 3.2. Karaciğer İ/R modeli reperfüzyon süreci ve iskemik karaciğer

E: İskemi sürecinin başında insizyon tek tabaka halinde çift sütür ile yaklaştırıldı. **F:** 45 dk sonunda klemp uzaklaştırıldı ve morfolojik olarak iskemik karaciğer dokusu görüldü. **G:** Reperfüzyon safhası başlayan ratların laparotomi insizyonu, 3/0 atravmatik ipek sütür ile kapatıldı. **H:** 45 dk iskemi ve 45 dk reperfüzyon süresi sonunda alınan iskemik karaciğer dokusu.

3.5. Karaciğer Histopatolojik Preparatlarının Hazırlanması

Histopatolojik analiz için %10'luk formalin solüsyonuna alınan her karaciğer dokusundan uzun eksene dik olacak şekilde 3mm kalınlığında 2 adet dilim kasetlere alındı ve rutin histolojik metodlar kullanılarak parafine gömüldü. Parafin bloklara gömülen dokulardan mikrotom (Leica Rotary) yardımı ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve alınan kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyanarak standart protokol uygulandı. Preparatlar uzman bir histopatolog tarafından, x100 büyütme ile ışık mikroskopunda incelendi ve fotoğrafları çekildi.

Histopatolojik incelemeye alınan karaciğer doku örneklerinde genel doku bütünlüğü göz önünde bulundurularak İ/R hasarı semikantitatif olarak skorlandı. Alınan

karaciğer doku örneklerinin patolojik incelenmesinde daha önce yapılan karaciğer İ/R modeli çalışmalarında yapılan benzer skorlama çalışmaları referans alınarak; hücresel şişme, lipoid dejenerasyonu, sinüzoidal konjesyon, hemoraji, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, lobuler nekroz ve apoptoz parametreleri, 0-4 arasında skorlama yapılarak normal karaciğer doku örneği ile İ/R yapılmış karaciğer doku örnekleri karşılaştırılarak değerlendirildi. Bu skorlamada parametrelerin değerlendirilmesinde; **0**: bakılan parametre belirtilerinin hiç olmayışı **1**: aranılan parametrelerin %10 ve daha az seyretmesi **2**: %11-30 arası **3**: %31-60 arası **4**: %60'dan fazla olması şeklinde tanımlandı (Suzuki ve ark. 1993).

3.6. Biyokimyasal Analizler

İntrakardiyak yöntemle alınan kan örnekleri biyokimya tüplerinde yaklaşık 25-30 dakika bekletildikten sonra 4000 g'de 10 dakika süreyle +4 °C'de sentrifüj edildi. Elde edilen serum numuneleri biyokimyasal analizler için endorf tüplere alınıp, önce -20 °C'de bekletildi ve daha sonra ölçüm günü gelinceye kadar -80 °C'de saklandı.

3.6.1. AST, ALT, LDH, GGT, Kreatinin, Üre Analizi

Oluşan hasarı belirleyebilmek için serumda bulunan; aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH), gama glutamil transpeptidaz (GGT), Kreatinin ve Üre düzeyleri hazır rat kitleri kullanılarak kolorimetrik yöntemle mikro ELISA cihazında ölçülmüştür.

3.6.2. TNF- α ve IL-6 Analizi

TNF- α tayini için Biosource İnvitrogen İmmunoassay Rat TNF- α elisa kit (Katalog no: KRC3011, USA), IL-6 tayini için Biosource İnvitrogen İmmunoassay Rat IL-6 elisa kit (Katalog no: KRC0012, USA) kullanılarak, Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile çalışıldı.

TNF- α , IL-6 ölçümü için birim pg/ml kabul edildi. Rengin şiddeti test ve standarttaki TNF- α ve IL-6'nın konsantrasyonuna bağlıdır.

3.6.3. Total Oksidan Seviyesi (TOS) Analizi

TOS analizi Erel tarafından geliştirilen, örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilgili olarak rengin şiddetini spektrofotometrik olarak ölçen kolorimetrik bir yöntemdir. TOS analizi için, TOS ticari kiti (Rel Assay Diagnostics) ve Olympus AU 400 biyokimya otoanalizörü kullanıldı. Birimi $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/L'dir.

3.6.4. Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Analizi

TAS analizi Erel tarafından geliştirilen, serbest radikallere karşı analiz örneklerindeki antioksidanların renk oluşumuyla alakalı spektrofotometrik olarak ölçülen kolorimetrik güncel bir yöntemdir. TAS ticari kiti (Rel Assay) ve Olympus AU 400 biyokimya otoanalizörü kullanıldı. Birimi Trolox Equivalent/L dir.

3.6.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Hesaplanması

Oksidatif stres derecesinin önemli bir belirteci olup, organizmadaki oksidan/antioksidan dengesi göstermektedir. OSI değeri hesaplanırken numunelerin TOS değerleri, yüzde cinsinden TAS değerlerine oranlandı ve OSI değerleri elde edildi.

OSI = (TOS ($\mu\text{mol/ L H}_2\text{O}_2$) / TAS ($\mu\text{Mol/L Trolox}$)) X 100 formülizasyonu ile hesaplandı.

3.7. TRPM Gen İfadelerinin Analiz İşlemleri

İ/R deneyi sonrası analiz gününe kadar $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklanan karaciğer dokuları, derin dondurucudan çıkarılarak lizis solüsyonu ile parçalanarak homojenize edildi daha sonra RNeasy Mini Kit (Katalog no: 74104, QIAGEN, Germany) kullanılarak protokolüne uygun şekilde RNA izolasyonu yapıldı.

3.7.1. Dokuların Homojenizasyonu ve Total RNA İzolasyonu

$-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklanan karaciğer dokuları, derin dondurucudan çıkarılarak 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinin içine yaklaşık 25 mg olacak şekilde donmuş karaciğer dokusu eklendi, üzerine 600 μl Lysis Buffer (içinde β -mercaptoethanol bulunan) ekleyip 1 adet soğutulmuş çelik bilye konuldu ve 4 dk boyunca dokuların parçalanması (QIAGEN, TissueLyser LT, Germany) sağlandı.

Dokular homojenize olmuş şekilde yeni bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 3 dk, 10000 rpm de santrifüj (Sigma 3-30 K, Germany) edildi. Santrifüj sonunda üst faz yeni bir 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Lizata 600 μl %70 etanol eklendi ve pipetaj yapıldı. 2 ml toplama tüp içindeki RNeasy spin column içine 700 μl örnek pipetlendi. 15 sn, $\geq 8000\text{ g}$ 'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda alt faz atıldı. Örneğin geri kalanı için bir önceki adım tekrarladı. RNeasy spin column'a 700 μl RW1 buffer eklendi. 15 sn, $\geq 8000\text{ g}$ 'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda alt faz atıldı. RNeasy spin column yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve üzerine 500 μl RPE buffer eklendi. 15 sn, $\geq 8000\text{ g}$ 'de santrifüj edildi. Alt faz atıldı. RNeasy spin column'a 500 μl RPE buffer eklendi. 2 dk, $\geq 8000\text{ g}$ 'de

santrifüj edildi. Santrifüj sonunda alt faz atıldı. RNeasy spin column yeni toplama tüpüne yerleştirildi ve filtrenin kuruması için 1 dk, 10.000 rpm'de santrifüj edildi. RNeasy spin column yeni 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpe yerleştirildi ve üzerine 50 µl RNase-free water eklenip 1 dk, ≥ 8000 g'de santrifüj edildi. RNA verimini arttırmak için RNeasy mini column'a 20 µl daha RNase-free water eklendi. 1 dk ≥ 8000 g'de santrifüj edildi.

Elde edilen RNA'ların kalite ve miktar tayini (Thermo Scientific, Multiskan Go) yapıldı. RNA dilüsyonu gerçekleştirildi. RNA'lar -80 °C' de saklandı.

3.7.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için, toplam hacim 20 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlandı. Elde edilen RNA'lar, cDNA sentez kiti (Applied Biosystems, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, USA) ve BİO-RAD, T100, Thermal Cycler cihazı kullanılarak reverse transkripsiyon yöntemiyle cDNA sentezi gerçekleştirildi.

cDNA eldesi için bir tüp içerisinde 10 µl revers transkripsiyon karışımı hazırlandı.

Karışım	Miktar (µl)
10X RT Buffer	2 µl
DNTP Mix	0.8 µl
10X RT Random Primers	2 µl
Reverse transcriptase	1 µl
RNase free water	4.2 µl
Toplam	10 µl

Çizelge 3.2. cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği

cDNA Tepkime Koşulları	
25 °C'de	10 dk
37 °C'de	120 dk
85 °C'de	5 dk

Çizelge 3.3. cDNA tepkime koşulları

Hazırlanan 10 µl cDNA sentez karışımı ile 10 µl RNA birleştirilerek toplam 20 µl olacak şekilde cDNA sentez karışımı hazırlandı.

cDNA: 25°C'de 10 dk, 37°C 'de 120 dk, 85°C'de 5 dk tepkime koşullarında; RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA örnekleri üzerine 90 µl Nuclease-free water eklenip sulandırıldı ve -20 °C'de saklanmak üzere buzdolabına kaldırıldı.

3.7.3. Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

TRPM 2, 6, 7, 8 ve 'ev' geni ('house keeping') β -Actin (Ella Biotech, Deutschland) gen transkripsiyon düzeyleri 'real time' PCR yöntemiyle (QIAGEN Rotor-Gene Q, Germany) belirlendi. Yapılan birçok çalışmada klasik PCR kullanılmış olup, PCR sürecinin sonunda oluşan ürünler (amplikonlar) saptanarak elektroforez ile analiz edilmektedir. Ancak bizim kullandığımız qRT-PCR ise PCR devam ederken ortaya çıkan ürünleri saptamaya başladığı anda değerlendirmeye alarak elektroforeze ihtiyaç duymadan analizi neticelendirmektedir.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan gen bölgelerine ait primer dizi bilgileri

Gen		Kullanılan Primer Dizileri	Tm	Uzunluk (bp)
β -Actin	Left	5'-CCC GCG AGT ACA ACC TTC T-3'	58.8	19
β -Actin	Right	5'-CGT CAT CCA TGG CGA ACT-3'	56.0	18
TRPM2	Left	5'-AAT TTG CTC ATC GCC ATG TT-3'	53.2	20
TRPM2	Right	5'-GAT CTG GTC TGT GTG CTC CTG-3'	61.8	21
TRPM6	Left	5'-GCA AGA ACT GGC TTT CCG TG-3'	59.4	20
TRPM6	Right	5'-ATC CGG GTC CTC TTG CAT CT-3'	59.4	20
TRPM7	Left	5'-AGA CGC TTT CCG ATA GAT GG-3'	57.3	20
TRPM7	Right	5'-CTA TCC AGG ATT TCT GGG ACA T-3'	58.4	22
TRPM8	Left	5'-GCC CAG TGA TGT GGA CAG TA-3'	59.4	20
TRPM8	Right	5'-GGA CTC ATT TCC CGA GAA GG-3'	59.4	20

Karışım	Miktar (µl)
SYBR Green qPCR Mastermix*	12.5 µl
Forward primer	0.5 µl
Reverse primer	0.5 µl
RNase Free Water	6.5 µl
Toplam	20 µl

Çizelge 3.5. qRT-PCR için kullanılan karışım içeriği
*(QIAGEN, RT² SYBR Green qPCR Mastermix, USA)

Hold	10 dk	95°C
Cycle	15 sn	95°C
Cycle	1 dk	60°C

Çizelge 3.6. qRT-PCR koşulları
(Döngü sayısı: 40)

Hazırlanan 20 µl qRT-PCR karışımı ile 5 µl cDNA birleştirilerek toplam 25 µl olacak şekilde qRT-PCR reaksiyonu QIAGEN Rotor-Gene Q cihazında gerçekleştirildi ve sonuçların analizi, ΔC_t değerleri kullanılarak yapıldı.

3.8. İstatistiksel Analiz

Yapılan analizlerin verileri Ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizde Kolmogorov-Smirnov (K-S testi) dağılım analizine göre dağılımı düzenli olan grupların karşılaştırılmasında One-way Anova testi (posthoc bonferroni ve Student's t-testi), dağılımı düzenli olmayan grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi (posthoc Dunn's testi) kullanıldı. $P < 0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Histopatoloji Sonuçları

Histopatolojik incelemeye alınan karaciğer doku örneklerinde, genel doku bütünlüğü göz önünde bulundurularak İ/R hasarı semikantitatif olarak skorlandı. Alınan karaciğer doku örneklerinin patolojik incelenmesinde; hücresel şişme, steatoz / lipoid dejenerasyonu, sinüzoidal konjesyon, hemoraji, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, lobuler nekroz ve apoptoz parametreleri, 0-4 arasında skorlama yapılarak normal karaciğer doku örneği ile İ/R yapılmış karaciğer doku örnekleri karşılaştırılarak değerlendirildi. Bu skorlamada parametrelerin değerlendirilmesinde daha önceki yapılan karaciğer İ/R modeli çalışmalarında kullanılan Suzuki kriterleri referans olarak alındı (Suzuki ve ark. 1993).

