

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



**SIÇANLARDA KARACİĞER İSKEMİ REPERFÜZYON
MODELİNDE TİMOKİNONUN TRPM KANALLARI ÜZERİNE
ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kerem ÇAĞLAR

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Recep DOKUYUCU

HATAY-2016

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

**SIÇANLARDA KARACİĞER İSKEMİ REPERFÜZYON
MODELİNDE TİMOKİNONUN TRPM KANALLARI ÜZERİNE
ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kerem ÇAĞLAR

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Recep DOKUYUCU

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 12366
nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY-2016

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

**SIÇANLARDA KARACİĞER İSKEMİ REPERFÜZYON
MODELİNDE TİMOKİNONUN TRPM KANALLARI ÜZERİNE
ETKİSİ**

Yüksek Lisans Tezi

Kerem ÇAĞLAR

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 14/01/ 2016 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oyçokluğu/oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri başkanı: Prof.Dr. Cemil TÜMER.....

Üye: Doç. Dr. Beyhan CENGİZ

Üye: Yrd. Doç. Dr. Fatih Recep DOKUYUCU

Bu tez, EnstitümüzAnabilim Dalında hazırlanmıştır.

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR YAZISI

Tez konumun belirlenmesi ve tez çalışmamın baştan sona tüm aşamalarındabilgi, destek ve hoşgörülerini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Recep DOKUYUCU'ya sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve birikimlerini paylaşıp, hertürlü desteği veren Sayın Prof. Dr. Cemil TMER'e ve Sayın Doç. Dr. Fatih SEFİL'e teŐekkürü bir borç bilirim.

Tezimin deney çalışmaları sırasında birlikte çalıştığım, yardımlarını her zaman yanımda hissettiğim bölüm arkadaşlarım Arş. Gör. Okan TUTUK, Arş. Gör. Hatice DOğAN ve Arş. Gör. Gökhan AğTRK'e yardımları için teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca vermiş oldukları desteklerden ötürü değerli aileme ve kıymetli eşim Hilal AğLAR'a Őükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Karaciğerin Fizyolojisi	2
2.2. İskemi Reperfüzyon Hasarı	2
2.2.1. İskemi	2
2.2.2. Reperfüzyon	3
2.2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarı	4
2.2.4. İskemik Reperfüzyon Hasarına Sebep Olan Etmenler	5
2.3. Karaciğerde İskemi Reperfüzyon Hasarı	5
2.4. Karaciğerde İskemi Reperfüzyon Hasarı Patofizyolojisi	7
2.4.1. Hüresel Mekanizmalar	7
2.4.2. Humoral Mekanizmalar	8
2.4.3. Serbest Oksijen ve Nitrojen radikalleri	9
2.5. Timokinon	14
2.6. TRP Gen Ailesi	14
2.6.1. TRPM Kanalları	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM	16
3.1. Deney Grupları	16
3.2. Deneysel Çalışma Modeli	17
3.3. Histopatolojik Analizler	22
3.4. Biyokimyasal Analizler	23
3.5. TRPM Gen İfadelerinin Analizleri	23
3.5.1. RNA İzolasyonu	24

3.5.2. CDNA Sentezi	25
3.5.3. Kantitatif Real Time PCR	26
3.6. İstatiksel Analizler	26
4. BULGULAR	27
4.1. Biyokimyasal Sonuçlar	27
4.1.1. Karaciğer Fonksiyon Testleri	27
4.1.2. Plazma TNF- α ve İL-6 Düzeyleri	28
4.1.3. Böbrek Fonksiyon Testleri	30
4.1.4. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi	31
4.2. Histopatoloji Sonuçları	32
4.3. Gen Sonuçları	35
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇ	41
7. KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. TRP Kanalının hücre membranındaki yapısı	15
Şekil 3.1. Wistar Albino cinsi sıçanlar	16
Şekil 3.2. Anestezi Maddeleri	18
Şekil 3.3. Pavidon iyod ile cilt antisepsisi	18
Şekil 3.4. Laparotomi	19
Şekil 3.5. Karaciğer sol ve median lobuna giden hepatik arter ve portal venin askıya alınması	19
Şekil 3.6. Portal ven ve hepatik arterin oklüzyonu	20
Şekil 3.7. İskemi sonrası cerrahi işlemi	20
Şekil 3.8. İskemi sonrası cerrahinin sonlandırması	21
Şekil 3.9. Normal karaciğer dokusu	21
Şekil 3.10. Karaciğerde oluşan iskemik alan	22
Şekil 3.11. Karaciğerde oluşan reperfüzyon sonrası görünüm	22
Şekil 3.12. % 10'luk formal solüsyon örnekleri.	23
Şekil 4.1. Gruplar arası plazma TNF- α düzeylerine ilişkin parametrelerinin karşılaştırılması	29
Şekil 4.2. Gruplar arası plazma İL-6 düzeylerine ilişkin parametrelerinin karşılaştırılması	30
Şekil 4.3. Gruplar arası oksidatif stress indeksinin karşılaştırılması	32
Şekil 4.4. Sıçan karaciğerlerinin histopatolojik görünümü	34
Şekil 4.5. Gruplar arası TRPM2 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması	36
Şekil 4.6. Gruplar arası TRPM6 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması	36
Şekil 4.7. Gruplar arası TRPM7 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması	37
Şekil 4.8. Gruplar arası TRPM8 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelgeler 3.1. Deney grupları	17
Çizelgeler 4.1. Gruplar arası karaciğer fonksiyon test parametrelerinin karşılaştırılması	28
Çizelgeler 4.2. Gruplar arası plazma TNF- α , İL-6 düzeylerine ilişkin parametrelerin karşılaştırılması	29
Çizelgeler 4.3. Gruplar arası böbrek fonksiyon test parametrelerinin karşılaştırılması	31
Çizelgeler 4.4. Gruplar arası oksidatif stres parametrelerinin	31
Çizelgeler 4.5. Gruplar arası histopatolojik parametrelerin karşılaştırılması	33
Çizelgeler 4.6. Gruplar arası gen normalizasyon değerleri	35

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

- ALT:** Alanin Aminotransferaz
AMP: Adenozin Monofosfat
AST: Aminotransferaz
ATP: Adenozin Trifostfat
CAT: Katalaz
GGT: Gama Glutamil Transferaz
GST: Glutasyon Transferaz
GPx: Glutasyon Peroksidaz
H²O²: Hidrojen Peroksit
İ/R: İskemi/Reperfüzyon
İL-6: İnterleukin 6
KDH: Ksantin Dehidrojenaz
KO: Ksantin Oksidaz
LDH: Laktat Dehidrogenaz
NO: Nitrik Oksit
NOS: Nitrik Oksit Sentetaz
O²: Süperoksit
OH: Hidroksil Radikali
ONOO: Peroksinitrit
OSI: Oksidatif Stres İndeksi
PNL: Polimorf Nüveli Lokositler
RNS: Reaktif Nitrojen Türleri
ROS:Reaktif Oksijen Türleri
SEC: Sünosoidal Endotel Hücreler
SOD: Süperoksit Dismutaz
SOR: Serbest Oksijen Radikali
TAS: Total Antioksidan Seviye
TMQ: Timokinon
TNF- α : Tümör Nekrotizan Faktör Alfa
TOS: Total Oksidan Seviye
TPRM: Transient Receptor Potential Melastatin

ÖZET

Sıçanlarda Karaciğer İskemi Reperfüzyon Modelinde Timokinonun TRPM Kanalları Üzerine Etkisi

İskemi/Reperfüzyon (İ/R) hasarı, cerrahi ve klinik olarak önemli bir sorundur. İ/R'ye maruz kalmış hücrede Ca^{+2} konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir. *TRPM* kanalları hücre içinde Ca^{+2} miktarının belirlenmesinde rol alan yapılardan biridir. Ca^{+2} konsantrasyonunun hücre içi anormal artışı, mekanizması tam olarak açıklanamayan bir şekilde sitotoksik etkiye neden olur.

Nigella Sativa'dan izole edilen timokinon (Tmq) özellikle antioksidan, antikanserojenik, antiinflamatuvar gibi pek çok yararlı etkilere sahiptir.

Sıçanlarda Karaciğerde İ/R modeli oluşturularak Tmq'un karaciğerdeki antioksidan ve histopatolojik etkilerini göstermeyi amaçladık. Ayrıca Tmq'nun iskemik karaciğer dokularındaki *TRPM* genleri ekspresyon seviyelerine etkisini araştırmayı planladık.

Çalışma Wistar Albino cinsi 50 sıçan üzerinde 5 grup oluşturularak planlandı. 1. Grup: Kontrol; 2. Grup: Yalancı Cerrahi; 3. Grup: Karaciğer İ/R (45 dk/45 dk); 4. Grup: Tmq (50 mg/kg); 5. Grup: Tmq+İ/R (İ/R öncesi 10 gün oral gavajla 50 mg/kg Tmq) olarak belirlendi. İ/R gruplarında Portal ven ve Hepatik arter eksplore edilerek atravmatik vasküler klemp ile karaciğer İ/R (45min/45min) modeli uygulandı. Çalışma sonunda alınan karaciğer dokuları biyokimyasal ve histopatolojik analizler için değerlendirildi ve karaciğer dokularında *TRPM* geni ekspresyon düzeyleri belirlendi.

Histopatolojik değerlendirmede İ/R grubuyla karşılaştırıldığında Tmq ve Tmq+İ/R gruplarında hücresel şişme, konjesyon, PNL ve apoptoz değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü. Biyokimyasal parametrelerden AST, ALT, GGT, LDH, kreatinin ve üre seviyelerinde kontrol, yalancı cerrahi, Tmq ve Tmq+İ/R gruplarıyla karşılaştırıldığında İ/R grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı. İ/R grubuyla karşılaştırıldığında Tmq+İ/R grubunda *TRPM*_{2,6,7,8} ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı saptandı.

Karaciğerde İ/R'ye neden olan hastalıklarda tedavide Tmq'un verilmesi hem iskemi ve apoptozis hem de karaciğerle ilişkili hastalıkların tedavisinde kullanıma girmesi açısından önem arz etmekte olup sonuçlarımızın klinik çalışmalarla doğrulanmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca çalışmamızda timokinonun *TRPM*_{2,6,7,8} gen ekspresyon seviyesini azaltarak, Ca^{+2} 'nın hücre içine girişini engelleme yönünde etki ettiğini gösterdik. Bu durum timokinon'un İ/R'ye bağlı hücresel hasarı azaltıcı yönde etki ettiği düşüncesini akla getirmektedir.

Anahtar Kelimeler: İskemi, Reperfüzyon, Karaciğer, Timokinon, *TRPM*

ABSTRACT

Effect of Thymoquinone on TRPM Channels in Rats with Liver Ischemia Reperfusion Model

Ischemia/Reperfusion (I/R) injury is surgery and clinically important problem. It was showed that Ca^{+2} concentration increases into cell with I/R injury. *TRPM* channels have a role in determining the amount of Ca^{+2} concentration into cell.

Thymoquinone (Tmq) which was isolated from *Nigella Sativa*, particularly has the beneficial effects such as antioxidant, anticancerogenic, antiinflamatur.

We aimed to investigate the antioxidant and histopathologic effect of thymoquinone in Hepatic I/R rat model. In addition the other purpose of the our study was determination effects of thymoquinone on levels of *TRPM* gene expression.

Fifty Wistar rats were divided into 5 groups. Group 1: Control; Group 2: Shame; Group 3: Hepatic I/R (45min/45min); Group 4: Tmq (50 mg/kg); Group 5: Tmq+I/R (ten days before from I/R at dose 50 mg/kg of Tmq by oral gavage.) Hepatic I/R (45min/45min) model was performed at the portal vein and the hepatic artery with atraumatic vascular a clamp in ischemia groups. The liver tissues and blood samples which were taken at the end of study were evaluated for histopathologic and biochemical analysis. Besides *TRPM* gene expression levels were determined in liver tissues.

It was seen that cellular swelling, congestion, PNL and apoptosis parameters statistically decreased in Tmq and Tmq+I/R groups in comparison with I/R group in histopathological evaluation. It was observed that biochemical parameters, AST, ALT, GGT, LDH, creatinine and urea levels significantly increased in I/R group as compared with, shame, Tmq and Tmq + I/R groups. It was found that *TRPM2,6,7,8* gene expression decreased significantly in Tmq + I/R groups as compared to I/R group.

Based on our findings it was observed that application of Tmq in the treatment of liver diseases associated with I/R injury is important in terms of both ischemia and apoptosis and also using in the treatment of liver-related diseases. Therefore results of our study need to be confirmed with clinical studies. Additionally we showed that thymoquinone may inhibit Ca^{+2} entry into the cell by reducing *TRPM2,6,7,8* gene expression. In conclusion this situation is brought to mind that cell injury related with I/R is reduced by Tmq.

Key Words: Ischemia, Reperfusion, Liver, Thymoquinone, *TRPM*

1. GİRİŞ

İskemi Reperfüzyon (İ/R) hasarı, hipovolemik şok, kronik karaciğer hastalıkları, büyük tümör rezeksiyonları, hepatik travmaya cerrahi müdahale, vasküler rekonstrüksiyonlar ve hepatik transplantasyon sırasında veya sonrasında sık karşılaşılan bir durumdur. İskemi, klinik tıpta hücre zedelenmesinin en sık görülen tipidir. Dolayısıyla, beyin, kalp, böbrekler ve karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda ve organda hayatı tehdit eden problemlere neden olur.

Özellikle hepatik iskemi modellerinde, ortaya çıkan iskemik karaciğer hasarı ve sonrasında oluşan reperfüzyon hasarının minimize edilmesi için, birçok çalışma yapılmış ve birçok ajan kullanılmıştır. Fakat karaciğer iskemi reperfüzyon hasarının hala aydınlatılmamış olması nedeniyle, klinikte karaciğer İ/R ile ilişkili hastalıkların patofizyolojisinin anlaşılması ve bu hastalıklar için değişik tedavi modalitelerinin ortaya konulması önemlidir.

TRPM kanallarının iskemide ve apoptoziste aldığı önemli rolü de göz önünde bulundurursak, sunulan çalışmayla; hem *TRPM* kanal ekspresyonlarının Timokinon (Tmq) ile olan ilişkisi, hem de Tmq'un iskemi, apoptozis ve karaciğerle ilişkili hastalıkların tanı ve tedavisindeki potansiyelinin değerlendirilmesine katkı sağlaması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğerin Fizyolojisi

Karaciğer, vücutta homeostazisi ilgilendiren önemli görevleri yerine getirir. Karaciğerin fonksiyonları vasküler rezervuar, filtre, metabolik, detoksifikasyon ve sekretuar işlevleri olmak üzere 5 grup olarak incelenebilir.

Vasküler rezervuar işlevi: Normalde hepatik venler ve sinüsler içindeki 450 ml'lik kan rezervuarına gerektiğinde ayrıca 500-1000 ml kan daha dahil edilebilir. Bu durum karaciğerin genişleyebilen bir organ olması ile ilişkilidir (Guyton ve Hall 1996).

Filtre işlevi: İnce bağırsaklardan veya vücudun başka bir yerinden gelen bakteri ve diğer partiküller hepatik venöz sinüslerde yer alan fagositik makrofajlar olan Kupffer hücreleri ile temizlenmiş olur (Guyton ve Hall 1996).

Metabolik işlevi: Karbonhidrat, protein ve lipit metabolizmalarında karaciğer merkezi vazifeler üstlenir. Bunula birlikte glikojen, demir ve bakır, A, D ve B12 vitaminleri karaciğerde depolanır (Guyton ve Hall 1996).

Detoksifikasyon işlevi: Karaciğer vücuttaki hormon veya minerallerin fazlasının detoksifikasyon veya biyotransformasyon tepkimeleri ile organizma için zararlı veya artık maddeleri etkisizleştirerek atılımını sağlar (Guyton ve Hall 1996).

Sekretuar işlevi: Karaciğerin gastrointestinal sisteme en önemli katkısı safranin salgılanması ve sindirim sistemine taşınmasıdır (Guyton ve Hall 1996).

2.2. İskemi Reperfüzyon Hasarı

2.2.1. İskemi

İskemi arteriyal veya venöz kanın mahrumiyeti yani oksijen ve besin maddelerinin organ ve dokulara istenilen miktarlarda ulaşmaması ve neticesinde meydana gelen atık maddelerin uzaklaştırılmaması olarak tanımlanır (Majino ve Jorris 1995). İskemi sonucu oluşan hasarın boyutu, oksijensizliğin derinliği ve süresi ile ilişkili olup hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi nekroz oluşumuna yol açmaktadır (Orrenius ve ark. 1992). Doku ve organizma aracılığıyla kısa iskemik dönemlerde oluşabilecek hasarlar giderilirken, iskemik dönemin uzamış olduğu durumlarda nekroza varan tahribatlar meydana gelir (Murry ve ark. 1986). Farmakolojik ajanların, iskemik ön

koşullama ile birlikte iskemi öncesi, esnasında ve sonrasında verildiği takdirde iskemi sonucu doku hasarını azalttığı incelenmiştir (Zimmerman ve ark. 1992). İskemi ile birlikte doku ve organlara giden kanın durması hücrel oksidatif fosforilasyonun azalmasına ve adenozin 5'- trifosfat ve fosfokreatin gibi enerji seviyesi yüksek fosfat üretiminin azalmasına sebep olur (Jennings ve Reimer 1991). Na^+ - K^+ ATPaz pompası hücrel enerji depolarının tükenmesiyle inhibe olur. Netice itibariyle intrasellüler Na^+ , Ca^{+2} iyon konsantrasyonu yükselir (Parks ve ark. 1988). İnasellüler Ca^{+2} iyon konsantrasyonunun yükselişi hücre için sitotoksiktir (Weight ve ark. 1996). Aynı şekilde hücredeki iyon konsantrasyonunun farklılaşmasıyla proinflamatuvar sitokinlerin lökosit adhezyon moleküllerinin üretiminde artış, beraberinde antioksidan enzimlerin üretiminde azalma meydana gelir. Oluşan bu tablo hücreyi reperfüzyon sürecindeki hasara karşı dayanaksız hale getirir. İskemi sürecinde enerji eksikliği sebebiyle gelişen olayların bir diğer neticesi adenozin trifosfat (ATP) yıkım ürünlerinin birikmesidir. ATP'den adenozin monofosfat (AMP) ve adenozin meydana gelir. Ekstrasellüler hızlı bir şekilde difüze olan adenozin bu şekilde inozin ve hipoksantine parçalanır. Bu durum hücrede pürin metabolitlerin birikimine ve ksantin dehidrojenazın (KDH), ksantin oksidaza (KO) transformasyonuna sebep olur. Normalde ürik asite metabolize olan hipoksantindir ve gelişen reaksiyonda NAD^+ elektron alıcısıdır. Fakat iskemi veya hipoksi sebebiyle $\text{KDH} \rightarrow \text{KO}$ 'a dönüştüğünden hipoksantin ürik asite dönüşümünü KO tarafından sağlanır ve bu tepkimede ise elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanılır (Parks ve ark. 1988).

2.2.2. Reperfüzyon

Reperfüzyon, dolaşımın yeniden sağlanması, yani oksijen ve besin maddelerinin istenen seviyelerde organ ve dokulara tekrar sağlanmasıdır. Bu durumun iskemik alanda kalıcı hasarlar oluşturması muhtemeldir. Eğer hücrede kalıcı hasar oluşmadıysa, hücrel homeostazis ve enerji depoları geri kazanılmış olur (Charles ve ark. 2001). Reperfüzyon fazında meydana gelen hasarlarda, birçok mekanizma görev almaktadır. Serbest oksijen radikal türevleri (SOR)'nin hücre içine oksijen sağlanması ile kısa zamanda oluşması önemli bir mekanizmadır (Phillips ve ark. 2009). Yeniden dolaşımın sağlandığı doku ve organlarda, reperfüzyonun etki ettiği hücreler, daha iyonik olarak normal seviyeye dönememişken, yoğunluğu yüksek kalsiyum ile karşılaşmaları membran bütünlüğünü bozacaktır. Bu durum hücrede membran hasarıyla birlikte mitokondriyel permeabilitenin

fazlaca artmasına yol açan oksijen kaynaklı reaktif türevlerin salınımıyla SOR'un ortaya çıkmasına neden olur (Valko ve ark. 2007). Öte yandan toksik maddelerin artışı sürerken, antioksidan mekanizma ile bu maddelerin uzaklaştırılmasında görev alan ajanların olumsuz etkilenmesi, hücrenin oluşacak hasar karşısında kendini savunamaz hale gelmesine sebep olur (Valko ve ark. 2007). Klinik uygulamalarda, birçok dalda iskemi ve reperfüzyon tablosunun olduğu sepsis, yanık, şok gibi vakalar yer almaktadır. Bu vakalar sonrası oluşan hipovolemi ile iskemi hasarı oluşurken reperfüzyon hasarı ise yeniden canlanma ile meydana gelmektedir. İ/R hasarı, hipovolemik şok, kronik karaciğer hastalıkları, büyük tümör rezeksiyonları, hepatik travmaya cerrahi müdahale, vasküler rekonstrüksiyonlar ve hepatik transplantasyon gibi durumlarda sık karşılaşılan bir durumdur. Genel anlamda yapılan cerrahi işlemlerin tamamı esnasında doku ve organların iskemisi ve beraberinde bir reperfüzyon süreci vardır (Bozkurt 2009).

2.2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarı

İskemi reperfüzyon hasarı, hücrelerin bir kısmını geri dönüşümsüz olarak nekroza uğrattırırken, bazı hücrelerin yaşayabilme olanakları vardır. İskemi süresince mevcut durumu itibariyle yaşayabilen hücreler, reperfüzyon fazında normal fonksiyonlarını yeniden elde edebilirler veya nekroza uğrayarak hücre dışına atılırlar. İstenilene en yakın reperfüzyon şartlarında iskemiye maruz kalan bütün hücrelerin yeniden normale dönme oranı azdır. Bununla birlikte, İ/R hasarından sonra normale dönen kimi hücrelerin uzun bir süre sonra nekroza uğradığını bildiren çalışmalar vardır (Özkaya ve Koçdor 2008). Plazma içerisinde iskemi reperfüzyon hasarına bağlı araşidonik asit türevleri, sitokin, kompleman, ve trombosit aktive edici faktör benzeri proenflamatuar ajanlar artış göstermektedir (Bless ve ark. 1999). Reperfüzyon sırasında, dokusal oksijenasyon ile birlikte meydana gelen oksijen radikalleri İ/R hasarının asıl sebebidir (Prem ve ark. 1999). Netice itibariyle oluşan süperoksit, hidroksil radikali, ksantin ve hidrojen peroksit gibi toksik serbest oksijen radikalleri (SOR), yağ asit radikalleri ile lipit peroksidasyon reaksiyonunu meydana getirirler ve bu durum hücre hasarına sebep olur (Nelson ve ark. 1991). Serbest oksijen radikallerinin meydana gelmesine bağlı olarak reperfüzyona maruz kalan dokuda nekrotik farklılıklar oluşabilir (Cetinkale ve ark. 1998).

2.2.4. İskemik Reperfüzyon Hasarına Sebep Olan Etkenler

İ/R hasarının fizyopatolojisi hakkında birçok etken üzerinde durulmuştur. Bunlar hücresel, humoral ve birbiriyle ilişkileri karmaşık olaylar dizisidir (Şener ve Yegen 2010). Başlıca etkenler şunlardır:

- 1- Serbest Oksijen Radikalleri
- 2- Polimorf Nuveli Lokositler ve Adezyon Molekülleri
- 3- Kompleman Sistemi ve Sitokinler
- 4- Endotel Hücreleri

2.3. Karaciğerde İskemi Reperfüzyon Hasarı

İ/R hasarı, arteriyel veya venöz kanın eksikliği sebebiyle uzamış iskemi tablosu organ ve dokularda, dolaşımın tekrar sağlanması ile oluşur. Bu durum en fazla mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu enerji kaynağı olarak kullanan, oksijene karşı duyarlı aerobik hücrelere etki eder. Bu sebeple aerobik metabolizmayı kullanan organ ve dokularda İ/R hasarının meydana gelme olasılığı daha yüksektir (De ve Rauen 2007). Dolaşımdan yoksun kalınan iskemik dönemde apoptozise kadar varan değişiklikler oluşabilir. Kalp, beyin, karaciğer ve böbrek gibi birçok organ ve doku potansiyel olarak bu hasara maruz kalmaktadır. Çok rastlanılan büyük karaciğer rezeksiyonu, hemorajik şok, abdominal travma cerrahisi ve karaciğer nakli gibi klinik tablolarda, hepatik İ/R hasarı mortalite ve morbiditeye yol açan çok önemli bir komplikasyondur (Mandrekar ve Szabo 2011). Yapılan çalışmalarla cerrahi müdahale için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Dr. James Hogarth Pringle, abdominal cerrahi esnasında ve karaciğer travması ile alakalı kanamada hemostaz sağlayabilmek adına “Pringle manevrası” diye adlandırılan hepatik arter ve portal veni klemleyerek kan akımını durduran tekniği geliştirmiştir. Bu şekilde karaciğer cerrahisi esnasında, acil veya planlı cerrahi prosedür tatbik edilir ardından portal triad klemlenir. Bu şekilde kanama kontrolü sağlanır ardından klempin kaldırılmasıyla dolaşım yeniden sağlanır. Uzamış iskemi ve sonrasında reperfüzyon ile birlikte karaciğer İ/R hasarı oluşur (De ve Rauen 2007, Kim 2003). İ/R hasarının önemli bir mortalite ve morbidite sebebi olması yöntemin kullanılabilirliğini sınırlamış olsada, cerrahi sahada yaşanan değişiklikler ile büyük karaciğer rezeksiyonları, karaciğer nakli, müdahale edilmediği zaman ölümle sonuçlanabilen masif hepatik kanamalara müdahale gibi komplike işlemlerde cerrahlar bu tekniği çoğunlukla kullanmaktadırlar (Mandrekar ve

Szabo 2011). Karaciğer transplantasyon durumunda ise, vericiden alınan karaciğer dokusunun muhafazası safhasında soğuk İ/R, alıcıya nakledilmesi esnasında ve sonrasında ise sıcak İ/R hasarı görülür (Kupiec-Weglinski ve Busuttil 2005). Karaciğerde İ/R hasarının tek sebebi intraoperatif kanama kontrolü amacıyla yapılan pringle manevrası değildir. Hipoksi, sepsis, travma, sistemik kan basıncının düşmesi, konjestif kalp yetmezliği ve solunum yetmezliği de İ/R hasarının oluşmasına neden olabilir (Rushing ve Britt 2008, Birrer ve ark. 2007).

Cerrahi esnasında karaciğerin oksijensiz ve aynı zamanda besinsiz kalabilme süresi iskemi süresini belirler. Oksidatif stres ve reperfüzyon hasarının inflamatuvar komponentleri, uzun süren karaciğer iskemi sonrasında oluşur ve hepatosellüler hasara sebep olur. Yaralanmanın mortalite, morbidite ve klinik etkileri hakkında tahmin yürütülebilmesi için, karaciğerin metabolik işlevi gözönünde bulundurulması gerekmektedir. Bu sebeple çalışmalar büyük oranda hepatik İ/R hasarının, moleküler ve hücresel yolları daha iyi anlayabilmek için yapılmıştır (Mandrekar ve Szabo 2011). Konu üzerinde yoğunlaşan çalışmalar, işleyişi anlamaya ve hasarı minimize edebilmeye ya da tamamen ortadan kaldırmaya yönelik çözümler üretmeyi amaçlamıştır. Çalışmalar sonucunda elde edilen bilgiler, karaciğer cerrahisi esnasında oluşturulan iskemi modelinin yöntemi ve süresinin, İ/R hasarının şiddetiyle doğrudan ilgili olduğu yönündedir. Bir diğer durum ise özellikle kronik karaciğer hastalıklarındaki hasarı açıklamak ve önlem almak için önemli olan, iskeminin kısa ve intermittant uygulanmasının sürekli uygulanmasına kıyasla daha az karaciğer disfonksiyonuna sebep olmasıdır (Hasegawa ve ark. 2007). İ/R hasarına dayanabilme eşiği, karaciğer parankiminin evvelki tablosuyla da alakalıdır. İskemi reperfüzyon hasarında karaciğerin hassasiyetini belirleyen etkenler yaş ve cinsiyettir. Yaşlı karaciğerler genç karaciğerlere kıyasla daha duyarlı olduğu gibi; özellikle hayvan modellerinde erkek cinsin iskemiye karşı daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Kronik hastalığı var olan karaciğer, normal karaciğere kıyas edildiğinde iskemi reperfüzyon hasarına karşı daha hassastır (Jang ve ark. 2008, Yokoyama ve ark. 2007). Karaciğer İ/R hasarının klinik açıdan ehemmiyeti yalnızca hasarın ilerlemesi ile beraber belirlenebilen karaciğer fonksiyon bozukluğu ve ilerleyici karaciğer yetmezliği değildir. Splanknik dolaşımın merkezinde olması, biyokimyasal ve fizyolojik işlevlerinin hayati önemi sebebiyle, karaciğerde oluşan İ/R hasarı akciğer, kalp, böbrekler ve kan hücrelerinde uzak organ disfonksiyonuna sebep olabilir. Karaciğer transplantasyonu esnasındaki İ/R hasarı,

primer greftin işlevini yitirmesine, primer greft disfonksiyonuna ve safra striktürlerine yol açabilir (Weinbroum ve ark. 2001, Pine ve ark. 2009, Hirsch ve ark. 2008).

2.4. Karaciğerde İskemi Reperfüzyon Hasarı Patofizyolojisi

Karaciğer İ/R hasarı ile beraber bazı hücre tiplerini ve moleküler mediatörlerini ilgilendiren kompleks inflamatuvar süreç başlar. İskemik dönemde, kan akımının kesilmesi ya da azalması ile birlikte oksidatif fosforilasyon azalır. ATP ve fosfokreatin gibi hücrenin bütün organellerinin enerji kaynağı olarak kullandığı yüksek enerjili fosfatların sentezi azalır, anaerobik metabolitler hücrede birikir. Hücre membranındaki ATP bağımlı Na^+/K^+ ve Ca^{+2} pompalarının çalışmamasına bağlı hücre içi serbest Ca^{+2} , K^+ , Na^+ artışı, fosfolipaz aktivasyonu, hücre membran hasarı, mitokondrial disfonksiyon ve iskemik sürecin uzamasıyla birlikte lizozomal enzim aktivasyonu ve sonuçta apoptozis ile birlikte hücre ölümü meydana gelir (Mandrekar ve Szabo 2011). Karaciğerde iskemik hasardan sonra meydana gelen reperfüzyon hasarı akut ve subakut faz olmak üzere bifazik patern gösterir. Akut faz, reperfüzyon sonrası 3- 6 saatlerde serbest radikal oluşumu, T-lenfosit ve Kupffer hücre aktivasyonu, sinüzoidal konjesyon, hepatositlerde sitoplazmik vakuolizasyon ile karakterize hepatoselüler hasar ile ilişkilidir. Subakut faz ise 18-24. saatler arasındadır ve masif nötrofil infiltrasyonu sonrasında geniş nekrozla kendini gösteren geri dönüşümsüz hasar oluşur (Farmer ve ark. 2000, Fondevila ve ark. 2003). Bu nedenle tedavi edici girişimlerde, nötrofil aracılı inflamasyon, doku nekrozu, organ disfonksiyonunu önlemek amacıyla, iskemi reperfüzyon hasarının moleküler ve hücresel basamağında erken dönemler yani akut faz hedef alınmalıdır (Fondevila ve ark. 2003). Hücresel hasar iskemik süreçte başlar, reperfüzyonla birlikte artarak devam eder, sonuçta nekroz ve apoptozis ile birlikte hücreyi ölüme götürür. Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı inflamatuvar bir süreçtir ve buna aracılık eden hücresel mekanizmalar, moleküler mediatörler, reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri mevcuttur (Kim 2003).