0: bakılan parametre belirtilerinin hiç olmayışı **1:** aranan parametrelerin %10 ve daha az seyretmesi **2:** %11-30 arası **3:** %31-60 arası **4:** %60'dan fazla olamsı şeklinde tanımlandı. Bu skorlama tablosuna göre yapılan analiz sonucunun istatistiki verileri çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

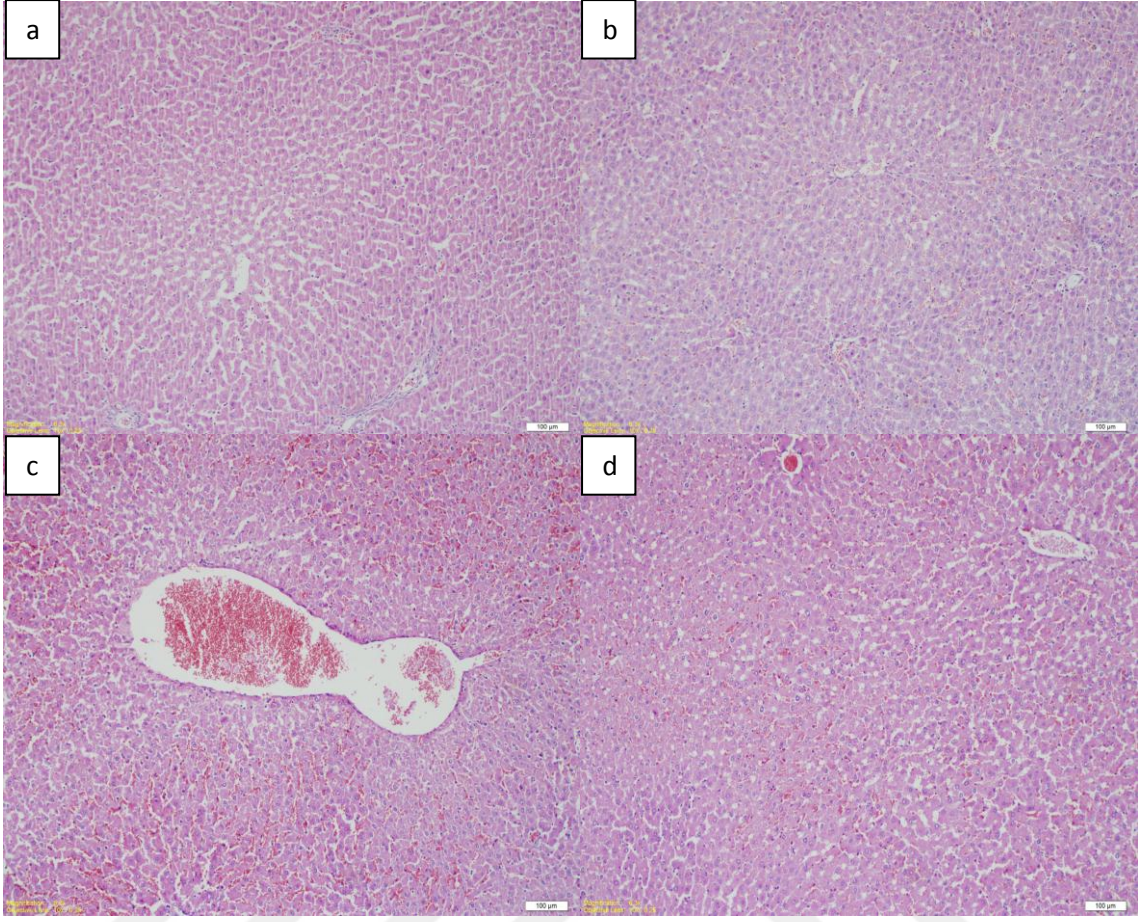
Çizelge 4.1. Histopatolojik parametrelerin skorlama sonuçlarının istatistiksel verileri (Ort±SH)

	G I Kontrol	G II Sham	G III İ/R	G IV Erd	G V Erd + İ/R
Hüresel Şişme	1.00±0.00	1.43±0.53 ^{c***}	3.13±0.64 ^{a***}	1.29±0.49 ^{b,c***}	2.00±0.00 ^{b**}
Steatoz/lipoid dejenerasyon	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Sinüzoidal konjesyon	2.50±0.55	2.14±0.69 ^{c**}	3.88±0.35 ^{a***}	2.29±0.95 ^{b,c**}	3.62±0.52 ^{b***}
Hemoraji	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
İnflamatuvar hücre infiltrasyonu	0.50±0.55	1.14±0.38 ^{c**}	2.00±0.76 ^{a***}	1.00±1.00 ^{b,c**}	1.12±0.35 ^{b*}
Lobuler nekroz	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Apoptoz	0.00±0.00	0.14±0.38	0.63±0.74 ^{a***}	0.29±0.49 ^{a,b**}	0.25±0.46 ^{b**}

I/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein

^a: vs. Sham; ^b: vs. I/R; ^c: vs. Erd + I/R; *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p< 0.001

Kontrol ve sham grubunun karaciğer dokusuna ait histopatolojik skorlar incelendiğinde benzer olduğu görüldü. Kontrol ve sham grubunun histopatolojik skorları İ/R ve İ/R+Erd gruplarına kıyasla daha iyi olduğu ve istatistiksel olarak anlamlılığı saptandı (P< 0.001). Yapılan analizlerde diğer tüm gruplara kıyasla İ/R grubunda; hüresel şişme, konjesyon, PNL ve apoptoz parametrelerinin anlamlı derecede arttığı gözlemlendi (p<0.05). İ/R grubuna kıyasla Erd + İ/R grubu değerlendirildiğinde hüresel şişme, konjesyon, PNL ve apoptozda anlamlı azalma görüldü (p<0.05) (Çizelge 4.1. ve Resim 4.1.).



Resim 4.1. Sıçan karaciğerlerinin histopatolojik görünümü

a. ve b. ^aKontrol ve ^bsham grubunda normal karaciğer histolojik görünümü (H&E, x100)
c ve d. ^cİ/R grubunda ve ^dErd+İ/R grubunda İskemik değişiklikler; sinüzoidal konjesyon, hücresel şişme ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunun histopatolojik görünümü (H&E, x100).

4.2. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

4.2.1. AST, ALT, LDH, GGT, Üre ve Kreatinin

Alınan kan örneklerinin analizinde AST, ALT, LDH, GGT, üre ve kreatinin düzeyleri incelendi ve istatistiki verileri çizelge 4.2.' de gösterildi.

Çizelge 4.2. Biyokimyasal parametrelerin istatistiksel verileri (Ort±SH)

	Kontrol	Sham	I/R	Erd	Erd + I/R
AST (U/l)	158.5±37.7 ^{c***}	159.9±22.8	1857.0±183.7 ^{a***}	151.7±14.1 ^{c***}	1289.0±62.3 ^{b**}
ALT (U/l)	57.00±6.6 ^{c***}	72.57±8.5	1468.0±187.6 ^{a***}	47.86±3.4 ^{b,c***}	919.9±86.1 ^{b**}
GGT (U/l)	2.16±0.47 ^{c**}	2.28±0.42	11.13±1.49 ^{a***}	1.85±0.26 ^{b,c***}	7.00±0.70 ^{b*}
LDH (mg/dl)	767.5±191.9 ^{c**}	947.0±241.7	7720.0±1070.0 ^{a***}	939.9±113.1 ^{b,c***}	4660.0±613.4 ^{b**}
Kreatinin (mg/dl)	0.47±0.01 ^{c*}	0.49±0.00	0.87±0.03 ^{a***}	0.47±0.01 ^{b,c**}	0.62±0.04 ^{b**}
Üre (mg/dl)	18.04±0.73	18.57±0.63	24.25±1.22 ^{a***}	17.03±0.33 ^{b,c*}	20.90±1.08

I/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein

^a: vs. Kontrol; ^b: vs. I/R; ^c: vs. Erd + I/R; *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p< 0.001

Biyokimyasal parametreler incelendiğinde AST, ALT, GGT, LDH, üre ve kreatinin seviyelerinin tüm gruplara kıyasla İ/R grubunda istatistiksel olarak anlamlı artışı belirlendi (p<0.001) (Çizelge 4.2). İ/R grubu ile tedavi grubu (Erd+İ/R) kıyaslandığında AST, ALT, GGT, LDH ve kreatinin seviyelerinin tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı saptandı (p<0.01) (Çizelge 4.2).

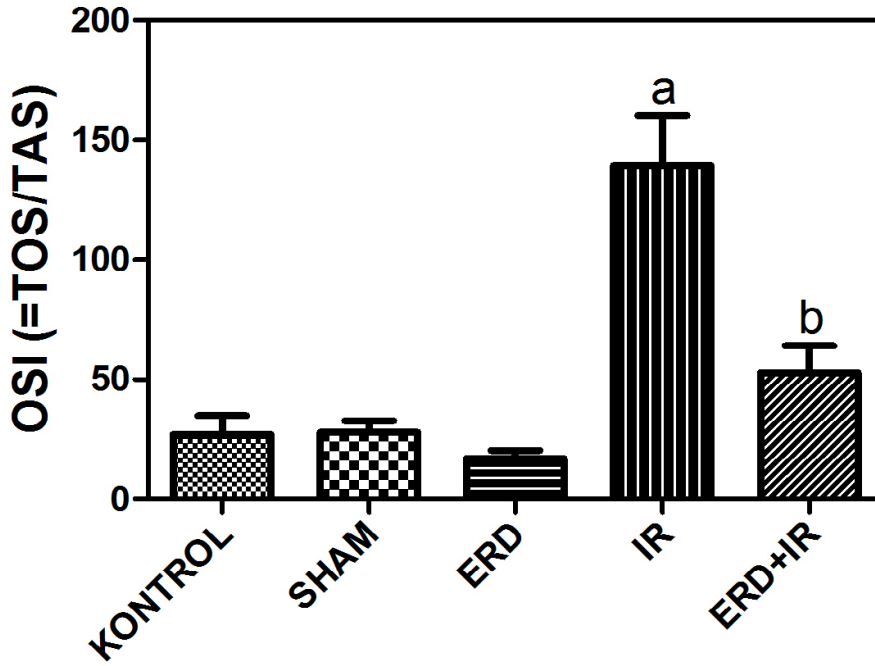
4.2.2. TAS, TOS ve OSI

Oksidatif stres ve antioksidan durumun değerlendirilmesi için birçok farklı yöntem olmasına rağmen bu belirteçlerin, hem sinerjistik etkilerinin hem de oksidan ve antioksidan dengelerinin totalde değerlendirilmesini sağlayan ve son yıllarda oldukça popüler olan TAS ve TOS ölçümü yapıldı. Ölçümü yapılan TOS değerleri yüzde cinsinden TAS değerlerine oranlandı ve oksidatif stresin önemli bir göstergesi olan OSI değerleri elde edildi ve istatistiksel verileri çizelge 4.3. ve şekil 4.3.' de gösterildi.

Çizelge 4.3. Oksidatif stres parametrelerinin istatistiksel verileri (Ort±SH)

	Kontrol	Sham	I/R	Erd	Erd + I/R
TAS (mmol/l)	0.83±0.05	0.82±0.02	0.55±0.08 ^{a*}	1.15±0.04 ^{a,c**}	0.82±0.05 ^{b*}
TOS (umol/l)	22.41±7.4	23.27±4.3	77.01±6.2 ^{a***}	19.75±4.1 ^{b***}	41.99±8.7 ^{b**}
OSI (TOS/TAS)	27.03±7.8	28.00±4.8	139.3±21.1 ^{a***}	17.05±3.4 ^{b***}	52.85±11.1 ^{b***}

I/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein; TAS: Total Antioksidan Seviye; TOS: Total Oksidan Seviye; OSI: Oksidatif Stres İndeksi. ^a: vs. Kontrol; ^b: vs. I/R; ^c: vs. Erd + I/R; *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p< 0.001



Şekil 4.1. Oksidatif stres indekslerinin karşılaştırılması

a: Kontrol vs. IR, p<0.001; b: Erd+IR vs. IR, p< 0.001

Gruplar arasında TAS' ın değerlendirilmesinde; kontrol ve sham grubuna kıyasla İ/R grubunda anlamlı azalma saptandı (p<0.05). Tedavi grubunda (Erd+İ/R) ise İ/R grubuna kıyasla anlamlı TAS artışı gözlemlendi (p<0.05).

Gruplar arasında TOS ve OSI açısından değerlendirme yaptığımızda, diğer gruplara kıyasla İ/R grubunda TOS ve OSI'nin anlamlı derecede arttığı saptandı (p< 0.001). Tedavi grubunda (Erd+İ/R) ise İ/R grubuna kıyasla TOS ve OSI parametrelerinde anlamlı bir azalma gözlemlendi (sırasıyla p< 0.01, p< 0.001).

4.2.3. TNF- α ve IL-6

İ/R hasarında oluşan doku hasarı, inflamatuvar yanıt ile benzerlik göstermektedir. Hepatik İ/R hasarı ile Kupffer hücrelerinin aktivasyonu sonucu salgılanan TNF- α ve IL-6 plazma düzeyleri belirlenerek; Erd uygulamasının bu sitokinlerin seviyesindeki değişiklikleri incelendi. Böylece Erd'nin İ/R hasarının akut fazına etkisi araştırıldı ve elde edilen veriler çizelge 4.4'de gösterildi.