2.4.1. Hücresel Mekanizmalar

İskemi aşamasında; Oksijen kaynağının kesilmesi ve glikojen tüketimi sonucu kupffer hücreleri, sinüzoidal endotel hücreler (SEC) ve hepatositlerde ATP üretim eksikliği meydana gelir. Bunun sonucunda ATP bağımlı Na^+/K^+ plazma membran pompası çalışamaz ve hücre içi Na^+ birikimini hücresel ödem ve şişlik takip eder. Kupffer hücreleri

ve SEC'deki şişlik, endotelin ve tromboksan A2 gibi vazokonstrüktörlerdeki artış ve nitrik oksit gibi vazodilatörlerde azalma ile birlikte. Bu değişiklikler sonucunda sinüzoidler daralır (Selzner ve ark. 2007, Phillips ve ark. 2009). İskemi sonrasında, reperfüzyon ile birlikte daralmış olan sinüzoidlerde nötrofil ve trombosit agregasyonu artar ve kan akımı başlamasına rağmen mikrosirkülasyon kan akımı bozulur, hatta bazı alanlarda "no-reflow" meydana gelir, kan akışı olmaz (Montalvo ve ark. 2008).

2.4.2. Humoral Mekanizmalar

Karaciğer İ/R hasarında etkili humoral faktörler iki ana gruptan oluşur. Bunlar; Komplemanlar ve Sitokinlerdir.

Komplemanlar:

Kompleman sistemi, membrana bağlı ve çözünür durumda bulunan proteinlerden oluşur. Kompleman sisteminin üç farklı yolla aktive olduğu bilinmektedir. Bunlar; klasik, alternatif ve mannoz-bağlayıcı lektin yollarıdır. Her 3 yol da karaciğerde İ/R hasarında aktive olur (Arumungam ve ark. 2004).

Sitokinler:

Sitokinler, insan vücudunda değişik hücreler tarafından sentezlenen, multi fonksiyonel polipeptidlerdir. Hastalıkların fizyopatolojisinde etkili ve terapötik potansiyele sahip olan bir protein grubudur. İmmün sistem hücreleri arasındaki ilişkileri kontrol ederek, inflamatuvar cevapları destekleyerek ve hematopoez olayını düzenleyerek birçok fizyolojik cevapta önemli rol oynarlar (Abu-Amara ve ark. 2010). Sitokinlerin tanımlanması ve karakterize edilmesi çeşitli isimlendirme ve sınıflandırma sistemine göre yapılmıştır. Bu sınıflandırma sitokinler arasındaki fonksiyonel benzerliklere etki mekanizmalarına dayanmaktadır (Keen 2002). Sitokinler başlıca şu ana gruplara ayrılmaktadır (Keen 2002):

1) Doğal immünite mediatörleri olan sitokinler;

- a) Tip 1 interferonlar
- b) TNF (Tümör nekroz faktör)
- c) İnterlökin-1 (IL-1)
- d) İnterlökin-6 (IL-6)
- e) Kemokinler

2) Lenfosit aktivasyonu, çoğalma ve farklılaşmasını düzenleyen sitokinler;

- a) İnterlökin-2 (IL-2)
- b) İnterlökin-4 (IL-4)
- c) Transforming Growth faktör (TGF)

3) İnflamasyonda düzenleyici rol oynayan sitokinler;

- a) İnterferon-gama (IFN- γ)
- b) Lenfotoksin (Nötrofil aktivatörü)
- c) İnterlökin-12 (IL-12)
- d) İnterlökin-10 (IL-10)

Sitokinler İ/R hasarında inflamatuvar yanıtın başlatılması ve sürdürülmesinde önemli role sahiptirler. Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında sitokinler proinflamatuvar ya da antiinflamatuvar rol oynarlar (Abu-Amara ve ark. 2010).

2.4.3. Serbest Oksijen ve Nitrojen radikalleri

Atom, proton ve nötronlardan oluşan çekirdek ve çekirdeğin etrafında dönen elektronlardan oluşur. Elektronlar enerji seviyelerine göre orbitallere yerleşmişlerdir. Her bir orbitalde spinleri zıt yönde iki elektron bulunmaktadır. Serbest radikaller, bir ya da daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Elektriksel olarak pozitif yüklü, negatif yüklü veya yüksüz olabilirler, yarı ömürleri oldukça kısadır. Bu tür maddeler ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler. Radikal olmayan maddeler ile reaksiyona girerek (redükte veya okside ederek) yeni radikal oluşumuna yol açabilirler ve böylelikle zincir reaksiyonunu başlatırlar (Halliwell ve Gutteridge 1999). İskemi reperfüzyonla ilişkili karaciğer hasarının mekanizmasında kısmen ROS ve RNS rol alır. ROS ve RNS'nin üretiminin ve salınımının artmasıyla birlikte endojen antioksidanların tükenmesi apoptotik ve nekrotik hücre ölümünü hızlandırır (Jaeschke 2000).

Serbest oksijen radikalleri

Hücresel yaşamın sürekliliği karmaşık biyokimyasal tepkimelerin denge içinde yürütmesine bağlıdır. Bu dengeyi bozacak yönde ortaya çıkan endojen ve/veya eksojen kaynaklı faktörler hücre hasarına yol açarlar. Bunlar içinde oksidatif stress farklı patolojik

durumların ortaya çıkması nedeniyle gittikçe önem kazanmakta ve araştırmacıları bu yönde araştırma yapmaya yöneltmektedir (Grimm ve ark. 2003). Oksijen, aerobik yaşam için hayati öneme sahiptir. Bununla birlikte inhale edilen O₂'in yaklaşık %1-3'ü veya daha fazlası, kimyasal bağda meydana gelen bir değişiklik ile O₂⁻ gibi, H₂O₂ ve OH⁻ ROS'e dönüştürülür. Bu nedenle aerobik koşullarda hücreler her zaman ROS'in tehditi altındadır. Ancak hücrenin sahip olduğu son derece güçlü antioksidan sistemleri, herhangi bir istenmeyen etkisi başlamadan ROS' ni tehlikesiz ürünlere dönüştürür (Nohl ve ark. 2003). ROS üretiminin artışı veya antioksidan savunma sistemlerinin fonksiyon azlığı ile birlikte bu hassas denge bozulur, "oksidatif stres" meydana gelir. Sellüler fonksiyonlar bozulur, membran lipoproteinlerinin ve DNA'nın oksidasyonu ile birlikte hücre ölümüne kadar giden reaksiyonlar ilerler. Kardiyovasküler disfonksiyon, nörodejeneratif hastalıklar, gastroduodenal patolojiler, vital organların metabolik disfonksiyonları, kanser ve erken yaşlanma gibi ciddi patolojik durumlara neden olur (Halliwell ve Gutteridge 1999).

En Önemli Serbest Oksijen Radikalleri şunlardır: (Nohl ve ark. 2003)

1. O₂⁻ (Süperoksit) Radikali
2. H₂O₂ (Hidrojen Peroksit)
3. OH⁻(Hidroksil Radikali)
4. Singlet Oksijen (O₂ ↑↓)

Serbest Radikaller ve İskemi reperfüzyon hasarı

Serbest radikaller, hücresel lipid, protein ve DNA'da çeşitli derecelerde hasara neden olabilmektedir. Hücre zarlarında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyona uğrayabilmektedirler. Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin yağ asitlerinden hidrojen atomunu çıkarmak için yaptıkları atakla başlamakta ve zincir reaksiyonu şeklinde ilerlemektedir. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Hidroksil radikali, fosfolipaz A₂'yi stimüle ederek araşidonik asit salınımına yol açmaktadır. Araşidonik asitten de bir hidrojen atomu çıkararak lipid peroksidasyonunu başlatabilmektedir (Sutton ve Winterbourn 1989). Membran fosfolipidlerinin peroksidasyonu, permeabilitede ve membran akışkanlığında değişikliklere yol açmaktadır. Permeabilite özelliklerinin değişmesi anormal Ca⁺² girişine yol açarak hücre fonksiyonlarının bozulmasına ve oksidasyonla fosforilasyonun ayrılmasına yol

açabilmektedir. Sinir lifleri etrafındaki miyelin kılıfı peroksidasyonu (demyelinizasyon) nörolojik hastalıklara neden olabilmektedir. Akciğer sürfaktanının peroksidasyonu ise atelettazi ve pulmoner disfonksiyona (ARDS) yol açabilmektedir (Sutton ve Winterbourn 1989). Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan ürünler, membran permeabilitesini ve mikroviskozitesini önemli ölçüde etkilemektedirler. Membranlardaki yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan kısa zincirli yağ asitleri ve aminoasitleri içeren yapısal proteinlerin oksidasyonu, membran permeabilitesinin artmasına ve membrandaki akışkanlığın azalmasına neden olmaktadır (Sutton ve Winterbourn 1989). Proteinler, serbest radikal hasarına duyarlı moleküllerdir. Serbest radikallerin etkisi ile bu moleküllerin sülfhidril gruplarında hasar meydana gelebilmektedir. Protein moleküllerinin yapısı değişmekte ve oksidasyon reaksiyonları sonucu büyük agregatlar haline dönüşebilmektedirler. Serbest radikaller, polipeptit zincirlerinde fragmentasyona yol açabilirler. Bu şekilde oksidatif modifikasyon yolu ile sitozolik nötral proteazlar kritik enzimlerin yıkımını gerçekleştirebilirler. Aromatik aminoasitler de oksidatif ataklara çok hassas moleküllerdir. Proteinin temel yapısındaki değişme, antijenik yapıda değişmeye ve proteolize hassasiyete neden olabilmektedir. Radikaller, enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarının bozulmasına da neden olabilmektedirler (Jaeschke 2000). DNA üzerine etkileri; nükleik asitler, serbest radikallere bağlı değişikliklere duyarlıdır. Reaktif oksijen türleri DNA çift sarmalının ayrılmasına veya nükleik asit baz değişimlerine sebep olabilir. Bu da kromozal mutasyonlar ve sitotoksisite ile sonuçlanır. Hidroksil radikallerin DNA ile tepkimesi sonucunda baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilmektedir. Oksijen radikalleri, oksidatif yanılma ile de DNA hasarına yol açabilmektedir. Özellikle pirimidinler (timin) en hassas yapılardır. DNA halatlarının kopması, DNA çift sarmalı ayrılması sonucu hücrede mutasyonlar ve ölüm gelişebilmektedir. Bu reaksiyonlar sonucu oluşan, 8- hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), oksidatif DNA hasarının bir göstergesidir (Jaeschke 2000). İskemi reperfüzyon hasarında, reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri, proinflatuar gen ekspresyonu yaparak, TNF- α , IL-1, IL-8 ve sellüler adezyon moleküllerinin sentez ve salınımını artırır. Protein, lipid ve DNA hasarının yanında, doğrudan etkisi ile apoptotik ve nekrotik hücre ölümüne neden olabilirler (Jaeschke 2000, Sutton ve Winterbourn 1989, Liu ve ark. 2001).

Antioksidanlar ve etki mekanizmaları

Vücutta reaktif oksijen türlerinin düzeylerini kontrol altında tutmak ve oluşturabilecekleri hasarları engellemek için birçok savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Serbest radikalleri metabolize eden, serbest radikal oluşumunu önleyen veya serbest radikallerin temizlenmesini arttıran bu maddelere antioksidan maddeler denilmektedir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu, reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerini inhibe ederek lipid peroksidasyonunu önlerler. Aerobik hücrelerde pek çok antioksidan sistem bulunmaktadır. Bu antioksidanlar, naturel ya da sentetik, enzimatik ya da nonenzimatik, hidrofilik ya da lipofilik olarak ya da mekanizmalarına göre ve aktivasyon gösterdikleri hücre bölgesine göre sınıflandırılabilirler (Glantzounis ve ark. 2005). Endojen antioksidanlar, enzim olarak görev yapanlar ve enzim olmayan antioksidanlar olarak iki grupta incelenmektedir. Enzim olan antioksidanlar, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), glutatyon transferaz (GST), glutatyon redüktaz ve mitokondrial oksidaz sistemidir. Enzim olmayanlar ise; bilirubin, albumin, ürik asit, α -tokoferol, askorbik asit, seruloplazmin, transferrin, ferritin ve glutatyon gibi maddelerdir. Bunlar serbest radikallere karşı ilk savunma sistemini oluşturmaktadırlar (Glantzounis ve ark. 2005). Sekonder antioksidanlar, zincir kırıcı reaksiyon ile serbest radikalleri uzaklaştırmaktadırlar. Bilirubin, E vitamini, C vitamini, β -karoten, ürik asit ve albumin gibi maddeler bu sınıfta yer almaktadırlar. Lipid peroksidasyon zincirini kıran bir antioksidan olan α -tokoferol hücre zarında bulunmaktadır. Askorbik asit suda erimekte ve radikal toplayıcı olarak rol almakta, E vitamininin etkisini arttırmaktadır. Ürik asit ksantin oksidazı inhibe ederek serbest radikal oluşumunu azaltmaktadır (Glantzounis ve ark. 2005).

Total Antioksidan Seviyesi (TAS)

Normal fizyolojik koşullarda organizma, endojen veya eksojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve bunlara bağlı oluşan oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan defans sistemine sahiptir. Vücudun oluşan oksidan durumlara karşı redoks dengesini sürdürebilmesinde kan dolaşımı çok önemlidir. Çünkü antioksidanların vücudun tüm bölümlerine taşınmasını ve dağıtımını gerçekleştirmektedir (Erel 2004). Total antioksidan kapasiteye en büyük katkı plazmadaki antioksidan moleküllerden gelmektedir. Plazmada bilirubin, serbest demiri toplayan transferin ve seruloplazmin, ürik asit, E

vitamini, C vitamini gibi proteinler yanında serbest radikalleri tutan zincir kırıcı antioksidanlarda bulunmaktadır (Benzie ve Strain 1999). Albumin, ürik asit, askorbik asit insan plazmasındaki total antioksidan kapasitenin %85'inden fazlasını oluşturmaktadır. Bunun nedeni, kanda bilirubin, glutasyon, flavinoidler, alfa tokoferol ve beta karoten gibi antioksidan sistemin komponentlerine nazaran albumin, ürik asit ve askorbik asitin seviyelerinin fazla olmasına bağlıdır (Erel 2004, Benzie ve Strain 1999). Plazmada antioksidanlar bir etkileşim içinde bulunurlar. Genel olarak bu maddeler sinerjistik olarak çalışmaktadırlar. Bu etkileşimden dolayı, bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır. Bu sinerjizme örnek glutasyonun askorbatı, askorbatında tokoferolün yeniden aktifleşmesini sağlaması gösterilebilir. Ayrıca bir antioksidandaki azalma diğerindeki artış ile kompanse edilebilmektedir. Total antioksidan kapasitenin ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler vermektedir. Bu yüzden kanın antioksidan durumunu saptamada, bireysel antioksidanlardan çok bunların toplam antioksidan değerini veren toplam antioksidan kapasite ölçümü yaygınlaşmaktadır (Erel 2004, Benzie ve Strain 1999).

Total Oksidan Seviye (TOS)

Bilinen pek çok metodla serum ya da plazmadaki oksidan moleküllerin konsantrasyonları ayrı ayrı ölçülebilmektedir. Oksidan stresin arttığı durumlarda artan bu moleküllerin oksidan etkileri birbiri üzerine eklenebilir. Ayrıca tek tek ölçümden ziyade total ölçümün daha pratik olacağı düşünülerek tüm oksidanların durumunu yansıtabilecek bir yöntem geliştirilmiştir. Bu metodla in vitro TOS ölçümü yapılabilmektedir (Erel 2005).

Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

Total oksidanların seviyelerinin, total antioksidanların seviyelerine bölünmesiyle elde edilen oransal bir indekstir ve OSI değerinin yüksek olması oksidatif stresin arttığı durumlarda ortaya çıkar (Harma ve Erel 2005, Erol 2011).

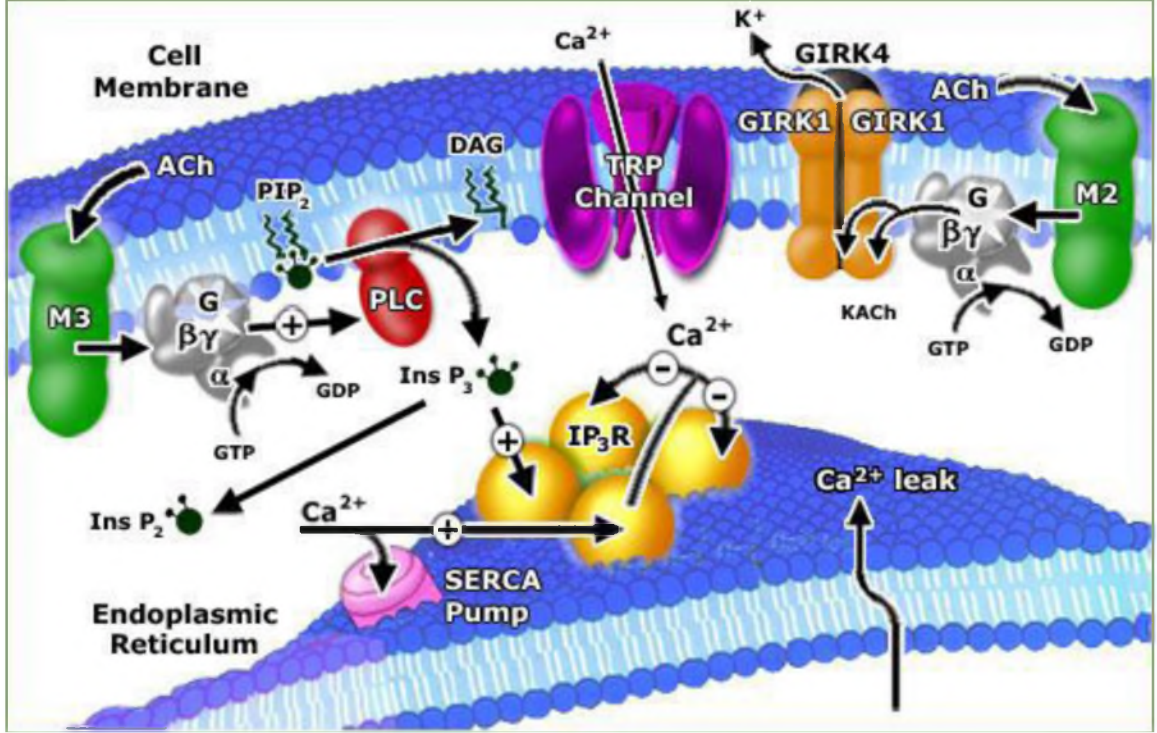
$$\text{OSI} = \frac{(\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. / L.})}{(\text{TAS, } \mu\text{mol trolox Equiv. / L.}) \times 10}$$

2.5. Timokinon

Timokinon, bir monoterpen olup pek çok tedavi edici etkileri ile umut verici tıbbi bitkilerden *Nigella sativa* tohumlarının majör bileşimidir (Aggarwal ve ark. 2008). Yapılan incelemeler neticesinde *nigella sativa* tohumlarının içeriğinin %38.20'sini yağ, %31.94'ünü karbonhidrat, %20.85'ini protein, %7.94'ünü lif, %4.64'ünü su oluşturur (Al-Jassir 1992). Timokinon ayrıca antioksidan etkiler göstermiştir. Hayvan modelleri ve hücre kültür sistemlerinde enflamasyonu inhibe etmiştir. Timokinon antikanser, antioksidan, antibakterial, antifungal, antiparazitik ve antiasmatik olduğunu gösteren çalışmalara rağmen etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Aggarwal ve ark. 2008, Badary ve Gamal El-Din 2001, Morsi 2000, Aljabe ve ark. 2005, Randhawa ve ark. 2005, Boskabady ve Shirmohammadi 2002).

2.6. TRP Gen Ailesi

Yapılan çalışmalar, *TRP* proteinlerinin yeni bir Ca^{+2} 'a geçirgen katyon kanalı olma olasılığını arttırmıştır. *TRP* kanalları ya direkt olarak plazma zarlarındaki Ca^{+2} giriş kanalları gibi davranmakta ya da Ca^{+2} giriş kanallarının modülasyonu için itici güç olan zar potansiyelini değiştiren sitozolik serbest Ca^{+2} kanallarında değişime yardımcı olmaktadır (Kraft ve Harteneck 2005). *TRP* kanalları, Ca^{+2} - Mg^{+2} iletimi, kan basıncının düzenlenmesi, tadın, kokunun, sesin algılanması, gen ekspresyonu ve salgılanması, apoptozis gibi önemli hücrel süreçlerde ve yaygın olarak bilinen 2. haberci mekanizmada, iyon giriş çıkışı gibi pek çok önemli mekanizmada rol oynar. Yapılan genetik araştırmalar sonucu, amino asit benzerliklerine göre *TRP* kanalları 7 alt aileye ayrılmıştır. Bunlar: *TRPC* (canonical), *TRPM* (melastatin), *TRPV* (vanilloid), *TRPA* (anykrin zengin protein), *TRPP* (polisistin), *TRPML* (mukolipin), *TRPN* (nompc) olarak adlandırılmıştır. Bu kanalların aktivasyon mekanizmaları ve buldukları organlar farklıdır. Örneğin beyin ve nöron hücrelerinde bulunan, daha çok *TRP* melastatindir (Hara ve ark. 2002, Grimm ve ark. 2003, Ullrich ve ark. 2005).



Şekil 2.1. TRP Kanalının hücre membranındaki yapısı (Voets ve ark. 2004).

2.6.1. Trpm

TRP Melastatin (*TRPM*) ailesi *TRPM1-TRPM8* şeklinde tanımlanmak üzere toplam 8 alt üyesi bildirilmiştir (Ulrich ve ark. 2005, Zhang ve ark. 2003). *TRPM* nin alt üyeleri dizi benzerliklerine göre 4 grup altında sınıflandırılmıştır:

TRPM1,3 TRPM2,8 TRPM4,5 ve *TRPM6,7*. *TRPM4,5* kanalları Ca^{2+} geçirgen değilken, *TRPM6* ve *7* Ca^{2+} ve magnezyuma yüksek geçirgenlik gösterir. *TRPC* ve *TRPV* kanallarının aksine *TRPM* kanalları ankyrin tekrarları içermez (Nilius ve ark. 2005, Monteilh ve ark. 2003). *TRPM1* kanalı için henüz bir aktivatör gösterilmemiştir. *TRPM1* kanalının yapısal olarak aktif bir Ca^{2+} giriş kanalı olduğu önerilmiştir (Voetes ve ark. 2004). *TRPM3* ekspresyonu böbrek, beyin, testis ve omurilikte gösterilmiştir (Takezawa ve ark. 2004, Zhang ve ark. 2004).

Çalışmamızda karaciğerde İ/R modeli oluşturarak Timokinonun iskemi/reperfüzyona ve karaciğer dokularındaki *TRPM2,6,7,8* iyon kanallarına etkisini araştırmayı planladık. *TRPM* kanallarının iskemide ve apoptoziste aldığı önemli rolü de dikkate alırsak, bu konunun aydınlatılması, dolayısıyla *TRPM2,6,7,8* kanallarının ekspresyonlarının Timokinonla olan ilişkisi, hem iskemi ve apoptozis hem de karaciğerle ilişkili hastalıkların tanı ve tedavisindeki potansiyelinin değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu deneysel çalışma, Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun 2014-5/9 numaralı protokol izniyle, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Araştırma Merkezin (MKÜ-DAM) laboratuvarında gerçekleştirildi.

Çalışma 300-400 gr ağırlığındaki erişkin erkek Wistar Albino cinsi 50 sıçan üzerinde 5 grup oluşturularak planlandı. Deneysel süresince sıçanlar düzenli aydınlık-karanlık uygulaması (12:12), 20-24°C sıcaklık ve standart nem oranı ayarlanmış odalarda tel kafeslerde yaşatıldı. Hayvanların beslenmesinde standart pellet yemi ve şehir içme suyu kullanıldı (Resim 1).



Şekil 3.1. Wistar Albino cinsi sıçanlar.

3.1. Deneysel Grupları

1. Grup kontrol grubu olarak oluşturuldu (n:10), 2. Grup yalancı cerrahi grubu olarak oluşturuldu (n:10), 3. Grupta deneysel olarak karaciğerde 45 dakika iskemi / 45 dakika reperfüzyon oluşturuldu (n:10), 4. Grupta 10 gün 50 mg/kg oral yoldan Timokinon (Tmq) tedavisi verildi (n:10), 5. Grupta iskemi/reperfüzyondan 10 gün önce 50 mg/kg oral yoldan Tmq tedavisi sonrası iskemi/reperfüzyon oluşturuldu (n:10).

Çizelge 3.1. Deney grupları

GRUPLAR	Denek Sayısı
Kontrol grubu	10
Yalancı cerrahi grubu	10
Karaciğer İskemi/Reperfüzyon grubu (45dk.İ / 45 dk.R)	10
Tmq grubu(10 gün öncesiden oral gavajla 50 mg/kg Tmq)	10
Tmq + İ/R grubu (İ/R öncesi 10 gün oral gavajla 50 mg/kg Tmq + 45 dk.İ / 45 dk.R)	10
TOPLAM	50

3.2. Deneysel Çalışma Modeli

Deneklerin anestezisi 80 mg/kg Ketamin ve 12 mg/kg Ksilazin verilerek sağlandı ve gerektiğinde idame doz uygulandı (Resim 2).

İlaç enjeksiyonundan 15 dakika sonra karın ön duvarındaki tüyler traş edilerek karın cildi pavidon iyot ile silinerek cilt antisepsisi uygulandı (Şekil 3). Orta hattan yaklaşık 3-4 cm'lik insizyon ile laparotomi yapıldı (Şekil 4). Karın içindeki organlar görünür hale geldikten sonra, kontrol grubu dışındaki gruplarda Portal ven ve Hepatik arter eksplore edilerek ve atravmatik vasküler klemp ile karaciğerin sol ve orta lobuna giden kan akımı kesildi (Şekil 6). Böylece segmental (70%) ve öldürücü etkisi olmayan hepatik iskemi meydana getirilmiş oldu. Atravmatik vasküler klemp yardımı ile 45 dakika iskemi uygulandı. İskemi ile karaciğer yüzeyinde oluşan renk değişikliği gözlemlendi (Şekil 9) (El-Abhar ve ark. 2003). Sütürün sıkılması nedeniyle damarda olabilecek trombozu engellemek amacıyla 600İÜ/kg dozda heparinin iskemi başlatılmadan önce intra venöz verildi. Bu sırada açıkta kalan abdomen ılık serum fizyolojik ile ıslatılmış spanç ile örtülüp 45 dakika sonunda klempler alınarak iskemi sonlandırıldı. Reperfüzyon safhası (45 dk.) böylece başlayan sıçanların laparotomi insizyonu 3/0 atravmatik ipek sütür ile kapatılıp 45 dakikanın sonunda 5 ml kan kan örneği intrakardiyak alındı ve sonrasında denekler servikal dislokasyon ile ötenazi sağlandı (El-Abhar ve ark. 2003). Çalışma sonucunda alınan karaciğer dokularının bir kısmı gen ekspresyonu çalışmaları için -80° de saklanmak üzere kriyo tüpler içerisine alındı. Daha sonra karaciğerden sol lobdan doku örneği alınarak histopatolojik incelemeye gönderilmek üzere % 10 formol solüsyonuna alındı. Bir

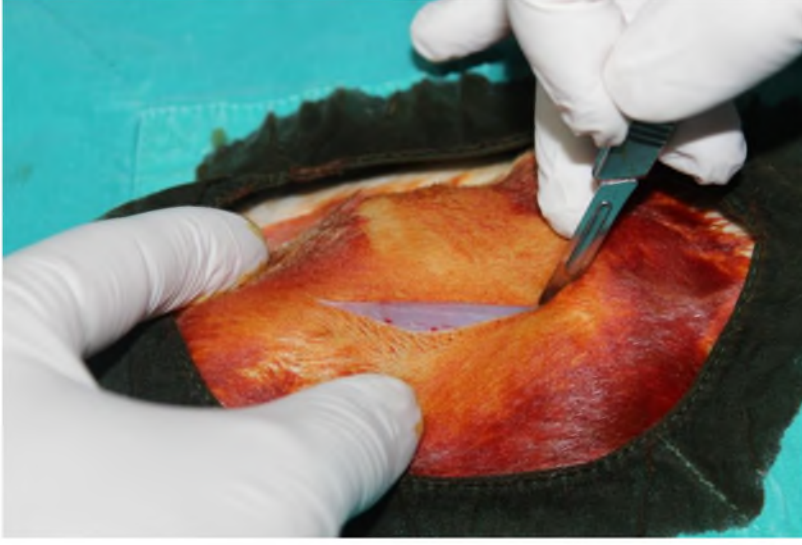
kısmı da gen ekspresyonu çalışmaları için -80°de saklanmak üzere kriyo tüpler içerisine alındı.



şekil 3.2. Anestezi Maddeleri.



şekil 3.3. Pavidon iyod ile cilt antisepsisi.



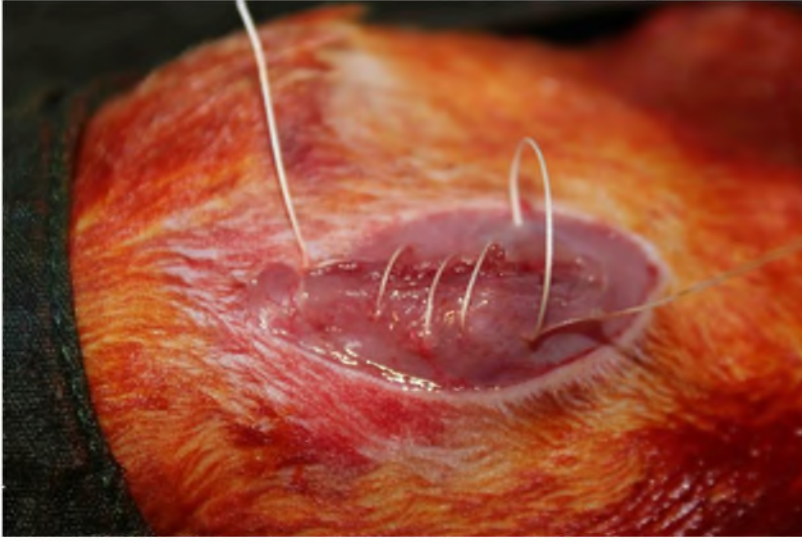
Şekil 3.4. Laparotomi.



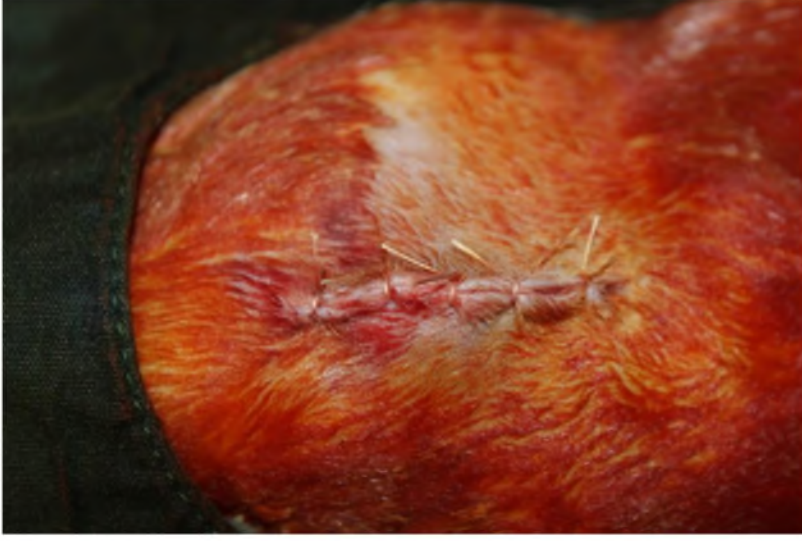
Şekil 3.5. Karaciğer sol ve median lobuna giden hepatik arter ve portal venin askıya alınması.



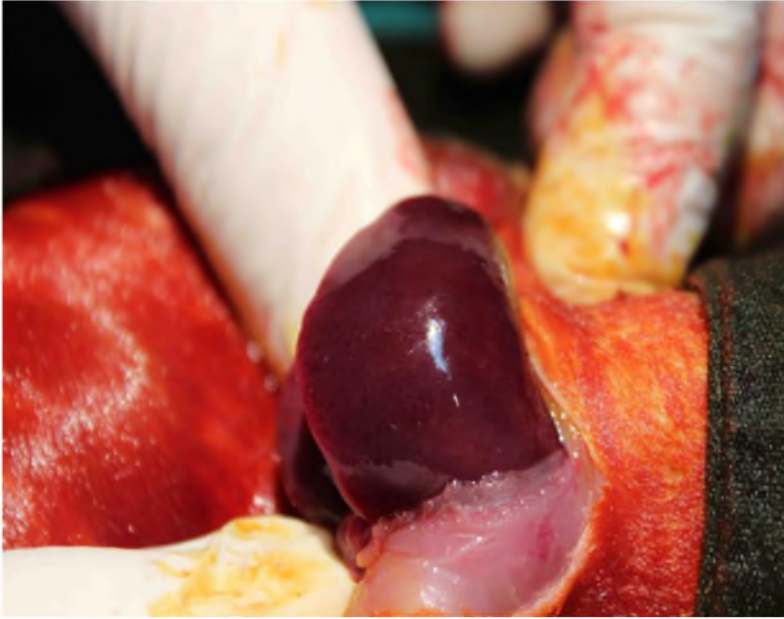
Şekil 3.6. Portal ven ve hepatik arterin oklüzyonu.