Çizelge 4.4. TNF- α ve IL-6 plazma düzeylerinin istatistiksel verileri (Ort \pm SH)

	Kontrol	Sham	I/R	Erd	Erd + I/R
TNF-α (pg/ml)	52.12 \pm 3.14	59.89 \pm 2.26	158.30 \pm 6.22 ^{a***}	77.11 \pm 6.10 ^{b***,c**}	104.40 \pm 5.58 ^{b***}
IL-6 (pg/ml)	45.24 \pm 2.81	51.75 \pm 2.67	110.60 \pm 12.81 ^{a***}	60.25 \pm 4.26 ^{b***}	74.63 \pm 5.01 ^{b**}

I/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein; TNF- α : Tümör Nekrozis Faktör; IL-6: İnterlökin-6

^a: vs. Kontrol; ^b: vs. I/R; ^c: vs. Erd + I/R; *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001

Gruplar arasında sitokin seviyeleri incelendiğinde, diğer tüm gruplara kıyasla İ/R grubunda plazma TNF- α ve IL-6 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0.001). İ/R grubu ile tedavi grubu (Erd+İ/R) kıyaslandığında ise, tedavi grubunda plazma sitokin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir azalma saptandı (sırasıyla p<0.001, p<0.01).

4.3. Gen İfadesinin Sonuçları

qRT-PCR sonucu, klasik PCR' da ki gibi agaroz jelde yürütmeye gereksinim duymadan, her gene ait sonuçların dijital ortamda ölçümü ile sonuçlandıktan sonra yapılan istatistiksel veriler çizelge 4.5.' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Gen ifadesi sonuçlarının istatistiksel verileri (Ort±SH)

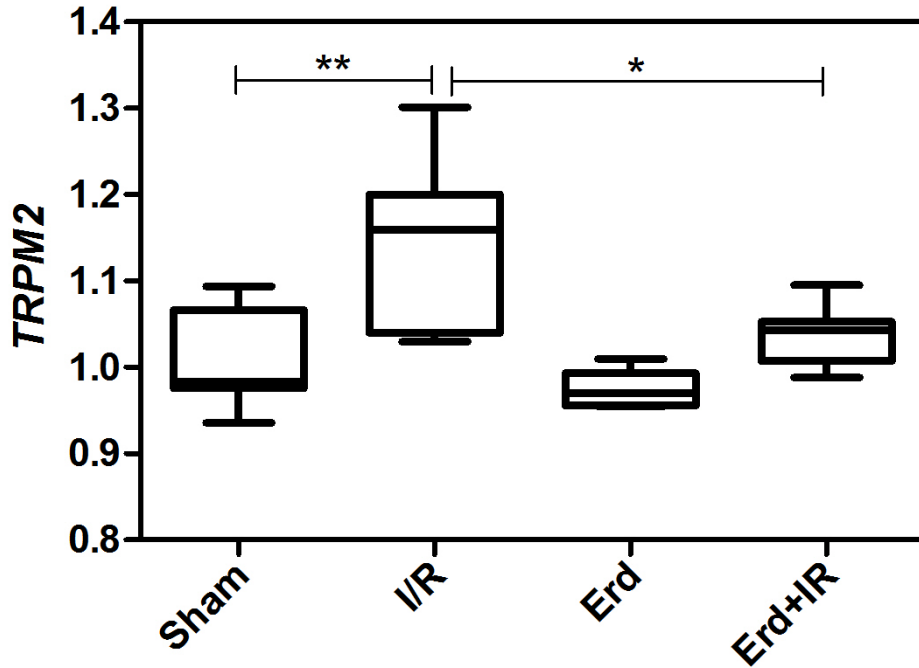
Gen	Sham	İ/R	Erd	Erd + I/R	P
TRPM2	1,01±0,02	1,14±0,03	0,97±0,01	1,04±0,01	a ^{***} ,c [*]
TRPM6	1,14±0,02	1,14±0,01	1,06±0,01	1,11±0,02	b ^{**} ,c [*]
TRPM7	1,21±0,02	1,20±0,00	1,15±0,00	1,15±0,01	c ^{***}
TRPM8	1,15±0,03	1,25±0,03	0,97±0,02	1,00±0,01	a [*] ,c ^{**}

I/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein; TRPM: Transient Receptor Potential Melastatin.

^a: Sham vs IR, ^b: Erd vs Erd+I/R, ^c: I/R vs Erd+I/R; *: <0.05, **: <0.01, ***: <0.001

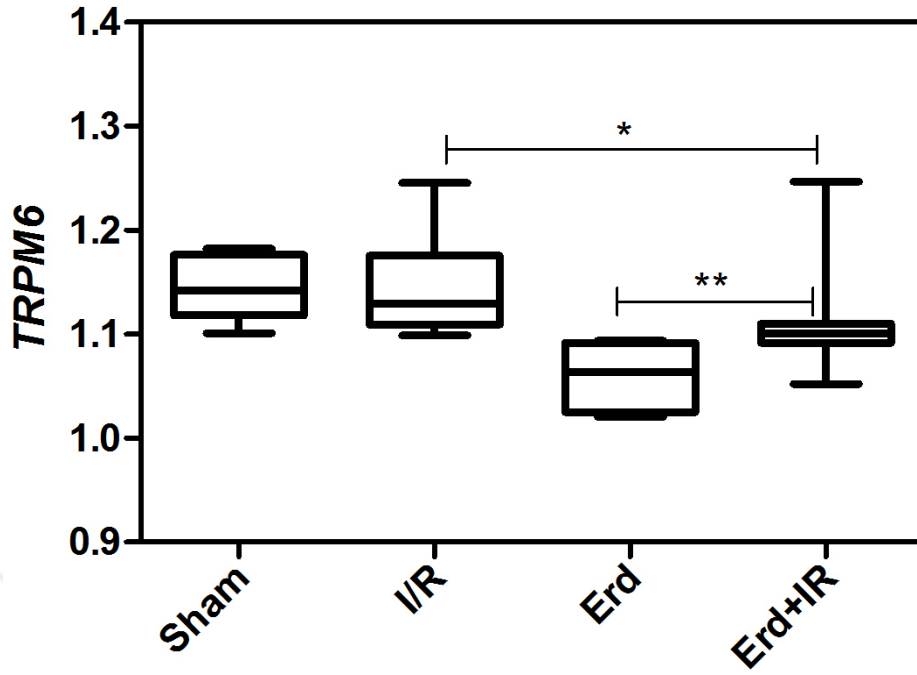
Sham, Erd ve tedavi grubuna (Erd+İ/R) kıyasla İ/R grubunda TRPM2 ve 8 gen ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı saptandı (sırasıyla p<0.01, p<0.001).

İ/R grubu ile tedavi grubu (Erd+İ/R) karşılaştırıldığında ise tedavi grubunda (Erd+İ/R); TRPM 2, 6, 7 ve 8 gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı saptandı (sırasıyla p<0.05, p<0.001).

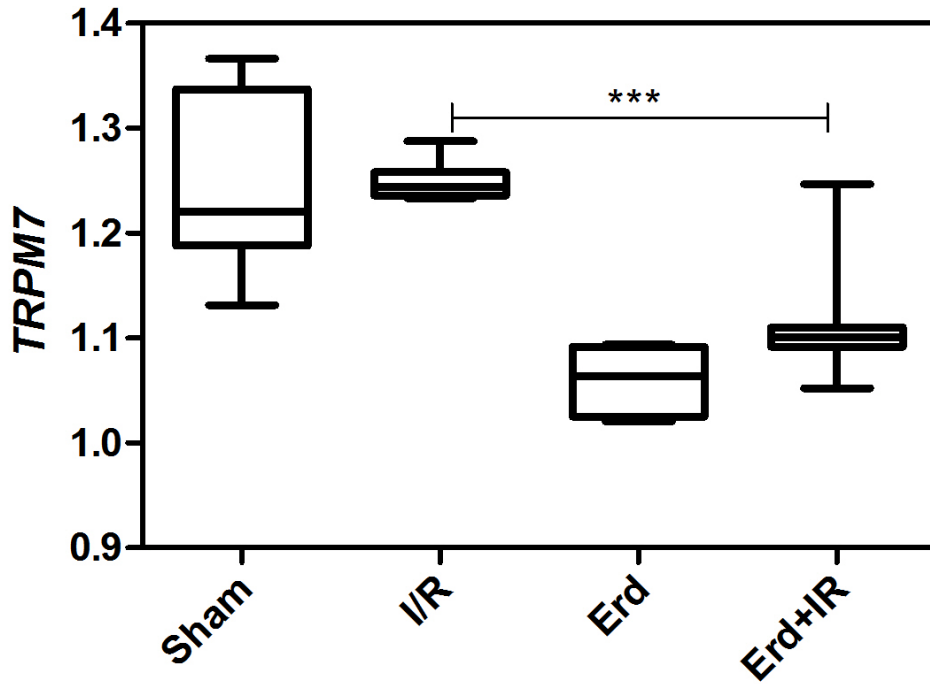


Şekil 4.2. TRPM2 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

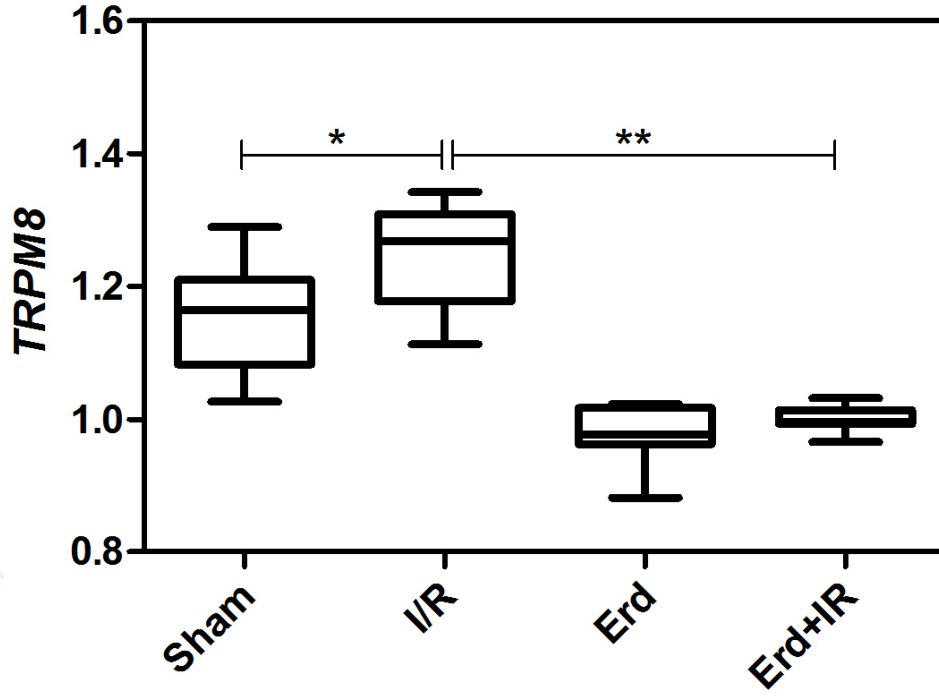
I/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein. *: I/R vs Erd+I/R; **: Sham vs I/R



Şekil 4.3. TRPM6 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması
I/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein. *: I/R vs Erd+I/R; **: Erd vs Erd+I/R



Şekil 4.4. TRPM7 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması
I/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein. ***: I/R vs Erd+I/R



Şekil 4.5. TRPM8 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması
I/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein. *: Sham vs I/R; **: I/R vs Erd+I/R

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, sıçanlarda hepatik İ/R modeli (45 dk iskemi – 45 dk reperfüzyon) oluşturarak; iskemik hasarın şiddetini belirlemek ve kullanılan ajanın İ/R hasarı üzerine etkinliğini incelemek amacıyla histopatolojik, biyokimyasal ve gen ekspresyon analizleri yapıldı.

Biyokimyasal parametrelerin (AST, ALT, LDH, GGT, Kreatinin, Üre, TAS, TOS, OSI) serumdaki seviyelerine bakılarak karaciğer fonksiyon bozukluğu ve İ/R hasarı ile ilişkileri incelendi. Moleküler değişimleri değerlendirmek amacıyla da TRPM 2, 6, 7 ve 8 gen ekspresyonları qRT-PCR tekniği kullanılarak değerlendirildi.

İ/R hasarı, oksijene hassas olan beyin, kalp, karaciğer ve böbrek gibi organlar başta olmak üzere aerobik metabolizmaya sahip pek çok doku ve organda sık rastlanabilen ve ciddi patolojilere yol açan birçok olaya neden olmaktadır. Karaciğer İ/R hasarı, özellikle vasküler cerrahi işlemlerde, karaciğer transplantasyonu sırasında ve sonrasında, hemorajik şok gibi sık karşılaşılan klinik durumlarda mortaliteyi etkileyen önemli bir hasardır (Mandrekar ve Szabo 2011).

İ/R hasarının oluşumunda birçok faktör olmasına rağmen SOR'un anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Oluşan bu hasar hepatoselüler hasara neden olabileceği gibi yakın ve uzak organ disfonksiyonuna da neden olmaktadır (Fondevila ve ark. 2003). Oluşan iskemik karaciğer hasarı ve sonrasında gerçekleşen reperfüzyon hasarını en aza indirmek için farklı ajanların kullanıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Ancak klinik önemi ve görülme sıklığından dolayı karaciğer cerrahisinde önemli bir problem olan karaciğer İ/R hasarı henüz tam olarak bir çözüme kavuşmamıştır. Bununla birlikte son yıllarda birçok merkezde başarı ile uygulanan karaciğer transplantasyonları sonrasında ortaya çıkan reperfüzyon hasarlarının önemli bir mortalite nedeni olması da, İ/R hasarının engellenmesine ve mekanizmasının ortaya konmasına yönelik yeni çalışmaları gerektirmektedir. Literatürde benzer herhangi bir çalışmaya rastlamadığımızdan, bu çalışmamızın İ/R hasarının patofizyolojik mekanizmalarının daha ileri düzeyde aydınlatılmasına katkı sağlayabileceği gibi tanı ve tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunabileceğini düşünerek, çalışmalarımızı Erd'in İ/R hasarı üzerine ve karaciğer dokularındaki TRPM2 ve TRPM8 iyon kanalları üzerine yoğunlaştırdık.

Karaciğer travmalarında ve karaciğer cerrahisinde hemostazı sağlamak için çeşitli vasküler oklüzyon teknikleri kullanılmaktadır. Vasküler oklüzyon tekniklerinin kullanım sıklıklarının incelendiği çalışmalarda; çoğunlukla karaciğere giren kan akımının engellenmesini sağlayan portal triada uygulanan klempleme (Pringle manevrası) tekniği daha fazla önerilmektedir (Nakajima ve ark. 2002, Van der Bilt ve ark.). Vasküler oklüzyon tekniklerini, komplikasyonları yönünden karşılaştıran başka bir çalışmada da portal triad klempleme tekniğinin, hemodinamik göstergelerde daha az tahribata neden olduğunu göstermişlerdir (Gurusamy ve ark. 2009). Biz de çalışmamızda, atravmatik klemp ile portal triadı klempleme tekniğini kullanarak iskemi oluşturduk.

Deneysel karaciğer İ/R çalışmaları incelendiğinde, iskemi ve reperfüzyon sürelerinin farklılık gösterdiği görülmektedir. Korosec ve Jezernik' in (2000) farklı iskemi süreleri uygulayarak karaciğerdeki değişiklikleri gösterdikleri çalışmalarında; 30 dk iskemi uygulamalarının sonucunda parankimde sadece hücrelerde tek tek ayrılma gerçekleştiğini, 40 dk iskemi uygulamasında parankimde hasarın daha net olduğunu, 60 dk iskemi uygulamasında da karaciğer hücrelerinin ATP içeriğinde %80 azalma olduğunu ve 120 dk iskemi uygulamalarında ise dokuda geri dönüşümsüz hasarın oluştuğunu bildirmişlerdir (Korosec ve Jezernik 2000). Ayrıca Carroll ve Esclamado (2000) çalışmalarında uzun süreli iskeminin; kapiller çapının daralması, lökosit sekestrasyonu ve endotel hücrelerinin metabolik bozukluğu gibi çok sayıda yapısal ve hücresele değişikliklere neden olduğunu bildirmektedirler (Carroll ve Esclamado 2000). Bu bilgiler ışığında uygulanan İ/R süresinin uzunluklarının, biyokimyasal ve histolojik değişikliklerin ortaya çıkmasında önemli olduğunu göz önünde bulundurarak birbirine bağlantılı hasar mekanizmalarının çalışabilmesi için gerekli iskeminin sağlanabilmesi ve geri dönüşümsüz hasarın engellenebilmesi için 45 dk vasküler klemp uygulamayı tercih ettik.

Reperfüzyonun akut fazında hücre içi Ca^{+2} artışı hepatosit hasarını başlatan önemli mekanizmalardan biridir ayrıca apoptoz ve nekroz oluşumunu da aktive etmektedir. Reperfüzyon sürecinin ilk dakikasından itibaren aşırı Ca^{+2} artışı ve beraberinde Kupffer hücreleri tarafından; TNF- α , IL-6, IL-1, eikonosoidler gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımı ve SOR'un artışı gözlenir. Subakut faz ise; reperfüzyon sonrası 18 ve 24. saatler arasında masif nötrofil infiltrasyonu ile geniş nekrozlar oluşturarak geri dönüşümsüz hasarın oluştuğu fazdır. Fazların bu süreçlerinden dolayı İ/R hasarının tedavi potansiyelini araştıran deneysel çalışmalarda nötrofil aracılı inflamasyon, doku nekrozu ve organın

disfonksiyonunu önlemek amacıyla erken dönemler yani akut faz hedef olarak alınmaktadır (Wanner ve ark. 1996, Fondevila ve ark. 2003). Bu yüzden biz de 45 dk iskemi uygulamasının sonrasında reperfüzyon süresini 45 dk olarak belirledik.

Fadillioglu ve ark. (2003) araştırmalarında, Erd'nin yapısında bulunan tiyol grupları sayesinde ortamda bulunan SOR'u inhibe ettiğini ve glutasyon gibi endojen antioksidanların yapımını arttırdığı için güçlü antioksidan özellik gösterdiğini belirtmişlerdir (Fadillioglu ve ark. 2003). Yine Lee ve ark. (2010) renal İ/R hasarında Fadillioglu ve ark.'na benzer olarak Erd'in antioksidan özellik gösterdiğini ve renal İ/R hasarını iyileştirici önemli bir rolü olduğunu belirtmişlerdir (Lee ve ark. 2010). Ayrıca Braga (1999) tarafından Erd'in antioksidan özelliğinin yanı sıra bakteri adezyonunu azaltıcı özelliği de gösterilmiştir (Braga 1999). Dokuyucu ve ark. (2014) ovaryan İ/R hasarı çalışmalarında 150 mg/kg Erd kullanarak Erd'in TOS ve OSI değerlerini anlamlı olarak azalttığını belirterek Erd'in oksidatif stresi azalttığını göstermişlerdir (Dokuyucu ve ark. 2014). Kurtoğlu ve ark. (2007) kısa süreli aort oklüzyonu ile akciğer hasarı oluşturdukları çalışmalarında, günlük 100 mg/kg Erd tedavisi uyguladıklarını ve Erd tedavi gruplarında lökosit birikimi ve lipid peroksidasyonu ile karakterize olan akciğer hasarının anlamlı olarak azaldığını belirtmişlerdir (Kurtoğlu ve ark. 2007). Bu bilgileri dikkate alarak deneysel hepatik İ/R modeli çalışmamızı, 45 dk iskemi 45 dk reperfüzyon olacak şekilde kararlaştırdıktan sonra; İ/R hasarının temel nedeni olan serbest radikal hasarının engellenmesi ya da minimize edilmesinde etkili olacağını düşündüğümüz, antiinflamatuvar ve antioksidan gibi terapötik etkileri tanımlanan Erd'i, tedavi grubunda 100 mg/kg/gün olacak şekilde kullandık.

İ/R hasarının belirlenmesi ve hasarın ne seviyede gerçekteştiğini tanımlamak için çeşitli histopatolojik hasar skorum sistemleri geliştirilmiştir. Önceki yapılan karaciğer İ/R modeli çalışmalarını incelediğimizde bu skorum sisteminde en sık yer alan parametreler Suzuki ve ark.'nın (1993) skorum tablosundaki; hücresel şişme, lipoid dejenerasyonu, sinüzoidal konjesyon, hemoraji, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, lobuler nekroz ve apoptoz parametreleridir (Suzuki ve ark. 1993). Yapılan birçok çalışmada araştırmacılar, hepatik İ/R hasarı ile meydana gelen fizyopatolojik değişiklikleri ve tedavi etkinliklerini öncelikle histopatolojik olarak bu ve benzeri parametreler üzerinden göstermişlerdir. Biz de çalışmamızda İ/R hasarını belirlemek ve kullandığımız Erd'in hasar üzerine etkinliklerini histopatolojik yönden incelemek için Suzuki parametrelerini kullandık.

Karaciğer hasarının tanısında kullanılan laboratuvar testlerinin önemini gösteren çalışmalar incelendiğinde, akut veya kronik karaciğer hasarı sonrası karaciğer enzimlerinin kanda artışı gösterilip; özellikle akut inflamatuvar olaylarda, hepatosit hasarının en önemli belirteci olarak artan transaminazlar (AST, ALT) ve LDH düzeylerinin olduğu bildirilmiştir (Şentürk ve ark. 2004, Dufour ve ark. 2000). Yine Seeto ve ark. (2000) iskemik karaciğer hasarında aminotransferaz düzeylerinin çok yüksek olduğunu bildirerek ayrıca vakalarının %80'inde, LDH ve bilirubin düzeyinin de yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Seeto ve ark. 2000). Biyokimyasal parametrelerin incelendiği birçok deneysel hayvan çalışmasında, reperfüzyon süreci ile yeniden oksijenasyonun SOR'un miktarında önemli bir artışa sebebiyet verdiği, bunun da antioksidan savunma sistemini baskılayarak başta reperfüze olan organ olmak üzere tüm vücutta oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir. Oksidan ve antioksidan dengelerinin totalde değerlendirilmesi ile oksidatif stres artışında, oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılan OSI hesaplanarak değerlendirme yapılmaktadır (Harma ve Erel 2003). Biz de önceki çalışmalarını dikkate alarak, çalışmamızda karaciğer hücre hasarını belirlemek ve kullandığımız ajanın karaciğer hücre hasarı üzerine etkilerini incelemek amacıyla AST, ALT, LDH, GGT, kreatinin, Üre, TAS, TOS ve OSI parametrelerinin analizini yaptık.

Hücre hasarının patogeneğinde önemli rol oynayan mekanizmalar üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, Hatano (2007) çalışmalarında İ/R hasarı dahil birçok karaciğer hasarında TNF- α 'nın, hepatositlerde meydana gelen apoptozda önemli bir rolü olduğunu bildirmiştir (Hatano 2007). Feldstein ve ark. (2003), nonalkolik steatohepatitli hastalarla yaptığı klinik çalışmalarında, TNF- α reseptörlerinin ekspresyonunun arttığını ve buna bağlı olarak oksidatif stres artışı ile apoptozis reseptör aktivasyonu artışından dolayı bu hastalıktaki hepatosellüler hasarın gerçekleştiğini belirtmişlerdir (Feldstein ve ark. 2003). Yine Veal ve ark. (2004) lipopolisakkaritlerle TNF- α stimülasyonunu arttırarak invitro karaciğer hasarı oluşturup, S-adenosil metiyonin'in ile hepatik makrofajlardan TNF- α salınımını azaltarak karaciğeri koruyucu özellik gösterdiğini bildirmişlerdir (Veal ve ark. 2004). Güner ve ark. (1997) yaptığı çalışmalarında, karaciğer İ/R hasarı ile beraber Kupffer hücrelerinin aktivasyonu ile TNF- α , IL-1 ve IL-6 salgılandığını belirterek, inflamasyonun başlangıcında proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1) salınarak inflamasyonun şiddetini arttırdığını, yardımcı sitokinlerin (IL-6, IL-8) salınımıyla da inflamatuvar hücreleri aktive ederek immün yanıtı oluşturduğunu bildirmişlerdir (Güner ve

ark. 1997). Yine Coelho ve ark. (2011) deneysel İ/R modeli oluşturdukları çalışmalarında, doymamış çoklu yağlardan (poliansatüre) oluşan diyet uyguladıkları gruplarında AST, ALT, TNF- α ve IL-6 düzeylerinde belirgin azalma gördüklerini belirtmişlerdir (Coelho ve ark. 2011). Biz de kullanmış olduğumuz antioksidan özelliği bilinen ilacın hepatik İ/R hasarı üzerine inflamatuvar etkilerini ve hasarın patogenezinde rol oynayan mekahnizmalara etkilerini araştırmak için inflamatuvar sürecin önemli parametreleri olan TNF- α ve IL-6 düzeylerini ölçtük.

Peter ve ark. (2013) çalışmalarında, karaciğer İ/R uygulanmış gruplarda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve sinüzoidal dilatasyonun önemli artış gösterdiğini belirterek, serum ALT seviyelerinde de diğer gruplarına kıyasla önemli artış olduğunu belirtmişlerdir (Peter ve ark. 2013).

Yıning ve ark. (2015) yaptıkları çalışmalarında, karaciğer doku morfolojisi açısından İ/R grubunda belirgin hücresel şişme, konjesyon ve sinüzoidlerde dilatasyon olduğunu belirtip, serumdaki ALT, AST ve LDH seviyelerinin de diğer tüm gruplara kıyasla İ/R grubunda, daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Oksidatif stres parametresi olarak lipit peroksidasyon son ürünü olan MDA (malondialdehit) düzeyinin, İ/R grubunda anlamlı artış gösterdiğini ve yine İ/R grubunda, TNF- α ve IL-1 β seviyelerinin de önemli derecede arttığını bildirmişlerdir (Yıning ve ark. 2015).

Qingqing ve ark.'nın (2013) hepatik İ/R hasarı çalışmalarında da İ/R grubunda bulunan sıçanların serum seviyelerindeki ALT ve AST düzeylerinin anlamlı derecede arttığını göstererek bu artışın iskemi reperfüzyon sonucu ortaya çıkan serbest radikallerin dokuda meydana getirdiği hasara bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Qingqing ve ark. 2013).