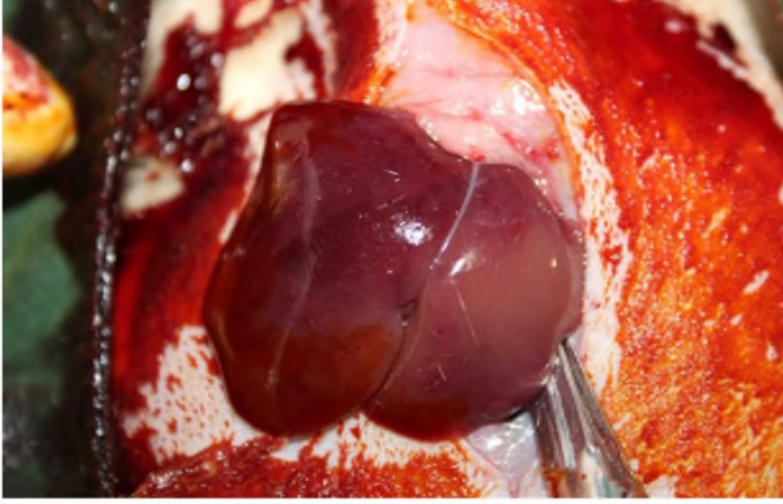
Şekil 3.7. İskemi sonrası cerrahi işlemi.



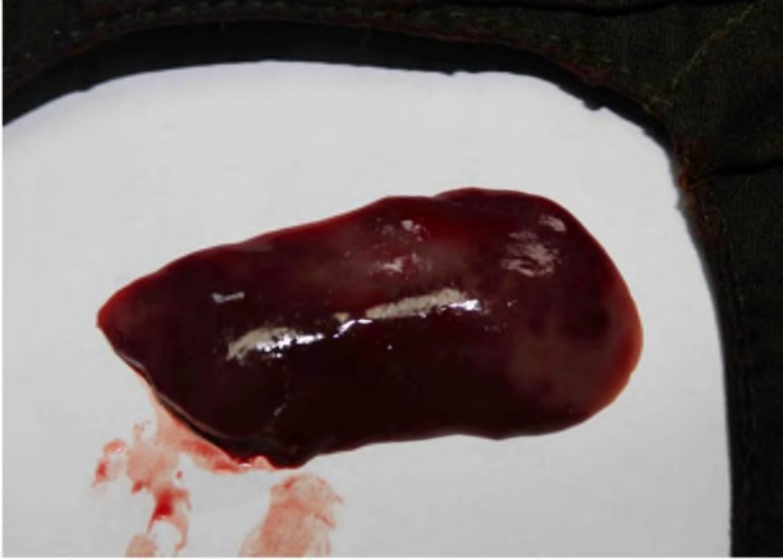
Şekil 3.8. İskemi sonrası cerrahinin sonlandırması.



Şekil 3.9. Normal karaciğer dokusu.



Şekil 3.10. Karaciğerde oluşan iskemik alan.



Şekil 3.11. Karaciğerde oluşan reperfüzyon sonrası görünüm.

3.3. Histopatolojik Analizler

Karaciğer sol lob doku örnekleri %10'luk formol solüsyonu içerisine konuldu. Örnekler alışlagelen histolojik metotla bloklandı. Parafin bloklardan 1µ/5 µm kalınlığında kesitler alınıp Hematoksilen- Eosin (H-E) ile boyandı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus CX31-Japan) incelenerek 40 X büyütmede fotoğrafları çekildi. Daha sonra hasarın şiddeti Suzuki Skalasına göre değerlendirildi (Suzuki ve ark. 1991).



Şekil 3.12. % 10'luk formal solüsyon örnekleri.

3.4. Biyokimyasal Analizler

Yapılan uygulamalar neticesinde biyokimyasal ölçümler için kan örnekleri kardiyak delme yapılarak alındı. Sıçanlardan dörder ml kan iki ayrı biyokimya tüpüne alındı. Alınan kan örnekleri, 3000 rpm'de 10 dk. oda sıcaklığında santrifüje edildikten sonra -20°'de saklandı. Laboratuvarda 4000 devirde 10 dk. santrifüj edildi. Serumlar ependorf tüpünde -86°C'de saklandı. Karaciğerde meydana gelen hasarı tespit edebilmek için elde edilen örneklerde aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH) seviyeleri mikro ELISA cihazında belirlendi. Plazmadaki tümör nekrotizan faktör alfa (TNF- α) ve interleukin 6 (İL-6) düzeyleri ise BD BioSciences firmasından alınan fare TNF-a ELISA kiti ve fare IL-6 ELISA kiti ile belirlendi. Total antioksidan (TAS), total oksidan (TOS) durumları otoanalizör cihazında ticari kitleriyle ölçüldü ve elde edilen verilerden serum oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplandı.

3.5. TRPM Gen İfadelerinin Analizleri

Çalışma sonucunda alınan karaciğer dokularının bir kısmı gen ekspresyonu çalışmaları için -80°'de saklanmak üzere kriyo tüpler içerisine alındı. Alınan patolojik ve normal dokularda, TRPM kanallarının ekspresyonlarının gösterilmesi amacıyla moleküler analiz değerlendirmeleri yapıldı. Dokularda mRNA ekspresyonu, RNA izolasyonu, cDNA eldesi ve Kantitatif gerçek zamanlı Revers Transkriptaz PCR incelendi. PCR sonucu çıkan

sonuçlar, birbiriyle kıyaslanarak, hangi genin ekspresyonunun arttığı veya azaldığına karar verildi.

3.5.1.RNA İzolasyonu

İskemi Reperfüzyon deneyi sonrası -80 °C'de saklanan sıçan karaciğer dokuları lizis solüsyonu ile parçalanıp homojenize edildi daha sonra RNA izolasyonu RNeasy Mini Kit (Katalog no: 74104, QIAGEN, Germany) kullanılarak protokolüne uygun olarak yapıldı.

Homojenizasyon ve RNA izolasyonu aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir;

1. 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içindeki yaklaşık 25 mg donmuş karaciğer dokusu üzerine 600 µl Lysis Buffer (içinde β-mercaptoethanol bulunan) ekleyip 1 adet elik bilye konuldu ve 4 dk boyunca dokuların parçalanması (QIAGEN, TissueLyser LT, Germany) sağlandı.

2. 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.

3. Lizata 600 µl %70 etanol eklendi ve pipetaj yapıldı.

4. 2 ml toplama tüp içindeki RNeasy spin column içine 700 µl örnek pipetlendi. 15 sn, ≥8000 g' de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda alt faz atıldı.

5. Örneğin geri kalanı için bir önceki adım tekrarlandı.

6. RNeasy spin column'a 700 µl RW1 buffer eklendi. 15 sn, ≥8000 g' de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda alt faz atıldı.

7. RNeasy spin column yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve üzerine 500 µl RPE buffer eklendi. 15 sn, ≥8000 g' de santrifüj edildi. Alt faz atıldı.

8. RNeasy spin column'a 500 µl RPE buffer eklendi. 2 dk, ≥8000 g' de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda alt faz atıldı.

9. RNeasy spin column yeni toplama tüpüne yerleştirildi ve filtrenin kuruması için 1 dk, 10.000 rpm' de santrifüj edildi.

10. RNeasy spin column yeni 1,5'lik mikrosantrifüj tüpe yerleştirildi. Üzerine 50 µl RNase-free water eklendi. 1 dk, ≥8000 g' de santrifüj edildi.

11. 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.

3.5.2. CDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lar, cDNA sentezi kiti (Applied Biosystems, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, USA) ve BİO-RAD, T100, Thermal Cycler cihazı kullanılarak reverse transkripsiyon yöntemiyle cDNA'ya dönüştürüldü.

cDNA eldesi için bir tüpte 10 µl revers transkripsiyon karışımı hazırlandı.

cDNA sentezinde kullanılan karışım:

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 20 µl olacak şekilde 10 µl RNA + 10 µl cDNA sentez karışımı ile birleştirilerek aşağıdaki koşullarda cDNA eldesi gerçekleştirildi.

25°C 10 dk

37°C 120 dk

85°C 5 dk

cDNA örnekleri üzerine 90 µl Nuclease-free water eklenerek sulandırıldı. Elde edilen cDNA'lar -20 °C de saklandı.

3.5.3. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR)

TRPM2,6,7,8 ve 'ev' geni ('house keeping') β -Actin (Ella Biotech, Deutschland) gen transkripsiyon düzeyleri kantitatif RT-PCR yöntemiyle (QIAGEN Rotor-Gene Q, Germany) belirlendi. Kantitatif değerler normalizasyon katsayısına göre tespit edildi.

Kullanılan Primer Dizileri:

β -Actin	Left	5'-CCC GCG AGT ACA ACC TTC T-3'
β -Actin	Right	5'-CGT CAT CCA TGG CGA ACT-3'
TRPM2	Left	5'-AAT TTG CTC ATC GCC ATG TT-3'
TRPM2	Right	5'-GAT CTG GTC TGT GTG CTC CTG-3'
TRPM6	Left	5'-GCA AGA ACT GGC TTT CCG TG-3'
TRPM6	Right	5'-ATC CGG GTC CTC TTG CAT CT-3'
TRPM7	Left	5'-AGA CGC TTT CCG ATA GAT GG-3'
TRPM7	Right	5'-CTA TCC AGG ATT TCT GGG ACA T-3'
TRPM8	Left	5'-GCC CAG TGA TGT GGA CAG TA-3'
TRPM8	Right	5'-GGA CTC ATT TCC CGA GAA GG-3'

3.6. İstatiksel Analizler

Biyokimyasal ve histopatolojik sonuçların istatistiksel değerlendirilmeleri v.5.0 istatistik paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler Ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizde kolmogorow smirnov 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. Biyokimyasal Sonuçlar

Mustafa Kemal Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirilen çalışmaya toplam 50 sıçan dahil edildi ve tüm denekler çalışmayı tamamladı. Çalışmamızda elde edilen biyokimyasal parametrelerin sonuçları tablolar halinde ve karaciğer fonksiyon testleri, böbrek fonksiyon testleri, oksidatif stres parametrelerinin değerlendirilmesi alt başlıklarıyla sunulmuştur.

4.1.1. Karaciğer Fonksiyon Testleri

Biyokimyasal parametrelerden AST, ALT, GGT, LDH, seviyelerinde kontrol, Tmq ve Tmq+İ/R gruplarıyla karşılaştırıldığında İ/R grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p<0.05$) (Tablo 2). Kontrol grubu ile kıyaslandığında İ/R grubunda AST, ALT, GGT ve LDH düzeylerinde anlamlı artış olduğu saptandı ($p<0.001$) (Tablo 2). İ/R ve Kontrol grubu ile kıyaslandığında Tmq grubunda ALT düzeyinde anlamlı artış olduğu saptandı ($p<0.001$) (Tablo 2). İ/R ve Kontrol grubu ile kıyaslandığında Tmq grubunda GGT düzeyinde anlamlı artış olduğu saptandı ($p<0.01$) (Tablo 2). İ/R ve Kontrol grubu ile kıyaslandığında Tmq grubunda AST, LDH düzeylerinde anlamlı azalma olduğu saptandı ($p<0.001$) (Tablo 2). İ/R grubu ile kıyaslandığında Tmq+İ/R grubunda AST, ALT düzeylerinde anlamlı artış olduğu saptandı ($p<0.01$) (Tablo 2). İ/R grubu ile kıyaslandığında Tmq+İ/R grubunda GGT, LDH düzeylerinde anlamlı artış olduğu saptandı ($p<0.001$) (Tablo 2). Tmq+İ/R grubu ile kıyaslandığında Kontrol grubunda AST, ALT düzeylerinde anlamlı azalma olduğu saptandı ($p<0.001$) (Tablo 2). Tmq+İ/R grubu ile kıyaslandığında Kontrol grubunda GGT, LDH düzeylerinde anlamlı azalma olduğu saptandı ($p<0.01$) (Tablo 2).

Çizelge 4.1. Gruplar arası karaciğer fonksiyon test parametrelerinin karşılaştırılması (Ort±SH).

	Kontrol	Sham	Tmq	İ/R	Tmq + İ/R
AST (U/l)	145.8±45.1 ^{c***}	155.4±39.3	137.9±24.7 ^{b,c***}	2155.0±236.5 ^{a***}	1389.0±171.9 ^{b**}
ALT (U/l)	51.80±9.7 ^{c***}	67.02±9.1	54.1±4.9 ^{b,c***}	1076.0±72.3 ^{a***}	819.9±61.7 ^{b**}
GGT (U/l)	1.83±0.30 ^{c**}	1.85±0.26	2.28±0.28 ^{b,c**}	9.12±0.85 ^{a***}	4.87±0.51 ^{b***}
LDH (mg/dl)	697.8±211.3 ^{c**}	872.0±272.3	442.7±90.8 ^{b,c***}	4595.0±424.1 ^{a***}	2566±376.1 ^{b***}

İ/R: İskemi/Reperfüzyon; Tmq: Timokinon. AST: Aspartat Aminotransferaz; ALT: Alanin Aminotransferaz; GGT: Gama Glutamil Transferaz; LDH: Laktat Dehidrojenaz *; p<0.05; **: p<0.01; ***: p< 0.001;

^a vs. Kontrol; ^b vs. İ/R; ^c vs. Tmq + İ/R

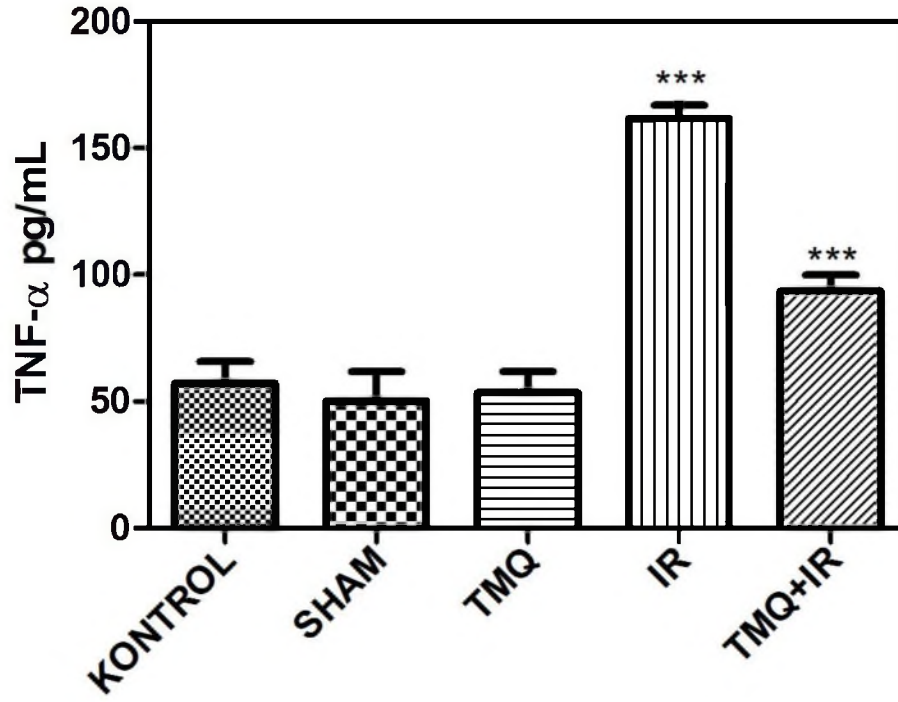
4.1.2. Plazma TNF- α ve İL-6 Düzeylerine İlişkin Bulgular

İskemik doku hasarı durumu, enflamatuvar cevap ile benzer göstermekte; iske miyle beraber dokuda proenflamatuvar sitokinlerin üretimi artmakta, mononükleer ve PMNL aktivasyonu ve dokuya invazyonu görülmektedir. İskemi, aktif makrofajlardan proenflamatuvar sitokinlerin salınımını tetikleyerek erken reperfüzyon hasarı oluşturmaktadır. Çalışmamızda, gruplarda proenflamatuvar sitokinlerden TNF- α ve İL-6 nın plazma düzeyleri tayin edilerek Tmq uygulamasının bu sitokin düzeylerine, dolayısıyla erken reperfüzyon hasarına etkisi araştırılmıştır. İ/R grubunun plazma TNF- α ve İL-6 düzeyleri, kontrol ve sham grubunun düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş (P<0.001); İ/R protokolünden 10 gün önce Tmq uygulanan Tmq+İ/R grubunda ise bu düzey İ/R grubunun değerlerine kıyasla azalmıştır (P<0.001). İ/R protokolünden 10 gün önce Tmq uygulanan grupta plazma sitokin düzeylerinin kontrol ve sham gruplarındaki düzeylere yaklaştığı gözlemlenmiştir (Tablo 3) (Şekil 2) (Şekil 3).