Bizim çalışmamızda da histopatolojik analizler değerlendirildiğinde, diğer tüm gruplara kıyasla İ/R grubunda hücresel şişme, konjesyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve apoptoz parametrelerinin anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($p < 0.05$). İ/R grubuna kıyasla tedavi grubunda hücresel şişme, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve apoptozun anlamlı derecede azaldığı belirlendi (sırasıyla $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$).

Karaciğer hücre hasarını gösteren AST, ALT, LDH, GGT, kreatinin ve üre düzeylerinin; yine diğer tüm gruplara kıyasla İ/R grubunda anlamlı derecede arttığı görüldü. İ/R grubuna kıyasla tedavi grubunda ise; AST, ALT, LDH, kreatinin ve GGT

seviyelerinin anlamlı derecede azaldığı belirlendi (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.01$, $p<0.01$, $p<0.01$, $p<0.05$).

Serbest radikallerin artışı ile antioksidan dengenin bozulması sonucu, oldukça reaktif olan serbest radikaller, hücre hasarına neden olmaktadır. Bu yüzden teorik olarak, dışarıdan antioksidan takviyesi ile İ/R hasarının engellenebileceği ya da hasarın şiddetinin azaltılabileceği düşünülmektedir. Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak MDA artışı ve/veya TOS artışı oksidatif hasarın önemli bir belirteçidir.

Ege ve ark. (2004) kontrol grubuna kıyasla İ/R grubunda GSH-Px'in (Glutasyon peroksidaz) önemli derecede azaldığını belirteip, tedavi grubunda ise; Erd'in, İ/R ile azalan GSH-Px aktivitesini önleyerek antioksidan dengeyi korumaya çalıştığını belirtmişlerdir (Ege ve ark. 2004).

Lee ve ark. (2010) renal İ/R hasarı araştırmalarında, Erd'in GSH-Px ve katalaz seviyelerini arttırdığını belirterek; Erd'in renal fonksiyonu koruduğunu ve İ/R grubuna kıyasla üre ve kreatinin seviyelerinin artışının önüne geçtiğini bildirmişlerdir (Lee ve ark. 2010).

Yeşildağ ve ark. (2009) sıçanlar üzerinde radyokontrast ajanlar ile oluşturdukları hepatotoksisiteye karşı, Erd uygulamalarının enzimatik antioksidan sistem ile SOR üretimini inhibe ederek karaciğerdeki toksik etkiyi azalttığını bildirmişlerdir (Yeşildağ ve ark. 2009).

Tunc ve ark.'nın (2009) yaptığı intestinal İ/R hasarı çalışmalarının sonuçlarında diğer çalışmalara benzer şekilde, İ/R grubuna kıyasla tedavi gruplarında kullandıkları Erd'in, oksidatif stres göstergesi olan MDA seviyesini önemli derecede azalttığını ve antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığını göstermektedir (Tunc ve ark. 2009).

Ozerol ve ark.'nın (2009) yaptığı beyin İ/R hasarı araştırmalarında, Erd gruplarında katalaz aktivitesinin oldukça yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirterek, tedavi gruplarında (Erd+İ/R) ise Erd'in endojen antioksidan enzim eksikliğini önüne geçtiğini bildirmişlerdir (Ozerol ve ark. 2009).

Dokuyucu ve ark. (2014) ovaryan İ/R hasarı çalışmalarında, sham grubuna kıyasla İ/R gruplarında TOS ve OSI seviyelerinin anlamlı artış gösterdiğini belirterek, İ/R gruplarındaki OSI ve histopatolojik skorlama arasında güçlü korelasyon bulunduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca Erd tedavisi uyguladıkları gruplarında TOS ve OSI değerlerinin anlamlı olarak azaldığını belirterek, Erd'in oksidatif stresi azalttığını göstermişlerdir (Dokuyucu ve ark. 2014)

Çalışmamızda oksidatif hasarın şiddetini belirlemek ve kullandığımız maddenin bu hasarı önlemedeki başarısını saptamak amacıyla gruplarımızda TAS ve TOS ölçümü yaptık ve bulduğumuz TOS değerlerini yüzde cinsinden TAS değerlerine oranlayarak oksidatif stresin önemli bir göstergesi olan OSI değerlerini belirledik. Kontrol ve sham grubuna kıyasla İ/R grubunda, TAS'da anlamlı azalma saptandı ($p < 0.05$). Tedavi grubunda ise İ/R grubuna kıyasla anlamlı TAS artışı gözlemlendi ($p < 0.05$).

Gruplar arasında TOS ve OSI açısından değerlendirme yaptığımızda, diğer gruplara kıyasla İ/R grubunda TOS ve OSI'nin anlamlı derecede arttığı saptandı ($p < 0.001$). Tedavi grubunda ise İ/R grubuna kıyasla TOS ve OSI parametrelerinde anlamlı bir azalma gözlemlendi (sırasıyla $p < 0.01$, $p < 0.001$).

Proinflamatuvar sitokin olan TNF- α , endotel hücreleri ve nötrofilleri aktive ederek hepatik mikrosirkülasyonu bozar ve hepatoselüler hasarın ortaya çıkmasına neden olur (Kolb ve ark. 2001). Bu yüzden İ/R hasarının engellenmesi ya da minimize edilmesi için, TNF- α düzeyinin azalması önemli bir belirteç olacaktır. Ayrıca yardımcı sitokinlerden IL-6 salınımı da inflamatuvar hücreleri aktive ederek immün yanıtı oluşturduğunu için IL-6 seviyesi İ/R hasarının tedavisinde önemli başka bir belirteç olacaktır. Çalışmamızda diğer tüm gruplara kıyasla İ/R grubunda TNF- α ve IL-6 düzeylerinde anlamlı artış gözlenirken, İ/R grubuna kıyasla tedavi grubumuzda, TNF- α ve IL-6 düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı saptandı.

Histopatolojik ve biyokimyasal analizlerimizin sonucunda; tüm gruplara kıyasla İ/R grubunda hasarın etkileri uyum göstermektedir. İ/R grubuna kıyasla tedavi grubunda (Erd+İ/R) ise, Erd'in antioksidan etki göstererek, İ/R hasarının şiddetini azalttığı ve daha az hücre doku harabiyeti oluşturduğu görülmektedir.

Çalışmamızın moleküler analizinde qRT-PCR sonucu gen ekspresyonlarının istatistiksel verileri değerlendirildiğinde; İ/R uygulanan gruplarda TRPM ekspresyonları artmıştır. Akut dönemde oluşan doku harabiyetini minimize edebilmek amacıyla, daha çok Ca²⁺ alabilmek için kanal sayısı oldukça artmaktadır. Ancak İ/R sürecinde biriken SOR'dan dolayı, hücre içine giren Ca²⁺ hücreyi korumak yerine apoptoza doğru götürmektedir. İ/R hasar sonrası doku, harabiyeti azaltmaya çalışırken, ortamdaki SOR azaldığı için kanallar tekrar artmaya başlar ve TRPM ekspresyonlarında artış görülür. TRPM2, 6 ve 7 kanalları hem iyon kanalı hem de aynı proteinde enzimatik aktivite

içermektedir. Farklı TRP proteinlerinin, farklı uyarılara ve uyarının şiddetine göre, Ca^{+2} ve Na^{+} iyonlarının geçirgenliğini de değiştirdiği bilinmektedir.

İskemi sürecinde hücrede moleküler anlamda ilk düzenleme TRPM kanal sayısının artışı şeklinde oluyor, ancak reperfüzyon esnasında hücre ölümünün başlaması ile TRPM kanal ekspresyonlarının azalması görülmektedir. İ/R grubunun histopatolojik ve biyokimyasal parametrelerine bakıldığında oluşan hasarın TRPM gen ekspresyonlarına da uygunluk gösterdiğini görmekteyiz.

Dhar ve ark. (1996), Isozaki ve ark. (2000), Kurita ark. (1993), Takemoto ve ark. (1994), yapmış oldukları karaciğer iskemi reperfüzyon çalışmasında reperfüzyondan sonra totalde hepatosit Ca^{+2} miktarı ve mitokondrideki Ca^{+2} miktarında önemli bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir (Dhar ve ark. 1996, Isozaki ve ark. 2000, Kurita ark. 1993, Takemoto ve ark. 1994). Hepatositlere Ca^{+2} girişinin artmasının temel araçlarından birinin reperfüzyonun ilk aşamasında hepatosit ve Kupffer hücrelerinin ürettiği SOR olduğu düşünülmektedir (Glantzounis ve ark. 2005).

Manoja ve ark. (2009) serebral iskemi çalışmalarında, Na^{+} kanalının bloke edilmesi ile iskemi sonrasında; hızlı ATP düşüşü, iyon dengesinde bozulma ve hücre içinde aşırı Ca^{+2} artışı gözlemlediklerini belirterek, kortikal nöronlardaki hücre ölümlerindeki Na^{+} ve Ca^{+2} iyonlarının önemini belirtmişlerdir (Manoja ve ark. 2009).

TRPM2 kanallarının en önemli özelliği C-terminal üzerindeki ADPR pirofosfataz enzimi bulunan nudix bölgesidir. Oksidatif stresin belirteci olan ADPR'nin nudix bölgesine spesifik bağlanmasıyla aktive edilen ADPR pirofosfataz enzimi; Na^{+} , K^{+} ve Ca^{+2} 'a geçirgen seçici olmayan TRPM2 kanallarının açılmasını sağlamaktadır (Clapham 2007, Saygın ve Nazıroğlu 2010, Nazıroğlu ve Lückhoff 2008).

Wehage ve ark. (2002) çalışmalarında TRPM2 kanallarının hem ADPR hem de H_2O_2 tarafından aktive olduğunu belirterek, bu kanallar sayesinde Ca^{+2} 'un hücre içine daha fazla girdiğini bildirmişlerdir (Wehage ve ark. 2002). Çelik (2011) araştırmasında, Wehage ve ark.'nın çalışmasına benzer olarak; H_2O_2 ile TRPM2 katyon kanallarının doğrudan aktive olduğunu belirterek, oksidatif stres ürünlerinden H_2O_2 'nin TRPM2 kanallarını aktive ettiğini bildirmiştir (Çelik 2011).

Övey (2013) araştırmasında, dolaylı kanal blokörleri ile TRPM2 kanallarını bloke ederek, hücre içi Ca^{+2} miktarının azaldığını belirtip, bu azalmanın TRPM2 kanalları

üzerinden Ca^{+2} 'un hücre içine girişini inhibe ederek gerçekleştiğini bildirmiştir (Övey 2013).

Yamamoto ve ark. (2008) inflamatuvar bağırsak hastalığı araştırmalarında, TRPM2 aracılığıyla Ca^{+2} girişinin monositlerde kemokin üretimini uyardığını belirterek, TRPM2 kanalının, inflamasyon bölgesine nötrofillerin göçü ve doku hasarı ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (Yamamoto ve ark. 2008)

Miller ve Cheung (2015) kardiyak iskemi ve nöroblastomada, TRPM2'nin hasar sürecinde hücrenin canlılığını sürdürebilmesi için birçok fizyolojik sistem ve fizyopatolojik süreçte önemli yeri olan, mitokondriyal fonksiyonda temel rolü üstlendiğini belirtmişlerdir (Miller ve Cheung 2015)

Miller ve ark. (2014) kardiyak İ/R hasarı üzerine yaptıkları araştırmalarında, kardiyak TRPM2 kanallarını flufenamik asit ile blokladığını ve intraselüler ADPR ile aktive ettiğini belirtmişlerdir. Ayrıca TRPM2 kanallarının SOR'ları azaltarak ve mitokondriyal disfonksiyonu düzelterek kalbi İ/R hasarından koruduğunu bildirmişlerdir (Miller ve ark. 2014).

Gao ve ark. (2014) Böbrek iskemi hasarını inceledikleri araştırmalarında, Hücre membranında artan TRPM2 ekspresyonunun, NADPH oksidaz kompleksinin bir parçası olan, RAC1'i aktive ettiğini belirtmişlerdir. TRPM2 bağımlı RAC1 aktivasyonun da oksidatif stresi arttırdığını göstererek, RAC1 inhibisyonunun oksidatif stres ve iskemik hasarı azalttığını bildirmişlerdir (Gao ve ark. 2014)

Zhan ve ark. (2014) serebral iskemi modeli oluşturdukları çalışmalarında, serebral iskemi uyguladıkları sıçanların serebral korteksinde TRPM7 mRNA ekspresyonunun anlamlı derecede arttığını belirtmişlerdir. Ayrıca uyguladıkları ajanın (Lactuside) TRPM7 mRNA ekspresyonunu azaltarak, hasarın neden olduğu; serebral ödem ve sinir hücresi hasarını azalttığını bildirmişlerdir (Zhan ve ark. 2014).

Dokuyucu ve ark. (2014) renal iskemi sonrası farklı reperfüzyon sürelerinde TRPM6 ve 7 ekspresyonlarını değerlendirmişlerdir. Daha önce yapılan 24 saat ile sınırlı reperfüzyon çalışmasına değinerek, kendi yaptıkları 48 saat reperfüzyon ile oluşan renal dokudaki değişikliklerin bu kanalların ekspresyonunu da değiştirdiğini bildirmişlerdir. İstatistiksel anlamlılık bulamaları da her iki gen ekspresyonunun da azaldığını belirterek TRPM6 ve 7 ekspresyonlarının artmış olabileceğini ancak reperfüzyondan 48 saat sonra bu

kanalların ekspresyonunun normal seviyelerine döndüğünü düşündüklerini bildirmişlerdir (Dokuyucu ve ark. 2014).

Dusmez ve ark. (2014) renal İ/R çalışmalarında, İ/R grubuna kıyasla Ca^{+2} ve Na^{+2} kanal blokörü kullandığı gruplarında TRPM2, TRPM4 ve TRPM6 ekspresyonlarının arttığını ancak TRPM7 ekspresyonlarının azaldığını göstermişlerdir. Ayrıca çalışmalarında böbrek dokusunda TRPM1, TRPM3, TRPM5 ve TRPM8'in ekspresyonlarını belirleyemediklerini bildirerek kullandıkları Ca^{+2} ve Na^{+2} kanal blokörlerinin TRPM kanallarına etkisinden dolayı İ/R hasarının şiddetini önemli derecede azaltacağını bildirmişlerdir.

Demir ve ark. (2014) yapmış oldukları miyokardiyal İ/R çalışmasında, TRPM1-8 gen ekspresyon düzeylerini inceleyerek; TRPM2, 4 ve 6 gen ekspresyon düzeylerinin değişmediğini ancak TRPM7 gen ekspresyon düzeyinin arttığını belirterek TRPM7 ve miyokardiyal İ/R arasında pozitif bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada TRPM1, 3, 5 ve 8'in kalp dokusunda gen ekspresyonunun yapılamadığını belirtmişlerdir (Demir ve ark. 2014).

Çalışmamızda, diğer gruplara kıyasla İ/R grubunda TOS ve OSI artışı ile birlikte bu grupta TRPM2 ekspresyonunun artışı görülmektedir. İ/R grubuna kıyasla tedavi grubunda (Erd+İ/R) ise, TRPM2 ekspresyonlarının anlamlı derecede azaldığı görülmektedir ($p < 0.01$).

Aarts ve ark. (2003) TRPM7 ve diğer pek çok TRP kanallarının SOR ve NO ile aktive edildiğini belirterek, SOR üretilmesini indükleyen toksik hasara karşılık TRPM7'nin nöronlara Ca^{+2} ve Na^{+} girişine aracılık ettiği ve dolayısıyla hücre ölümüne yol açtığını bildirmişlerdir (Aarts ve ark. 2003).

Thomas ve ark. (2004) TRPM6'nın intestinal ve renal sistemlerdeki Mg^{+2} akışında önemli olduğunu belirtmişlerdir (Thomas ve ark. 2004). Yine Mingjiang ve ark. (2006) çalışmalarında TRPM6 ve 7'nin Mg^{+2} homeostazisindeki rolünü vurgulayarak, TRPM6 aktivitesinin artırılması ile $Mg^{+2} - Ca^{+2}$ iyon akışında anlamlı derecede artış olduğunu bildirmişlerdir (Mingjiang ve ark. 2006).

Asuthkar ve ark. (2014) TRPM8 proteinin bir testosteron reseptörü olduğunu ve ayrıca TRPM8 geninin androjen düzenlemesine aracılık ettiğini belirtmişlerdir. Ayrıca

testosteronun doğrudan TRPM8 proteinine bağlandığını ve TRPM8 aracılı akımları ve Ca^{+2} tepkilerini aktive ettiğini göstermişlerdir (Asuthkar ve ark. 2014).

TRPM8 çeşitli solid tümörlerde eksprese edilmiş olup kanser hücrelerinde bu kanalların fonksiyonel rolleri tespit edilmiştir. Thebault ve ark. (2005) prostat kanser hücrelerinin mentol, soğukluk ve icilnle uyarılması sonucu, yüksek Ca^{+2} geçirgenliğine seçicilik gösteren bir membran akımının oluştuğunu belirterek, bu membran akımının; endoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salınmasını ve plazma membranında bulunan depo kanalların aktivasyonu ile eşzamanlı Ca^{+2} girişini sağladığını belirtmişlerdir (Thebault ve ark. 2005).

TRPM6 ve TRPM7 kanallarının uç kısmında da alfa-kinaz enzim bölgeleri mevcuttur (Watanabe ve ark. 2008). Karboksi ucu ($COOH$) serin – treonin ile aktive olmaktadır ve bu kanallar Ca^{+2} ve Mg^{+2} 'a oldukça geçirgendir (Saygın ve Nazıroğlu 2010). Çalışmamızda, tedavi grubuna kıyasla İ/R grubunda TRPM6 ekspresyonunun artışı görülmektedir ($p < 0.05$). İ/R grubuna kıyasla tedavi grubunda (Erd+İ/R) ise, TRPM6 ekspresyonlarının azalışı görülmektedir ($p < 0.05$). İ/R grubuna kıyasla tedavi grubunda TRPM7 ve TRPM8 ekspresyonlarının anlamlı derecede azaldığı görülmektedir ($p < 0.001$).

İ/R hasarında, hücre ölümünde artışın olması ile bunu dengelemek için hücre bölünme eğilimini artırır. TRPM6 ve 7'nin geçirgen olduğu Mg^{+2} iyonu da hücre bölünmesinin kontrolünde önem arz etmektedir. Burada hücre bölünmesinin sağlanabilmesi nedeniyle, Mg^{+2} girişini artırabilmek için bu kanalların ekspresyonlarının, İ/R grubunda arttığı düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Deneysel karaciğer İ/R modeli oluşturduğumuz bu çalışmamızda, Erd'in hem oksidatif strese bağlı olarak oluşan karaciğer hasarı üzerine hem de TRPM2 ve 8 kanalları üzerine etkilerini araştırdık. Çalışmamızda histopatolojik, biyokimyasal ve moleküler analiz sonuçlarımıza göre; İ/R grubuna kıyasla Erd'in kullanıldığı tedavi grubunda (Erd+İ/R), histopatolojik skorlama parametrelerinin anlamlı derecede azalması ile doku harabiyetini azalttığı, hasarın göstergesi olarak kullandığımız aminotransferazlar, LDH ve GGT seviyelerinin de anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Erd'in antioksidan özelliği TOS'u azaltırken, TAS'ı anlamlı derecede artırmıştır. Antiinflamatuvar etkisini göstererek TNF- α ve IL-6 seviyesini düşürerek hasarın azaltılmasında etkin bulunmuştur. Karaciğer dokularında TRPM2, TRPM 6, TRPM 7 ve TRPM 8 kanallarının varlığı genetik çalışmalar ile gösterilmiştir. Erd'in kullanıldığı tedavi grubu (Erd+İ/R) ile kıyaslandığında İ/R grubunda kanal ekspresyonlarının anlamlı derecede arttığı görülmüştür.

Erd'in, TRPM2, TRPM 6, TRPM 7 ve TRPM 8 gen ekspresyon seviyelerini azaltarak, Ca⁺² ve Mg⁺²'un hücre içine girişini engelleme yönünde etki ettiğini gösterdik. Bu durum Erd'in İ/R'ye bağlı hücre hasarı azaltıcı yönde etki ettiği düşüncesini akla getirmektedir. Bu kanalların karaciğer rahatsızlıklarında, Ca⁺² girişi ile alakalı olarak, daha ileri düzey moleküler çalışmalar ile araştırılması gerekmektedir.

Erd'in İ/R hasarı üzerine iyileştirici etkisinin görülmesine rağmen klinik olarak önerilebilmesi için daha geniş karşılaştırmalı deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca Erd'in antioksidan özelliğinin gösterildiği sınırlı sayıda çalışma olduğundan verilerimiz bundan sonraki çalışmalara da katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

1. **Aarts M, Iihara K, Wei WL, Xiong ZG, Arundine M. ve ark.** A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death, *Cell*. **2003**; (115): 863–877.
2. **Akkuş İ.** Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları. **1995**; 157.
3. **Alexander SPH, Mathie A, Peters JA.** Guide to Receptors and Ion Channels . Br. J. Pharmacol., **2004**, 141 (Suppl. 1); 1- 126.
4. **Almaraz L, Manenschijn JA, de la Pena E, Viana F.** TRPM8. In Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels; Nilius, B., Flockerzi, V., Eds.; Handbook of Experimental Pharmacology; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, **2014**; 222:547–579.
5. **Asensio JA, Demetriades D, Chahwan S, Gomez H ve ark.** Approach to the management of complex hepatic injuries. *J Trauma* **2000**; 48: 66-9.
6. **Astarcioğlu, H.** Karaciğer nakli modelinde, mentoksifilin normotermik ve soğuk iskemiye karşı koruyucu etkisi, Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İzmir **1998**.
7. **Asuthkar S, Demirkhanyan L, Sun X, Elustondo PA, Krishnan V. ve ark.** The TRPM8 protein is a testosterone receptor. II. Functional evidence for an ionotropic effect of testosterone on TRPM8. *J. Biol. Chem.* **2015**; 290: 2670–2688.
8. **Atila K, Coker A, Sagol O, Coker I, Topalak O. ve ark.** Protective effects of carnitine in an experimental ischemia-reperfusion injury. *Clinical Nutrition* **2002**, 4: 309-13.
9. **Aytekin Y, Solakoglu S.** Temel Histoloji, Nobel Tıp Kitabevi, **2006**, 332-347.
10. **Barritt GJ, Chen J, Rychkov GY.** Ca²⁺-permeable channels in the hepatocyte plasma membrane and their roles in hepatocyte physiology. *Biochimica et Biophysica Acta* **2008**; (1783): 651–672
11. **Baykara B. ve Tekmen I.** Karaciğer iskemi reperfuzyon hasarı, DEU Tıp Fakültesi Dergisi , **2005**; 19 (3), 185-194.
12. **Berber I, Yiğit B, Işitmangil G, Tellioglu G, Ozgezer T. ve ark.** Evaluation of pretransplant serum cytokine levels in renal transplant recipients. *Transplantation proceedings* **2008**; 40(1): 92-3.
13. **Birnbaumer L.** The TRPC class of ion channels: a critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca(2+) concentrations. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2009**, 49, 395-426
14. **Bismuth H.** surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. *W J Surg*, **1982**; 8-2.
15. **Bless NM, Warner RL, Padgaonkar VA, at al.** Roles for C-X- C chemokines and C5a in lung injury after hindlimb ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* **1999**; 276(1): L57-63.
16. **Blumgart LH, Fong Y.** Surgery of the liver and biliary tract. Edinburgh: Churchill Livingstone. **2000**, 3: 5.
17. **Botchkarev N, Shander D.** Reduction of hair growth. International patent. WO **2007**; 099504.
18. **Braga PC, Dal Sasso M, Sala MT, Gianelle V.** Effects of erdosteine and its metabolites on bacterial adhesiveness. *Arzneimittelforschung* **1999** ;49(4):344-50
19. **Britannica Online Encyclopedia.** Liver(anatomy) – Erişim: **2009** , <http://www.britannica.com/EBchecked/topic-art/344579/68633/Anterior-and-posterior-views-of-the-liver>.
20. **Canbek M, Uyanoglu M, Bayramoglu G, Senturk H, Erkasap N ve ark.** Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver, *Photomedicine*, **2008**, 15: 447-452.
21. **Carden DL, Granger DN.** Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* **2000**; 190: 255-66.
22. **Carini R, et al.** Alterations of cell volume regulation in the development of hepatocyte necrosis. *Experimental cell research*, **1999** ; 248(1): 280-293.
23. **Carroll, WR, Esclamado, RM.** Ischemia/reperfusion injury in microvascular surgery. *Head Neck*, **2000**; 22, 700-713.
24. **Carter DS, Russel RCG, Pitt HA, Bismuth H.** Hepatobiliary and pancreatic surgery, 1-4. London. *Cahpman- Hall Med*, **1996**; 5.th Ed.
25. **Chen YX, Sato M, Kawachi K, Abe Y.** Neutrophil-mediated liver injury during hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis. Int.* **2006**; 5(3): 436-42.
26. **Clapham DE.** Snapshot: mammalian TRP channels. *Cell*. **2007**; 129, 220.
27. **Clapham DE.** TRP channels as cellular sensors. *Nature*. **2003**; 426, 517-524.
28. **Clarke CN, Tevar AD, Lentsch AB.** (Eds) Molecular pathology of liver diseases, Hepatic ischemia/reperfusion injury, Springer Science+Business Media, 2011; 397-410.
29. **Coelho AM, Machado MC, Takahashi HK, et al.** Ischemic preconditioning-like effect of polyunsaturated Fatty Acid-rich diet on hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Gastrointest Surg* **2011**; 15:1679-88.