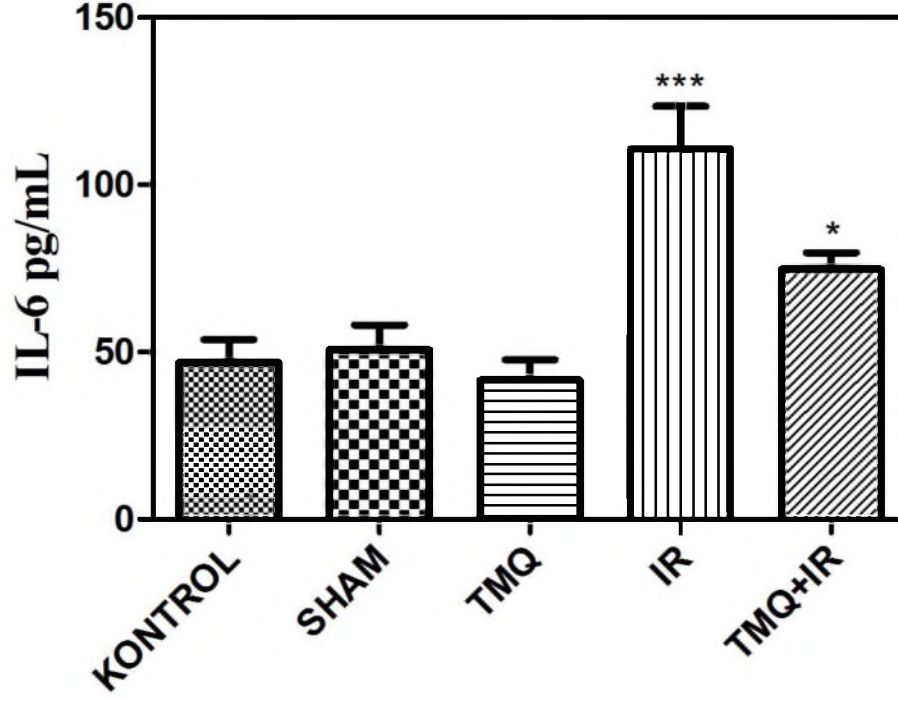
Çizelge 4.2. Gruplar arası plazma TNF- α , İL-6 düzeylerine ilişkin parametrelerinin karşılaştırılması (Ort \pm SH).

	Kontrol	Sham	Tmq	İ/R	Tmq + İ/R
TNF- α (pg/ml)	57.14 \pm 8.680 ^{c**}	50.23 \pm 11.51	53.49 \pm 8.288 ^{b,c**}	161.8 \pm 5.107 ^{a***}	93.63 \pm 6.340 ^{b***}
İL-6 (pg/ml)	46.75 \pm 6.994 ^{c**}	50.63 \pm 7.481	41.50 \pm 6.156 ^{b,c***}	110.6 \pm 12.81 ^{a***}	74.63 \pm 5.010 ^{b***}

İ/R: İskemi/Reperfüzyon; Tmq: Timokinon. TNF- α : Tümör Nekrotizan Faktör Alfa; İL-6: İnterlökin-6;
** : p<0.01; *** : p<0.001; ^a vs. Kontrol; ^b vs. İ/R; ^c vs. Tmq + İ/R



Şekil 4.1. Gruplar arası plazma TNF- α düzeylerine ilişkin parametrelerinin karşılaştırılması (**: Kontrol vs. İR; ***: Tmq+İR vs İR).



Şekil 4.2. Gruplar arası plazma İL-6 düzeylerine ilişkin parametrelerinin karşılaştırılması (***: Kontrol vs. İR; *: Tmq+İR vs İR).

4.1.3. Böbrek Fonksiyon Testleri

Biyokimyasal parametrelerden kreatin ve üre seviyelerinde kontrol, Tmq ve Tmq+İR gruplarıyla karşılaştırıldığında İ/R grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p<0.05$) (Tablo 4). Kontrol grubu ile kıyaslandığında İ/R grubunda kreatin ve üre düzeyinde anlamlı artış olduğu saptandı ($p<0.01$) (Tablo 4). İ/R grubu ile kıyaslandığında Tmq grubunda kreatin ve üre düzeyinde anlamlı artış olduğu saptandı ($p<0.01$) (Tablo 4). İ/R grubu ile kıyaslandığında Tmq+İR grubunda kreatin düzeyinde anlamlı azalma olduğu saptandı ($p<0.05$) (Tablo 4). Tmq+İR grubu ile kıyaslandığında Tmq grubunda kreatin düzeyinde anlamlı azalma olduğu saptandı ($p<0.01$) (Tablo 4). Tmq+İR grubu ile kıyaslandığında Kontrol grubunda kreatin düzeyinde anlamlı azalma olduğu saptandı ($p<0.01$) (Tablo 4).

Çizelge 4.3. Gruplar arası böbrek fonksiyon test parametrelerinin karşılaştırılması (Ort±SH).

	Kontrol	Sham	Tmq	İ/R	Tmq + İ/R
Kreatin (mg/dl)	0.37±0.04 ^{c**}	0.40±0.00	0.47±0.01 ^{b,c**}	0.75±0.04 ^{a***}	0.63±0.03 ^{b*}
Üre (mg/dl)	17.44±0.2	18.24±0.9	18.30±1.1 ^{b**}	25.28±1.9 ^{a***}	22.04±0.6

İ/R: İskemi/Reperfüzyon; Tmq: Timokinon. ^a vs. Kontrol; ^b vs. İ/R; ^c vs. Tmq + İ/R. **: p<0.01; ***: p<0.001;

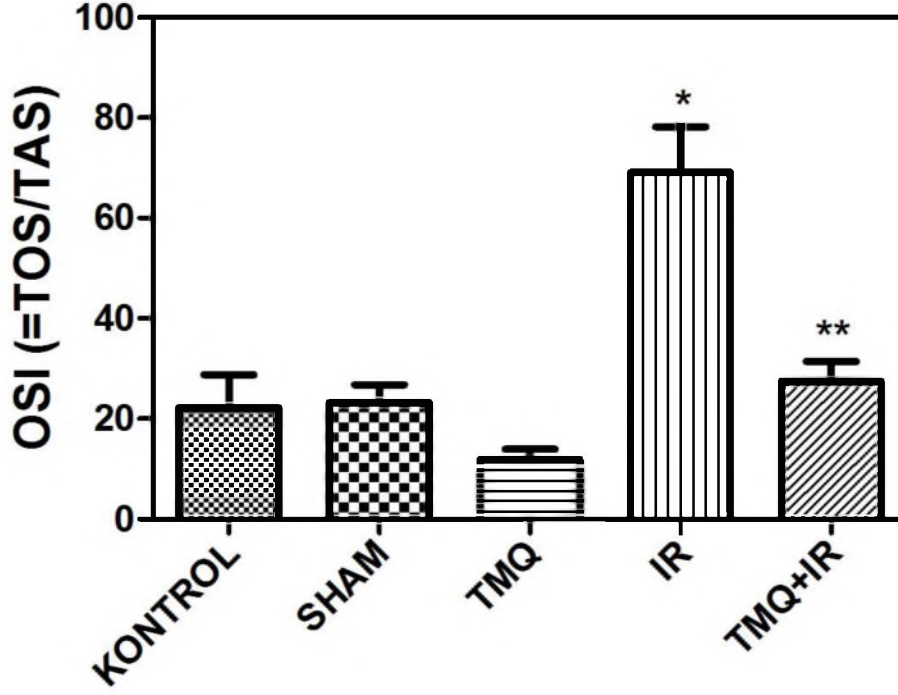
4.1.4. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Biyokimyasal parametrelerden oksidatif stres indeksi Kontrol grubuyla kıyaslandığında İ/R grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış saptanırken, İ/R grubuna kıyaslandığında Tmq ve Tmq+İ/R gruplarında istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı (p< 0.001) (Tablo 5, Şekil 4).

Çizelge 4.4. Gruplar arası oksidatif stres parametrelerinin karşılaştırılması (Ort±SH).

	Kontrol	Sham	Tmq	İ/R	Tmq + İ/R
TAS (mmol/l)	0.87±0.04	0.90±0.05	1.40±0.13 ^{a,b**}	0.75±0.07	1.22±0.07 ^{b**}
TOS (umol/l)	19.07±6.04	21.56±4.41	14.75±1.85 ^{b,c**}	48.99±4.44 ^{a***}	34.19±5.07
OSI (TOS/TAS)	22.21±6.56	23.17±3.58	11.91±2.04 ^{b***}	69.16±9.03 ^{a***}	27.47±4.01 ^{b***}

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



Şekil 4.3. Gruplar arası oksidatif stress indeksinin karşılaştırılması (*: Kontrol vs. İR; **: Tmq+İR vs İR).

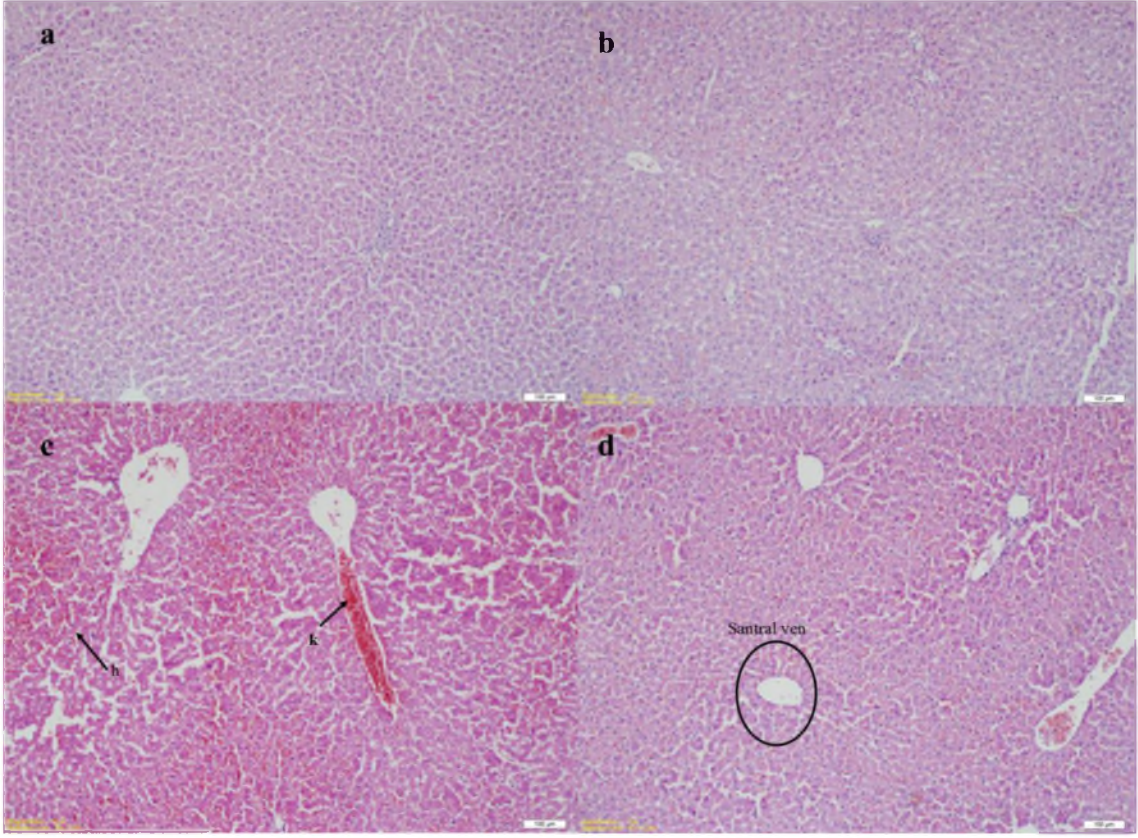
4.2. Histopatoloji Sonuçları

Karaciğer dokusunun H-E boyasıyla boyanmış kesitlerinin incelenmesi ile gruplar arasında farklı hücresel değişikliklerin olduğu gözlemlendi. Karaciğer dokusunun H&E boyasıyla boyanmış kesitlerinin incelenmesi ile gruplar arasında farklı sonuçlar olduğu gözlemlendi. Histopatolojik değerlendirmede hücresel şişme, konjesyon, Polimorf nüveli lökosit (PNL) ve apoptoz değerlerinin kontrol ve yalancı cerrahi grubuna kıyasla İ/R grubunda anlamlı olarak arttığı görüldü ($p<0.01$). İ/R grubuyla karşılaştırıldığında Tmq ve Tmq+İ/R gruplarında hücresel şişme, konjesyon, PNL ve apoptoz değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ($p<0.01$) (Tablo 6, Şekil 5).

Çizelge 4.5. Gruplar arası histopatolojik parametrelerin karşılaştırılması (ORT±SD).

	Kontrol	Sham	Tmq	İ/R	Tmq + İ/R
Hücrel Şişme	1.17±0.41 ^{c**}	1.57±0.53	1.14±0.38 ^{b,c**}	2.88±0.64 ^{a**}	1.00±0.53 ^{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	2.83±0.75 ^{c**}	2.00±1.00	1.43±0.53 ^{b,c**}	3.75±0.46 ^{a**}	2.38±0.52 ^{b**}
Hemoraji	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.13±0.35
İnflamatuar hücre infiltrasyonu	0.67±0.52 ^{c**}	1.29±0.49	1.43±0.53 ^{b,c**}	1.88±0.64 ^{a**}	1.13±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	0.17±0.41	0.29±0.49	0.00±0.00	0.50±0.53 ^{a**}	0.00±0.00

İ/R: İskemi/Reperfüzyon; Tmq: Timokinon. **: p<0.01; ^a vs. Kontrol; ^b vs. I/R; ^c vs. Tmq + I/R



Şekil 4.4. Sıçan karaciğerlerinin histopatolojik görünümü.

a. ve b. ^aKontrol ve ^b Yalancı Cerrahi grubunda normal karaciğer histolojik görünümü (H&E, x100)

c ve d. ^cİ/R grubunda ve ^dTmq+İ/R grubunda İskemik değişiklikler, sinüzoidal konjesyon, hücresel şişme ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunun histopatolojik görünümü (H&E, x100).

4.3. Gen Sonuçları

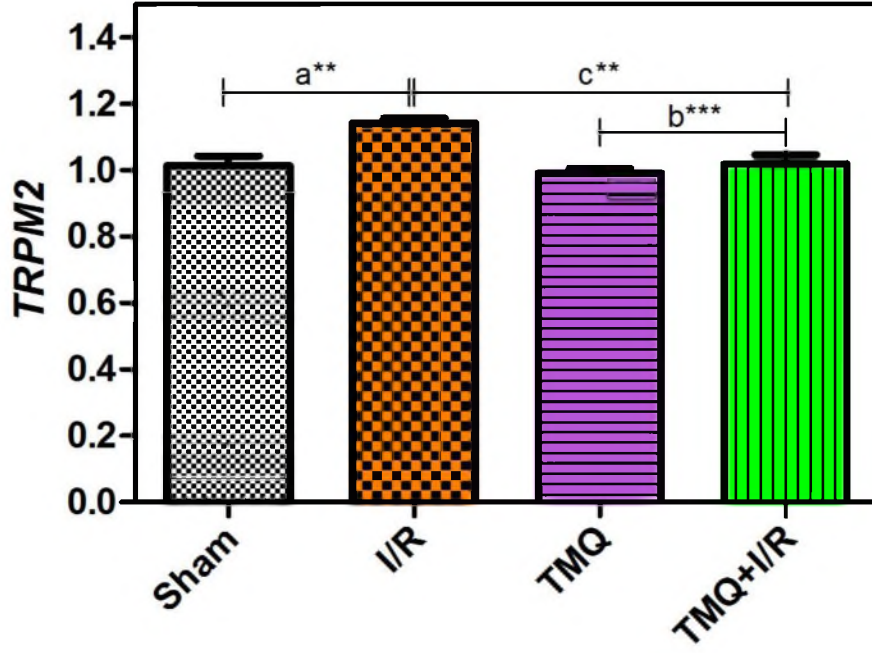
Real Time PCR sonucu agaroz jelde yürütülen genlere ait oranlara bakılmış ve hangi genin artıp, hangisinin azaldığı değerlendirilmiştir. Sonuçlar değerlendirilmiş ve azalan, normal, artan şeklinde sayısal verileri çıkartılmıştır. Buna göre *TRPM2,6,7,8* gen ekspresyon düzeyleri tabloda gösterilmiş ve her genin ayrı ayrı gruplara göre ekspresyon düzeyleri grafikte gösterilmiştir. (Tablo 7) (Şekil 6) (Şekil 7) (Şekil 8) (Şekil 9).