30. **Couinaud C.** Le Foi. Etudes anatomiques et chirurgicales **1957**.
31. **Çakatay U, Kayalı R.** Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi. Cerrahpasa Tıp Dergisi, **2006**; 37:162-167.
32. **Çelik Ö.** Oksidatif Stresle Aktive Edilen TRPM2 Katyon Kanallarının İnaktivasyonunda Melatoninin Etkisinin Patch-Clamp Sistemi İle Araştırılması. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, **2011**.
33. **D'Angelica M, Fong Y.** The liver. Ed. Townsend CM Jr, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL. Sabiston Textbook of Surgery. 17. edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, **2004**, 1513-69.
34. **Dadon D, Minke B.** Cellular functions of transient receptor potential channels. Int J Biochem Cell Biol. **2010** ;42(9):1430-45.
35. **Demir T ve ark.** "Evaluation of TRPM (transient receptor potential melastatin) genes expressions in myocardial ischemia and reperfusion." *Molecular biology reports* **2014**; 41(5): 2845-2849.
36. **Dere F.** Karaciğer Anatomisi. **1994**, 3: 633-635.
37. **Dhar DK, Takemoto Y, Nagasue N, Uchida M, Ono T ve ark.** FK506 maintains cellular calcium homeostasis in ischemia-reperfusion injury of the canine liver, J. Surg. Res. **1996**; (60): 142–146.
38. **Dogan S, Aslan M.** Hepatic ischemia-reperfusion injury and therapeutic strategies to alleviate cellular damage. Hepatology research: the official journal of the Japan Society of Hepatology **2011**; 41: 103-17.
39. **Dokuyucu R, Karateke A, Gokce H, Kurt RK, Ozcan O ve ark.** Antioxidant effect of erdosteine and lipoic acid in ovarian ischemia-reperfusion injury. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. **2014**;183:23-7.
40. **Dokuyucu R, Gogebakan B, Yumrutas O, Bozgeyik I, Gokce H ve ark.** Expressions of TRPM6 and TRPM7 and histopathological evaluation of tissues in ischemia reperfusionperformed rats. Ren Fail. **2014**;36(6):932-6.
41. **Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB.** Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. Clin Chem **2000**;46:2027-49.
42. **Dusmez D, Cengiz B, Yumrutas O, Demir T, Oztuzcu S ve ark.** Effect of verapamil and lidocaine on TRPM and NaV1.9 gene expressions in renal ischemia-reperfusion. *Transplant Proc.* **2014**;46(1):33-9.
43. **Edoctoronline.com/medical-atlas.asp?c=4&id= title=Liver anatomy>Liver anatomy;2010.**
44. **Ege E, Ilhan A, Gurel A, Akyol O, Ozen S.** Erdosteine Ameliorates Neurological Outcome and Oxidative Stress due to Ischemia/Reperfusion Injury in Rabbit Spinal Cord. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. **2004**; 28(4)379–386
45. **Erd Prospektus.** <http://pdf.ilacprospektusu.com/10538-erdostin-300-mg-kapsul-kub.pdf>
46. **Erel O.** A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clinical Biochemistry **2005**; 9:1-9.
47. **Erel O.** A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clinical Biochemistry **2004**; 37:277-85.
48. **Ersöz N.** Tıp ve Biyoloji. Kan Histolojisi. (<http://necdetersoztip.blogspot.com.tr/2015/11/kan-histolojisi.html>) **2015**.
49. **Fadillioglu E, Erdogan H, Sogut S, Kuku I.** Protective effects of erdosteine against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. J Appl Toxicol **2003**, 200; 23(1): 71-74.
50. **Fausto N.** Liver regeneration: from laboratory to clinic. Liver Transpl. **2001**; (7): 835-44.
51. **Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD.** Hepatocyte apoptosis and Fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. Gastroenterology **2003**;125:437–43.
52. **Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW.** Hepatic ischemia/reperfusion injury – a fresh look. Exp Mol Pathol. **2003**;74:86–93.
53. **Frangogiannis NG.** Chemokines in ischemia and reperfusion. Thromb Haemost. **2007**; 97: 738-747.
54. **Gao G, Wang W, Tadagavadi RK, Briley NE, Love MI ve ark.** TRPM2 mediates ischemic kidney injury and oxidant stress through RAC1. J Clin Invest. **2014**; 124(11):4989-5001.
55. **Ghiselli A, Serafini M, Natella F.** Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. Free Radic Biol Med. **2000**; 29: 1106-1114.
56. **Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, Davidson BR, Seifalian AM.** The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemiareperfusion injury: a review. Liver Transpl **2005**;11:1031–47.

57. **Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, Davidson BR, Seifalian AM.** The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: a review.[see comment], *Liver Transplantation*. **2005**; (11): 1031–1047.
58. **Goldsmith NA, Woodburne RT.** Surgical anatomy pertaining to liver resection. *Surg Gynecol Obstet*, **1957**, 195:310-318.
59. **Gurusamy KS, Sheth H, Kumar Y, Sharma D, Davidson BR.** Methods of vascular occlusion for elective liver resections. *Cochrane Database Syst Rev* **2009**;(1):CD007632.
60. **Guyton AC, Hall JE.** Textbook of medical physiology. The liver as an organ. 12. edition, Philadelphia: WB Saunders company, **2011**: 837-42.
61. **Günaydın B, Çelebi H.** Genel Anesteziklerin Serbest Radikaller ve Antioksidanlarla İlişkileri, *Anestezi Dergisi* **2003** ; 11 (2):87-98.
62. **Güner İ, Özmen D, Bayındır O.** Sitokinler. *T Klin J Med sci* **1997** ; 17: 65-74
63. **Halliwell B, Clement MV, Long LH.** Hydrogen Peroxide in the Human Body, *FEBS letters* , **2000**; 486:1-3.
64. **Halliwell B.** Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. **1994**; 344:721-724.
65. **Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M et al.** LTRPC2 Ca²⁺-Permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol. Cell*. **2002**, 9: 163-73.
66. **Hardie RC. and Minke B.** The Trp Gene Is Essential for a Light-Activated Ca²⁺ Channel in Drosophila Photoreceptors, *Neuron*. **1992**, 8: 643-51
67. **Harma M, Erel O.** Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Med Wkly* **2003**; 133(41- 42):563-6.
68. **Hatano E.** Tumor necrosis factor signaling in hepatocyte apoptosis. *J Gastroenterol Hepatol* **2007**;22:43–4.
69. **Hecquet CM, Ahmmed GU, Vogel SM, Malik AB.** Role of TRPM2 Channel in Mediating H₂O₂-Induced Ca²⁺ Entry and Endothelial Hyperpermeability. *Circ Res*. **2008**;102 (3): 347-55
70. **Heiner I, Eisfeld J, Luckhoff A.** Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes. *Cell. Calcium*. **2003** ;33, 533-40.
71. **Hosoe H, Kaise T, Ohmori K, Isohama Y, Kai H, Takahama K, Miyata T.** Mucolytic and antitussive effects of erdosteine. *J Pharm Pharmacol* **1999**; 51: 959-966.
72. **Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, et al.** IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* **2001**; 14: 705-714.
73. **Inamura K, Sano Y, Mochizuki S, Yokoi H, Miyake A, Nozawa K, Kitada C, Matsushime H, Furuichi K.** Response to ADP-ribose by activation of TRPM2 in the CRI- G1 insulinoma cell line. *J. Membr. Biol*. **2003**; 191, 201-207.
74. **Isozaki H, Fujii K, Nomura E, Hara H.** Calcium concentration in hepatocytes during liver ischaemia-reperfusion injury and the effects of diltiazem and citrate on perfused rat liver, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol*. **2000**; (12): 291–297.
75. **Jennings RB, Reimer KA.** The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* **1991**, 42: 225-246.
76. **Johnson CD, Melanaphy D, Purse A, Stokesberry SA, Dickson P, Zholos AV.** Transient receptor potential melastatin 8 channel involvement in the regulation of vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2009**; 296: 1868–1877
77. **Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO.** *Temel Histoloji*, Barış Kitapçılık, İstanbul, **1998**, 307-319.
78. **Junqueira LC, Carneiro J.** Basic Histology Text & Atlas (10th ed). McGraw- Hill Companies, USA **2003**, pp.332-44.
79. **Kahraman A, Erkasap N, Serteser M, Köken T.** Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *J Nephrol*, **2003**, 16(2): 219-24.
80. **Kato A, Gabay C, Okaya T, Lentsch AB.** Specific role of interleukin- 1 in hepatic neutrophil recruitment after ischemia/ reperfusion. *Am J Pathol* **2002**;161:1797-803.
81. **Kierszenbaum AL,** Histoloji ve hucre biyolojisi : patolojiye giris (Cev. R. Demir), Palme yayıncılık, **2006**, 459-468.
82. **Kim YI.** Ischemia-reperfusion injury of the human liver during hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **2003**;10:195-9.
83. **Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC ve ark.** Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. **2001**;107: 1529-1536.

84. **Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R.** Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell.* **2005**;18(1):61-9.
85. **Korosec P, Jezernik K.** Early cellular and ultrastructural response of the Mouse liver to ischemia. *Virchows Arch.* **2000**;436(4): 377–83.
86. **Kraft R. and Harteneck C.** The Mammalian Melastatin-Related Transient Receptor Potential Cation Channels: An Overview, *Pflugers Arch,* **2005**, 451:204-11
87. **Kumar V, Cotran R, Robbins SL.** Temel patoloji (Basic Pathology),6. Edisyon. **2000** ; 6-10 ,30-36.
88. **Kurita K, Tanabe G, Aikou T, Shimazu H.** Ischemic liver cell damage and calcium accumulation in rats, *J. Hepatol.* **1993**;(18):196–204.
89. **Kurtoglu T, Sacar M, Inan BK, Duver MH, Guler A ve ark.** Erdosteine ameliorates lung injury induced by transient aortic occlusion in rats. *Cardiovasc J Afr.* **2007**;18(6):367-70.
90. **Lee JY, Kim HS, Park CS, Kim MC.** Erdosteine in renal ischemia-reperfusion injury: an experimental study in pigs. *J Vet Med Sci.* **2010**;72(1):127-30.
91. **Lentsch AB, et al.** Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology,* **2000**; 32(2): p. 169-173.
92. **Liu B, Ma ZY, Wu G, Qian JM.** Butyrate protects rats from hepatic ischemia/reperfusion injury. *Int J Clin Exp Med.* **2015**; 8(4): 5406–5413.
93. **Liu TZ, Lee KT, Chern CL, Cheng JT, Stern A, Tsai LY.** Free radical-triggered hepatic injury of experimental obstructive jaundice of rats involves overproduction of proinflammatory cytokines and enhanced activation of nuclear factor kappaB. *Ann Clin Lab Sci* **2001**;31:383 90.
94. **Lygidakis NJ, Tytgat GNJ.** Hepatobiliary and pancreatic malignancies. New York, Thieme Medical Publishers Inc.**1989**, 458.
95. **Mandrekar P, Szabo G.** Inflammation and Liver Injury. In: Monga B, Satdarshan PS (eds), *Molecular Pathology of Liver Diseases.* Springer Science, New York **2011**, pp.411-25.
96. **Manoja KB, Preeti D, Saurabh V, Srikanta KR, Puja G. ve ark.** The neuronal apoptotic death in global cerebral ischemia in gerbil: Important role for sodium channel modulator. *Journal of Neuroscience Research* **2009**;87:1400–1411.
97. **Marks WM, Filly RA, and Callen PW.** *Ultrasonic anatomy of the liver: a review with new applications.* *J Clin Ultrasound,* **1979**, 7(2): p. 137-46.
98. **McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D.** Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature.* **2002**: 416: 52–58.
99. **Miller BA.** The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death. *J. Membr. Biol.* **2006**, 209: 31-41.
100. **Miller BA ve Cheung JY.** TRPM2 protects against tissue damage following oxidative stress and ischemia-reperfusion *J Physiol.* **2015**.
101. **Miller BA, Hoffman NE, Merali S, Zhang XQ, Wang J ve ark.** TRPM2 channels protect against cardiac ischemia-reperfusion injury: role of mitochondria. *J Biol Chem.* **2014**; 289(11):7615-29
102. **Mingjiang L, Jianmin J, Lixia Y.** Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7. *The journal of general physiology.* **2006**;5:525-537.
103. **Mohammed FF, Khokha R.** Thinking outside the cell: proteases regulate hepatocyte division, *Trends Cell Biol.* **2005**;(15) 555–563.
104. **Montalvo-Jave E.E.** Factors in the pathophysiology of the liver ischemiareperfusion injury, *Journal of Surgical Research.* **2008**; 147, 153-159.
105. **Montell C, Rubin GM.** Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron.* **1989** Apr;2(4):1313-23.
106. **Montell C.** Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE.* **2001**;2001(90):re1.
107. **Nakajima Y, Shimamura T, Kamiyama T, Matsushita M, Sato N, Todo S.** Control of intraoperative bleeding during liver resection: analysis of a questionnaire sent to 231 Japanese hospitals. *Surg Today* **2002**;32:48–52.
108. **Naziroğlu M, Lückhoff A.** A calcium influx pathway regulated separately by oxidative stress and ADP-ribose in TRPM2 channels: Single channel events. *Neurochem. Res.* **2008** ; 33, 1256-1262.
109. **Nelson K, Herndon B, Reisz G.** Pulmonary effects of ischemic limb reperfusion: evidence for a role for oxygen- derived radicals. *Crit Care Med* **1991**;19(3):360-3.
110. neu.surgicaloncology.de/contenttr/multimodal.php
111. **Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA.** Transient Receptor Potential cation channels in disease. *Physiol Rev.* **2007**, 87; 165-217.

112. **Oğuz A.** Hepatik İskemi-Reperfüzyon Modelinde Curcumin'in Karaciğer ve Uzak Organ Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır, **2010**
113. **Ozerol E, Bilgic S, Iraz M, Cigli A, Ilhan A, Akyol O.** The protective effect of erdosteine on short-term global brain ischemia/reperfusion injury in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **2009**;33(1):20-4.
114. **Övey İS.** Homosisteinin Hipokampus Kalsiyum Sinyali, Apoptozis, TRPV1 ve TRPM2 Katyon Kanalları Üzerine Etkileri. Y. Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi. **2013**
115. **Özgül C, Nazıroğlu M.** Nörolojik Hücrelerde TRPM2 Katyon Kanallarının Moleküler Mekanizmalardaki Rollerini; *Journal of Experimental and Clinical Medicine, Derleme* **2010**.
116. **Özcan O, Erdal H, Yönden Z.** İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve Oksidatif Stres İlişkisine Biyokimyasal Bakış. *Mustafa Kemal Üniv Tıp Derg.* **2015**; 6(23): 27-33.
117. **Parks DA, Williams TK, Beckman JS.** Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol.* **1988** ;254:768- 74.
118. **Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC et al.** A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell.* **2002**: 108: 705–715.
119. **Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP, Scharenberg AM.** ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature.* **2001**; 411, 595-599.
120. **Peter O, Rita S, Andras F, Oliver R, David G. ve ark.** Levosimendan: A Cardiovascular Drug to Prevent Liver Ischemia-Reperfusion Injury? *PLoS ONE* **2013**; 8(9) 737-758
121. **Phillip S, Gelman S.** Hepatic Physiology and Pathophysiology. In: Miller RD, Eriksson LI, Fleisher LA (eds), *Miller's Anesthesia* (7th ed). Churchill Livingstone, Philadelphia **2010**, pp.411-40.
122. **Phillips AM, Bull A and Kelly LE.** Identification of a Drosophila Gene Encoding a Calmodulin-Binding Protein with Homology to the Trp Phototransduction Gene, *Neuron*, **1992**, 8: 631-42
123. **Phillis JW, O'Regan MH.** The Role of Phospholipases, Cyclooxygenases, and Lipoxygenases in Cerebral Ischemic/Traumatic Injuries. *Critical Reviews in Neurobiology.* **2003** ; 15(1): 61-90.
124. **Qingqing Z, Hailong F, Hao Z, Fengying X, Zui Z ve ark.** Hydrogen Sulfide Preconditioning Protects Rat Liver against Ischemia/Reperfusion Injury by Activating Akt-GSK-3 β Signaling and Inhibiting Mitochondrial Permeability Transition. *PLoS ONE.* **2013**; 8(9)
125. **Ratych RE, Smith GW.** Anatomy and physiology of the liver. GD Zuidema. (Ed). *Shackelford's Surgery Of The Alimentary Tract.* Fourth ed. Philadelphia: Saunders, **1996**, Vol.3;357-73.
126. **Sağlık A.** Hepatik İskemi Reperfüzyon Hasarı Üzerine N-Asetil Sistein, Flumazenil ve Dexmedetomidin etkilerinin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri **2011**.
127. **Sawaya Jr DE, Zibari GB, Minardi A, Bilton B, Burney D, Granger DN, et al.** P-selectin contributes to the initial recruitment of Rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia/reperfusion. *Shock* **1999**; 12:227-232.
128. **Saygın M, Nazıroğlu M.** TRPM2 Katyon kanallarının aktivasyonunda rol oynayan moleküler mekanizmalardaki son gelişmeler. *Journal of Experimental and Clinical Medicine.* **2010**; 27 : 42-45
129. **Schwartz SI.** Liver. In: Timothy S, Steven AC (eds). *Schwartz's Principles of Surgery.* McGraw-Hill, Philadelphia. **2004**, pp.1139-87.
130. **Seeto RK, Fenn B, Rockey DC.** Ischemic hepatitis: clinical presentation and pathogenesis. *Am J Med* **2000**;109:109-13.
131. **Segmental anatomy of liver** http://ranzcrpart1.wikia.com/wiki/File:Segmental_anatomy_of_liver.jpg
132. **Siemionow M, and Arslan E,** İskemi-reperfusion injury: A review in relation to free tissue transfers, Wiley-Liss, Inc, Microsurgery, **2004**, 24: 468-475.
133. **Skandalakis JE, Skandalakis PN, Skandalakis LJ.** Çeviri: Seven R, Yaltı T, Erbil Y, Değerli Ü. Cerrahi anatomi ve teknik. Karaciğer. 2. baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi **2000** ; 531-72.
134. **Skandalakis JE, Skandalakis PN, Skandalakis LJ.** Çeviri: Seven R, Yaltı T, Erbil Y, Değerli Ü. Cerrahi anatomi ve teknik. Karaciğer. 2. baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, **2000**, 531-72.
135. **Smith CW, Jaeschke H.** Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Journal of Leukocyte Biology* .**1995**; 57:368–374
136. **Sobotta.** Anatomi 7. Türkçe Baskı. Çeviri Ed. Elhan A, Karahan S. T. Urban&Fisher München. Urban Schwarzenberg. **2011**.
137. **Söğüt S.** Sıçan Akciğerinde Bleomisin ile Oluşturulan Fibroziste Oksidan/Antioksidan Sistemin Rolü ve Erdosteinin Fibrozis Üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi. İnönü Üniversitesi, Malatya **2002**.

138. **Summers WK, Jamison RL.** The no reflow phenomenon in renal ischemia. *Lab. Invest.* **1971**; 25: 635-43.
139. **Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D.** Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation* **1993** 55: 1265-1272. doi: 10.1097/00007890-199306000-00011. PubMed: 7685932.
140. **Şehirli Ö, Özel Y, Dulundu E, Topaloglu U, Ercan F ve ark.** Grape seed extract treatment reduces hepatic ischemia-reperfusion Injury in rats. *Phytother. Res.* **2008**, 22: 43-48.
141. **Şener G, Sakarcan A, Yeğen BC.** Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Mol Nutr Food Res* **2007**; 51: 1345-1352.
142. **Şener G, Yeğen, BÇ.** İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelisim.* **2009**, 22 (3) 5-13.
143. **Şentürk H, Canbakan B, Hatemi İ.** Karaciğer enzim yüksekliklerine klinik yaklaşım, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Gastroenteroloji Klinik Yaklaşım Sempozyum Dizisi. **2004**; 38, 9-13, İstanbul.
144. **Takemoto Y, Uchida M, Nagasue N, Ohiwa K, Kimoto T. ve ark.** Changes in calcium content of the liver during hepatic ischemia-reperfusion in dogs, *J. Hepatol.* **1994**;(21):743-747.
145. **Tao X, Sun X, Xu L, Yin L, Han X ve ark.** Total flavonoids from *Rosa laevigata* Michx Fruit Ameliorates Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury through Inhibition of Oxidative Stress and Inflammation in Rats. *Nutrients* **2016**; 8(7): 418.
146. **Thebault S, Lemonnier L, Bidaux G, Flourakis M, Bavencoffe A. ve ark.** Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **2005**; 280: 39423–39435.
147. **Thomas V, Bernd N, Susan H, Annemiete WCM, Guy D. ve ark.** TRPM6 forms the Mg influx channel involved in intestinal and renal Mg absorption. *The journal of biological chemistry.* **2004**;279;19-25
148. **Titti G, Lizzio A, Temrini C, Negri P, Fazio S, Mancini C.** A controlled multicenter pediatric study in the treatment of acute respiratory tract diseases with the aid of a new specific compound, erdosteine. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* **2000**;38(8):402-7.
149. **Tsavalier L, Shapero MH, Morkowski S et al.** *Cancer Res.* **2001**: 61: 3760–3769.
150. **Tullis MJ, Brown S, Gewertz BL.** Hepatic influence on pulmonary neutrophil sequestration following intestinal ischemia-reperfusion. *J Surg Res* **1996**;66:143-6.
151. **Tunc T, Uysal B, Atabek C, Kesik V, Caliskan B ve ark.** Erdosteine and ebselen as useful agents in intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res.* **2009**; 155(2):210-6.
152. **Udassin R, Vromen A, Haskel Y.** The time sequence of injury and recovery following transient reversible intestinal ischemia. *J Surg Res* **1994**; 56: 221-25.
153. **Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **2007**; 39: 44-84.
154. **Van der Bilt JD, Livestro DP, Borren A, van Hillegersberg R, Borel Rinkes IHM.** European survey on the application of vascular clamping in liver surgery. *Dig Surg* **2007**;24:423-35.
155. **Van Eyken P, Desmet VJ.** Cytokreatins and the Liver. *Liver*, **1993**, 13: 113-22.
156. **Van Leeuwen MS, Noordzij J, Fernandez MA, Hennipman A, Feldberg MA, Dillon EH.** Portal venous and segmental anatomy of the right hemiliver: observations based on three-dimensional spiral CT renderings. *AJR Am J Roentgenol.* **1994**, 163, 1395-404.
157. **Vasalli P.** The pathophysiology of tumor necrosis factors : *Ann Review of Immunology* **1992**; 10:411-452
158. **Veal N, Hsieh CL, Xiong S, et al.** Inhibition of lipopolysaccharide stimulated TNF-alpha promoter activity by S-adenosylmethionine and 5'-methylthioadenosine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2004**;287:352– 62.
159. **Voets T, Owsianik G, Nilius B.** TRPM8. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2007**;179, 329–344.
160. **Wang, M. et al.** Remote ischemic preconditioning promotes early liver cell proliferation in a rat model of small-for-size liver transplantation. *Journal of Surgical Research*, **2012**.
161. **Wanner GA, Ertel W, Muller P, Hofer Y, Leiderer R, Menger MD et al.** Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock* **1996**; 5: 34–40.
162. **Warle MC, Metselaar HJ, Hop WCJ, et al.** Early differentiation between rejection and infection in liver transplant patients by serum and biliary cytokine patterns. *Transplantation* **2003**;76:146-51.
163. **Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H.** TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacol Therapeut.* **2008**; 118, 337-351.

164. **Watanabe M, Yamaguchi K, Chijiwa K, Tonaka M.** Improves survival and pulmonary injury after partial hepatectomy under ischemia/reperfusion, *Journal of Surgical Research*. FR167653 **2001**; 101, 146-151.
165. **Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jüngling E, Zitt C, Lückhoff A.** Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem*. **2002**; 277(26):23150-6.
166. **Weitzberg E, Hezel M, Lunderg JO.** Nitrate-nitrite-nitric oxide pathway: Implications for anesthesiology and intensive care. *Anesthesiology*. **2010**;113:1460–75.
167. **Wilhelm J.** Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* **1990**, 137: 1-53.
168. **Wu R, Zhou M, Wang P.** Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein–1 downregulate TNF- α in macrophage cell line and rat Kupffer cells. *Regulatory Peptides* **2003**;112:19–26.
169. **Yadav SS, Howell DN, Steeber DA, Harland RC, Tedder TF, Clavien PA.** P-selectin mediates reperfusion injury through neutrophil and platelet sequestration in the warm ischemic Mouse liver. *Hepatology* **1999**; 29:1494-1502.
170. **Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, Takahashi N, Wajima T ve ark.** TRPM2-mediated Ca²⁺ influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat Med*. **2008** ; 14, 738–747.
171. **Yamamura H, Ugawa S, Ueda T et al.** *Am J Physiol Cell Physiol*. **2008**: 295: 296–301.
172. **Yao JK, Reddy R, McElhinny LG.** Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. *Schizophr Res*. **1998**; 32: 1-
173. **Yesildag A, Ozden A, Yilmaz HR, Uz E, Ağackiran Y ve ark.** Erdosteine modulates radiocontrast-induced hepatotoxicity in rat. *Cell Biochem Funct*. **2009**;27(3):142-147
174. **Yılmaz S.** Nonalkolik Steatohepatit’li Ratlarda Metformin, Rosiglitazon, N-Asetilsistein ve Etodolak’ın Tedavi Edici Etkilerinin Değerlendirilmesi. *Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi*, **2010**.
175. **Yiming L, Tao L, Haizhi Q, Fang Y.** Minocycline protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in a rat model. *BIOMEDICAL REPORTS* **2015**; (3): 19-24
176. **Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y.** Which gender is beter positioned in the process of liver surgery? Male or female? *Surg Today* **2007**;37:823-30.
177. **Zhan HQ, Li PF, Li SY, Yan FL, Yang J ve ark.** Influence of lactuside B on the expression of AQP4 and TRPM7 mRNAs in the cerebral cortex after cerebral ischemia injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. **2014**;18(8):1151-7.
178. **Zhang W, Chu X, Tong Q, Cheung JY, Conrad K, Masker K. & Miller BA.** A novel TRPM2 isoform inhibits calcium influx and susceptibility to cell death. *J. Biol. Chem*. **2003**, 278: 16222 – 16229.
179. **Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D.** Increased expression of bioactive chemokines in human cerebrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol* **1999**; 101:148-160.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Malatya’da doğdu. 2006 yılında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2010 yılında mezun oldu. 2012 yılında İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2013 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fizyoloji Anabilim Dalı’nda açılan sınavı kazanarak araştırma görevlisi olarak atandı ve hala Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fizyoloji Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak görevine devam etmektedir.