İ/R grubuyla karşılaştırıldığında Tmq+İ/R grubunda *TRPM2,6,7,8* ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı saptandı (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.001$) (Tablo 7).

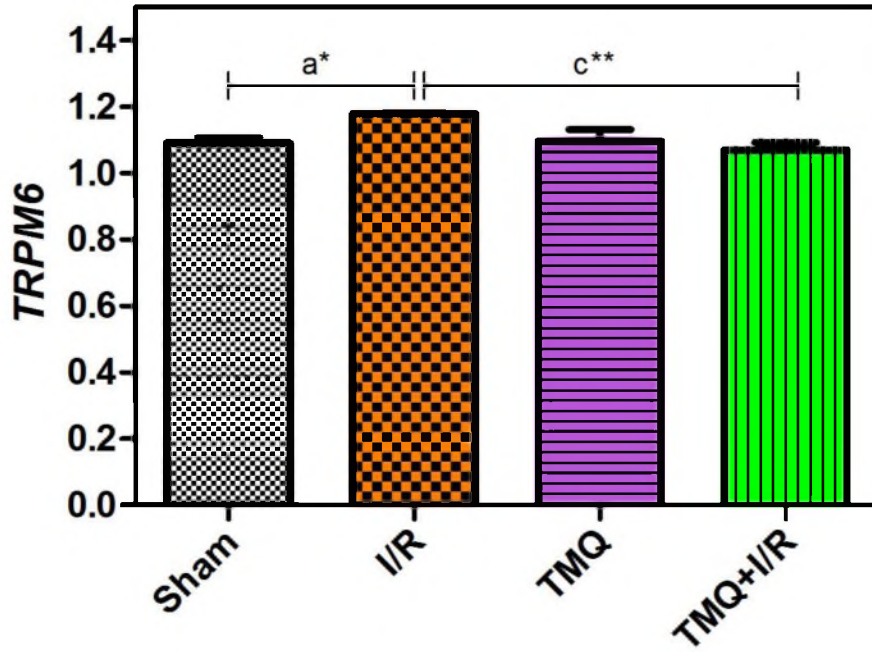
Çizelge 4.6. Gruplar arası gen normalizasyon değerleri (Ort±SH).

Gen	Sham	İ/R	Tmq	Tmq +İ/R
<i>TRPM2</i>	1,014±0,028	1,143±0,013 ^{a**}	0,991±0,014 ^{b***}	1,020±0,026 ^{c**}
<i>TRPM6</i>	1,092±0,015	1,180±0,001 ^{a*}	1,097±0,034	1,071±0,022 ^{c**}
<i>TRPM7</i>	1,138±0,024	1,282±0,014 ^{a***}	1,148±0,019 ^{b***}	1,150±0,008 ^{c***}
<i>TRPM8</i>	1,102±0,010	1,230±0,012 ^{a***}	0,982±0,028 ^{b***}	0,992±0,011 ^{c***}

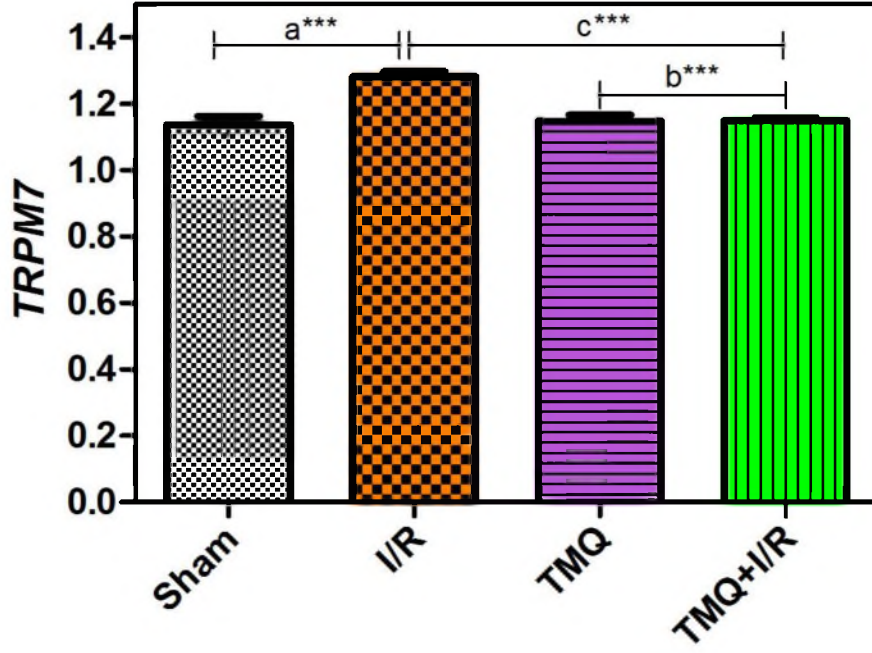
Ort±SH, İ/R: İskemi Reperfüzyon, *: <0.05; **: <0.01; ***: <0.001
a: Sham vs İ/R, b: Tmq vs Tmq + İ/R, c: İ/R vs Tmq + İ/R



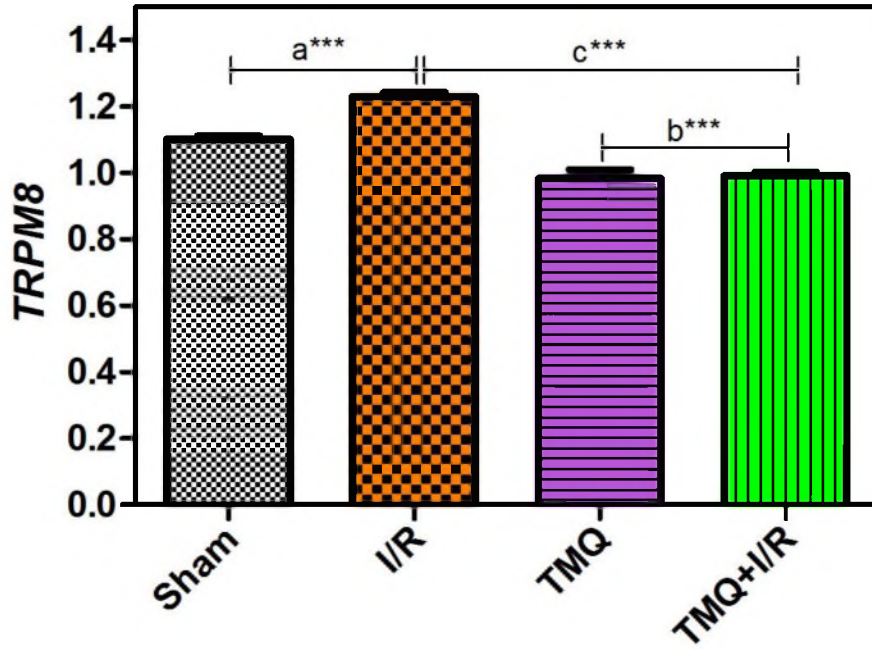
Şekil 4.5. Gruplar arası *TRPM2* gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması (a: Sham vs I/R, b: Tmq vs Tmq + I/R, c: I/R vs Tmq + I/R).



Şekil 4.6. Gruplar arası *TRPM6* gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması (a: Sham vs I/R, b: Tmq vs Tmq + I/R, c: I/R vs Tmq + I/R).



Şekil 4.7. Gruplar arası *TRPM7* gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması (a: Sham vs İ/R, b: Tmq vs Tmq + İ/R, c: İ/R vs Tmq + İ/R).



Şekil 4.8 Gruplar arası *TRPM8* gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması (a: Sham vs İ/R, b: Tmq vs Tmq + İ/R, c: İ/R vs Tmq + İ/R).

5. TARTIŞMA

Hepatik iskemi modellerinde ortaya çıkan iskemik karaciğer hasarı ve sonrasında oluşan reperfüzyon hasarını önleme veya minimize edilmesi konusunda farklı birçok ajan kullanılarak deneysel çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar büyük oranda antioksidan ve antiinflamatuvar maddelerin etkilerini incelemek amacıyla hazırlanmıştır. Bu durum oluşan hasarın antioksidan ve antiinflamatuvar maddeler kullanılarak azaltılabileceğini göstermektedir.

Bu amaçla enzimatik ve bitkisel kaynaklı antioksidanların oksidatif hasara karşı koruyucu etkileri deneysel çalışmalarla araştırılmıştır. Özden ve ark. (1996) yaptıkları çalışma sonucunda pentoksifilin ve L-arginin'in karaciğer İ/R hasarında koruyucu etkisinin olabileceğini göstermiştir. Uz ve ark. (2002) E vitamini ve kafeik asit fenetil ester (Cape)'in karaciğer İ/R hasarı üzerine koruyucu etkisi araştırmış ve dokuda glikoz ve pentoz fosfat yolunun bütünlüğünü koruyup, strik asit siklusunu aktif tutarak enerji üretimini destekleyerek hasarı azalttığını belirlemişlerdir. Arabacı S. ve ark. (2011) Sumak uygulamasının 200 mg.kg dozunun karaciğer İ/R hasarından önce, intraperitoneal olarak uygulandığında, karaciğer üzerine koruyucu etkili olduğunu ortaya koymuştur. Şehirli ve ark. (2008)'nin yaptıkları çalışmada, üzüm çekirdeği ekstresi tedavisinin sıçanlarda hepatik iskemi reperfüzyon hasarını azalttığı saptanmıştır. Üzüm çekirdeği ekstresinin HI ile indüklenen organ hasarını, oksidan-antioksidan dengesindeki etkisi ile nötrofil infiltrasyonunu inhibe ederek ve inflamatuvar mediyatörlerin salınımını düzenleyerek azalttığı saptanmıştır. Güreş ve ark. (2012)'nin yürüttükleri çalışmada, sıçanlarda karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında papaverinin etkisi incelenmiş olup, yapılan değerlendirme sonucu, parankimdeki fokal nekroz ve hidropik şişme hariç diğer tüm ölçütlerde çalışma grubundaki sıçanların kontrol grubunda yer alanlara nazaran iskemi reperfüzyon hasarını anlamlı derecede azalttığı saptanmıştır. Badary ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada Tmq'nun güçlü bir antioksidan etkisi olduğunu ve bu etkiyi serbest radikalleri toplayabilme özelliğinden ötürü gerçekleştirdiğini göstermişlerdir. Bundan dolayı biz de çalışmamızda, karaciğer İ/R hasarı modelinde antioksidan etkinliği kanıtlanmış olan timokinonun etkinliğini araştırdık.

Timokinon, sıçanlarda deneysel olarak yapılan birçok çalışmada çok çeşitli doz aralıklarında ve doz sayılarında kullanılmıştır. Abd El-Ghany ve ark. (2009) hepatik iskemi reperfüzyon hasarı oluşturmak için deney esnasında 45 dk iskemi, 60 dk reperfüzyon süresini tercih etmişlerdir. Ayrıca deneklere 10 gün boyunca 5, 20 ve 50 mg/kg doz vererek Tmq'nun antiapoptotik etkisini tespit etmişlerdir. El-Abhar ve ark. (2003) yürüttükleri çalışmada 5, 20, 50 ve 100 mg/kg doz vererek Tmq'nun İ/R hasarı üzerin anlamlı etkiye sahip olduğunu, öte yandan yüksek dozun (50 ve 100 mg/kg) ciddi bir şekilde reperfüzyon sonrası GSH içeriğini azalttığını tespit etmiştir. Biz de uygulama öncesi 10 gün süreyle 50 mg/kg dozda Timokinonun oral olarak verilmesinin hepatik İ/R hasarını önleyebileceğini gösterdik. Bu etkinin muhtemelen timokinonun oksidatif stresi azaltıcı etkinliğinin yanında karaciğerde TNF-a, IL-6 seviyelerini ve *TRPM* gen ekspresyon düzeylerini azaltarak gösterdiğini düşünmekteyiz.

İskemi süresi kişisel tercihe göre değişmekle beraber, uygulanan iskemi ve reperfüzyon süreleri açısından, deneysel modeller farklı uygulamalar bulunmaktadır. Bayramoğlu ve ark. (2013) karaciğer hasarı için gerekli sürenin 45 dakika iskemi sonrası bir saatlik reperfüzyon olduğunu ifade etmişlerdir. Yıldız ve ark. (2008) intraperitoneal timokionun karaciğer iskemi reperfüzyon üzerine etkisini araştırmış. Uygulama 45 dk iskemi, 60 dk reperfüzyon ile sağlanmıştır. Kim ve ark. (2007) yaptıkları araştırmada 60 dk iskemi 45 dk. reperfüzyon ile oluşturdukları karaciğer iskemi reperfüzyon modelinde propofolün etkisini göstermişlerdir. Çağlıkülekcı ve ark. (2005) Melatonin etkisini araştırmak üzere 45 dk. İskemi ve 45 dk. Reperfüzyon süresi ile oluşan hepatik iskemi reperfüzyon tablosu üzerinde çalışmışlardır. Yapılan bu çalışmada da bu verilerden yola çıkarak hepatik İRH oluşumunun biyokimyasal, histopatolojik olarak ve gen ekspresyonunun tespit edilmesi üzerine 45 dk. iskemi ve 45 dk. reperfüzyon planlandı ve deneysel model bu çerçevede uygulandı.

İ/R hasarı sonrası karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmek için farklı teknikler kullanılmıştır. Güncel olarak en çok kullanılan AST, ALT ve LDH tayinidir. Yabe ve ark. (2001) deneysel karaciğer İR hasarı oluşturdukları çalışmada serum AST ve ALT değerlerinin yükseldiğini ve İ/R sonrası meydana gelen serbest radikallerin dokuda meydana getirdiği hasarın bu değerlerin yükselmesine sebep olabileceğini idda etmişlerdir. Inglot ve ark. (2002) karaciğer üzerindeki İR çalışmasında serum AST ve ALT değerlerinin artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bunun yanı sıra hepatositlerde nekroz,

sinuzoidal genişleme ve PMNL infiltrasyonu gözlemişlerdir. Yıldırım ve ark. (2002) ise, sıçanlarda KC IR sonrası serum AST ve ALT değerlerinde artma gözlemişlerdir. Bizim çalışmamızda, karaciğer hasarının göstergeleri olan biyokimyasal parametrelerden AST, ALT, GGT, LDH ve karaciğer İR'nin uzak organ böbrek üzerindeki etkisinin göstergeleri kreatinin ve üre seviyelerine bakıldı. AST, ALT, GGT, LDH, kreatinin ve üre seviyeleri kontrol, yalancı cerrahi, Tmq ve Tmq+İ/R gruplarıyla karşılaştırıldığında İ/R grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p<0.05$). İ/R grubunun plazma TNF- α ve İL-6 düzeyleri, kontrol ve sham grubunun düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş ($P<0.001$); İ/R protokolünden 10 gün önce Tmq uygulanan Tmq+İ/R grubunda ise bu düzey İ/R grubunun değerlerine kıyasla azalmıştır ($P<0.001$). İ/R protokolünden 10 gün önce Tmq uygulanan grupta plazma sitokin düzeylerinin kontrol ve sham gruplarındaki düzeylere yaklaştığı gözlemlenmiştir. Bu durum bize Tmq'nin karaciğer doku hasarını anlamlı olarak azaltabileceğini düşündürmektedir.

İ/R'ye maruz kalmış hücrede Ca^{+2} konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir. Ca^{+2} konsantrasyonunun hücre içi anormal artışı, mekanizması tam olarak açıklanamayan bir şekilde sitotoksik etkiye neden olur. Hücre içi Ca^{+2} 'nin miktarının belirlenmesinde rol alan yapılardan biri de *TRPM* kanallarıdır. *TRPM* kanallarının apoptozis gibi birçok mekanizmaların işleyişinde görev aldıkları tespit edilmiştir. Bu durum bazı *TRPM* kanallarının hücre bölünmesinde etkin rol olması sayesinde sağlandığı anlaşılmıştır. İskemi sırasında Ca^{+2} artışı ile ilgili bazı hipotezler vardır. İskemik hasar sonrası hücre bölünmek zorundadır ve apoptozis veya otofajiye gidecek eski hücrede bu bölünme için Ca^{+2} ve Mg^{+2} ihtiyaç olacaktır. Bunun yanı sıra Ca^{+2} artışı mikro fibrillerin oluşumunu tetiklemektedir. Bu durum sonucunda Ca^{+2} , travma ortamından göç etmek için; mikrofibrillerin yıkımı ve tekrar yapılması için gereklidir. Bu durumda hücrede moleküler olarak meydana gelen öncelikli değişiklik *TRPM* kanallarının sayıca artmasıdır. Reperfüzyon esnasında *TRPM* miktarındaki azalmanın esas nedeni iskemi sırasındaki hücrelerdeki reaksiyonların gerçekleşmesi için gerekli olan Ca^{+2} hücre içerisine alınmasını sağlamaktır. Reperfüzyonda iskeminin ortadan kalktığını gösteren değişikliklerden dolayı *TRPM* ekspresyonu azalmaktadır. İ/R hasarına uğramış dokularda bu tablo öncesinde, Ca^{+2} kanal blokeri verilecek olursa İ/R'nun meydana getireceği negatif tablonun ortadan kaldırılmasını sağlayacaktır. Bizim çalışmamızda tedavi amacıyla verdiğimiz timokinonun, İ/R hasarında *TRPM* kanalları üzerinden etki edebileceği görüldü. İ/R grubuna göre timokinon+İ/R

grubunda *TRPM2,6,7,8* ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı saptandı.

Karaciğerde İ/R'ye neden olan hastalıklarda (hipovolemik şok, kronik karaciğer hastalıkları, büyük tümör rezeksiyonları, hepatik travmaya cerrahi müdahale, vasküler rekonstrüksiyonlar ve hepatiktransplantasyon vs.) tedavide Timokinonun verilmesi hem iskemi ve apoptozis hem de karaciğerle ilişkili hastalıkların tedavisinde kullanıma girmesi açısından sonuçlarımızın klinik çalışmalarla doğrulanmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca çalışmamızda timokinonun *TRPM2,6,7,8* gen ekspresyon seviyesini azaltarak, Ca^{+2} 'nin hücre içine girişini engelleme yönünde etki ettiğini gösterdik. Bu durum timokinon'un İ/R'ye bağlı hücrel hasarı azaltıcı yönde etki ettiği düşüncesini akla getirmektedir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamızda karaciğer iskemi reperfüzyon modelinde ortaya çıkan hasarın Timokinon tedavisi ile biyokimyasal ve histopatolojik olarak düzeldiğini ve bu duruma oksidatif stres parametrelerinin azalmasının ve TRPM kanallarının aracı olabileceği düşünmekteyiz. Sonuçlarımızın klinik çalışmalarla desteklenerek doğrulanmasına ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. **Abu-Amara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B et al.** Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks—a review. *Liver Transpl* **2010**, 16:1016-32.
2. **Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Tharakan ST, Sung B (2008).** Anand P Potential of Spice-Derived Phytochemicals for Cancer Prevention. *Planta Med Epubahead Res*, 17, 299-305.
3. **Al-Jassir MS.** Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds growing in Saudi Arabia. *Food Chemistry*. **1992**; 45: 239-242.
4. **Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM.** The role of the complement system in ischemia- reperfusion injury. *Shock***2004**, 21:401-9.
5. **Badary OA, Taha RA, Gamal el-Din AM, Abdel-Wahab MH.** Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol*. **2003**;26:87-98.
6. **Bayramoglu G, Bayramoglu A, Engur S.** The hepatoprotective effects of *Hypericum perforatum* L. on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Cytotechnology*. **2013** Jun 23.
7. **Benzie I.F, Strain J.J.** Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* **1999**,299:15-27.
8. **Birrer R, Takuda Y, Takara T.** Hypoxic hepatopathy: pathophysiology and prognosis. *Intern Med***2007**, 46:1063-70.
9. **Bless NM, Warner RL, Padgaonkar VA, et al.** Roles for C-X- C chemokines and C5a in lung injury after hindlimb ischemia-reperfusion. *Am J Physiol***1999**, 276(1):L57-63.
10. **Bozkurt S.** Hepatik İskemi-Reperfüzyon Modelinde Adrenomedullin ve Adrenomedullin Bağlayıcı Protein-1 Kombinasyonunun Akut Akciğer ve Karaciğer Hasarı Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi*,**2009**.
11. **Cetinkale O, Bilgic L, Bolayirli M, Sengul R, Ayan F et al.** Involvement of neutrophils in ischemia reperfusion injury of inguinal island skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg* **1998**, 102:153-160.
12. **Charles D, Collard MD, Simon Gelman MD.** Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Preventio of ischemia-Reperfusion injury. *Anesthesiology* **2001**, 94:1133-8.
13. **Clapham DE.** TRP channels as cellular sensors. *Nature*, **2003**;426:517-524.
14. **Çağlıküleççi, Mehmet, et al.** "Lipopolisakkarid İle Uyarılmış Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı Oluşturulan Deneklerde bir iNOS İnhibitörü olan Aminoguanidin Uygulanmasının Karaciğer Doku ve Kan Lipid Peroksidasyonuna Etkisi." *www. hpb. org. tr* (**2005**): 70.
15. **De GH, Rauen U.** Ischemia-reperfusion injury: processesin pathogenetic networks: a review. *Transplant Proc***2007**, 39:481-4.
16. **Efkan, U. Z., et al.** "Deneysel Karaciğer İskemi-Reperfüzyon Oluşturulan Sıçanlarda E Vitamini ve Kafeik Asit Fenetik Ester'in (CAPE) Metabolik Enzimlere Etkileri." *Ege Tıp Dergisi*41.2 (**2002**).
17. **El-Abhar, H. S., D. M. Abdallah, and S. Saleh.** "Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats." *Journal of Ethnopharmacology*84.2 (**2003**): 251-258.
18. **El-Ghany, R., et al.** "Thymoquinone triggers anti-apoptotic signaling targeting death ligand and apoptotic regulators in a model of hepatic ischemia reperfusion injury." *Drug Discov Ther* 3.6 (**2009**): 296-306..
19. **Erel O.** A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry* **2005**, 9:1-9.
20. **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.
21. **Erol MK.** Yoğun bakım hastalarında propofol, deksmedetomidin ve midazolam infüzyonlarının sedasyon, oksidan – antioksidan sistem üzerine etkilerinin karşılaştırılması. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi. Şanlıurfa **2011**.
22. **Farmer DG, Amersi F, Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW.** Current status of ischemia and reperfusion injury in the liver. *Transplant Rev* **2000**, 14:106-26.
23. **Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW.** Hepatic ischemia/reperfusion injury - a fresh look. *Exp Mol Pathol*.**2003**, 74:86–93.

24. **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.
25. **Grimm, C., Kraft, R., Sauerbruch, S., Schultz, G., and Harteneck, C. (2003).** Molecular and Functional Characterization of the Melastatin-Related Cation Channel Trpm3, *J Biol Chem*, 278:21493-501.
26. **Guyton AC, Hall JE.** *Textbook of medical physiology*. The liver as an organ. 9. edition, Philadelphia: WB Saunders company, **1996**, 883-88.
27. **Halliwell B, Gutteridge JMC.** *Free Radicals in Biology and Medicine* (3rd ed.) Oxford University Press, New York, **1999**.
28. **Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida et al. (2002).** Ltrpc2 Ca²⁺-Permeable Channel Activated by Changes in Redox Status Confers Susceptibility to Cell Death, *Mol Cell*, 9:163-73.
29. **Harma M, Erel O:** Oxidative stres in women with preeclapsia. *Am J Obstet Gynecol.* **2005**; 192: 656-657.
30. **Hasegawa T, Ito Y, Wijeweera J, et al.** Reduced inflammatory response and increased microcirculatory disturbances during hepatic ischemia reperfusion injury in steatotic livers of ob/ob mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2007**;292:1385-95.
31. **Hirsch J, Niemann CU, Hansen KC, et al.** Alterations in the proteome of pulmonary alveolar type II cells in the rat after hepatic ischemia-reperfusion. *Crit Care Med* **2008**,36:1846-54.
32. **Inglott S, Ferdinand, Virlos T Loannis, Habib A Nagy, Williamson CN, Robin et al.** Adenosine preconditioning, attenuates hepatic reperfusion injury in the rat by preventing the down regulation of endothelial nitirc oxide synthase *BMC Gastroenterology* **2002**, 2;22:1-6.
33. **Jaeschke H.** Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* **2000**, 15:718-24.
34. **Jang JH, Kang KJ, Kang Y, Lee IS, Graf R, Clavien PA.** Ischemic preconditioning and intermittent clamping confer protection against ischemic injury in the cirrhotic mouse liver. *Liver Transpl* **2008**,14:980-8.
35. **Jennings RB, Reimer KA.** The cellbiology of acutemyocardialischemia. *AnnuRevMed* **1991**,42:225-246.
36. **Keen LJ.** The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. *Transpl Immunol* **2002**, 10:143-6.
37. **Kim YI.** Ischemia-reperfusion injury of the human liverduring hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **2003**, 10:195-9.
38. **Kim, Seong-Ki, et al.** "Effects of propofol on early phase of warm hepatic ischemia/reperfusion injury." *Hepato-gastroenterology* 54.80 (2007): 2333-2336.
39. **Kraft, R. and Harteneck, C. (2005).** The Mammalian Melastatin-Related Transient Receptor Potential Cation Channels: An Overview, *Pflugers Arch*, 451:204-11.
40. **Kupiec-Weglinski JW, Busuttill RW.** Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. *Transplant Proc* **2005**, 37:1653-56.
41. **Lee, N., Chen, J., Sun, L., Wu, S., Gray, K. et al. (2003).** Expression and Characterization of Human Transient Receptor Potential Melastatin 3 (hTrpm3), *J Biol Chem*, 278:20890-7.
42. **Liu TZ, Lee KT, Chern CL, Cheng JT, Stern A et al.** 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.
43. **M. A. Randhawa, O. M. Alaklobi, S. H. M. Ajabre et al.,** "Thymoquinone, an active principle of Nigella sativa, inhibited Fusarium solani," *Pakistan Journal of Medical Research*, vol. 44, no. 1, pp. 1–3, **2005**.
44. **M. Burits and F. Bucar,** "Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil," *Phytotherapy Research*, vol. 14, no. 5, pp. 323–328, **2000**.
45. **M. H. Boskabady and B. Shirmohammadi,** "Effect of Nigella sativa on isolated guinea pig trachea," *Archives of Iranian Medicine*, vol. 5, no. 2, pp. 103–107, **2002**.
46. **Majino G, Jorris I.** Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of the cell death. *Am. J. Pathol.* **1995**, 146: 3-9
47. **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.
48. **Montalvo EE, Escalante T, Pina E, Geller DA.** Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* **2008**, 147:153-9.

49. **Monteilh-Zoller, M. K., Hermosura, M. C., Nadler, M. J., Scharenberg, A. M., Penner, R. et al (2003).** Trpm7 Provides an Ion Channel Mechanism for Cellular Entry of Trace Metal Ions, *J Gen Physiol*, 121:49-60.
50. **Murry, C.E., Jennings, R.B., Reimer, K.A.:** Preconditioning with ischemia: adelay of lethal cell injury in ischemic myocardium, *Circulation*; 74, 1124, **1986**
51. **N. M. Morsi,** "Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria," *Acta Microbiologica Polonica*, vol. 49, no. 1, pp. 63–74, **2000**.
52. **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.
53. **Nilius, B., Prenen, J., Janssens, A., Owsianik, G., Wang, C. et al. (2005).** The Selectivity Filter of the Cation Channel Trpm4, *J Biol Chem*, 280:22899-906 210.
54. **Nohl H, Gille L, Kozlov A, Staniek K.** Are mitochondria a spontaneous and permanent source of reactive oxygen species? *Redox Rep* **2003**, 8:135-41.
55. **O. A. Badary and A. M. Gamal El-Din,** "Inhibitory effects of thymoquinone against 20-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis," *Cancer Detection and Prevention*, vol. 25, no. 4, pp. 362–368, **2001**.
56. **Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P.** Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol* **1992**, 32 Suppl:33-42
57. **Özden A, et al.** "Ratlarda 60 Dakika Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarında Pentoksifilin ve L-Arginin'in Koruyucu Etkisi." *Türk Cerrahi Dergisi*12.4 (**1996**).
58. **Özkaya FC, Koçdor H.** İskemi-Reperfüzyon ve Kanser Metastazı: Biyokimyasal Bakış: Derleme. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, Cilt 22, Sayı 2, (Mayıs) **2008**, S:89-98.
59. **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.
60. **Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH.** Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* **2009**,22:46-55.
61. **Pine JK, Aldouri A, Young AL, et al.** Liver transplantation following donation after cardiac death: an analysis using matched pairs. *Liver Transpl* **2009**, 15:1072-82.
62. **Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller S, Nolan D et al.** The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *Am J Surg* **1999**, 178:147-150.
63. **Qiao YL, Qian JM, Wang FR, Ma ZY, Wang QW.** Butyrate protects liver against ischemia reperfusion injury by inhibiting nuclear factor kappa B activation in Kupffer cells. *J Surg Res*. 2013 Sep 20. pii: S0022-4804(13)00832-9. doi: 10.1016/j.jss. **2013**.08.028. [Epub ahead of print].
64. **Rushing GD, Britt LD.** Reperfusion injury after hemorrhageca collective review. *Ann Surg* **2008**, 247:929-37.
65. **Aljabre S. H. M., Randhawa M. A., Akhtar N., Alakloby O. M., Alqurashi A. M. et al.** "Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 101, no. 1–3, pp. 116–119, **2005**.
66. **Selzner M, Selzner N, Jochum W, Graf R, Clavien PA.** Increased ischemic injury in old mouse liver: an ATP-dependent mechanism. *Liver Transpl* **2007**,13:382-90.
67. **Sutton HC, Winterbourn CC.** On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Radic Biol Med* **1989**, 6:53-60.
68. **Suzuki S, Nakamura S, Koizumi T, Sakaguchi S, Baba S, et al.** The beneficial effect of a prostaglandin I2 analog on ischemic rat liver. *Transplantation*. **1991**, 52(6):979–83.
69. **Şener G, Yegen BÇ.** İskemi Reperfüzyon Hasarı, http://www.klinikgelisim.org.tr/kg22_3/2.pdf 20.10.2010.
70. **Takezawa, R., Schmitz, C., Demeuse, P., Scharenberg, A. M., Penner, R., et al. (2004).** Receptor-Mediated Regulation of the Trpm7 Channel through Its Endogenous Protein Kinase Domain, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:6009-14.
71. **Ullrich, N. D., Voets, T., Prenen, J., Vennekens, R., Talavera, K. et al (2005).** Comparison of Functional Properties of the Ca²⁺ Activated Cation Channels Trpm4 and Trpm5 from Mice, *Cell Calcium*, 37:267-78.
72. **Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M et al.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **2007**,39:44-84.
73. **Voets, T., Janssens, A., Droogmans, G., and Nilius, B. (2004).** Outer Pore Architecture of a Ca²⁺-Selective Trp Channel, *J Biol Chem*, 279:15223-30.
74. **Weight SC, Bell PRF, Nicholson ML.** Renal ischemia-reperfusion injury. *Brit J Surg* **1996**,83:162-170

75. **Weinbroum AA, Kidron A, Hochhauser E, Hochman A, Rudick V et al.** Liver glutathione level influences myocardial reperfusion injury following liver ischemiareperfusion. *Med Sci Monit* **2001**, 7:1137-44.
76. **Yabe Y., Kobayashi N., Nishihashi T., Takahashi R., Nishikawa M. et al.:** Prevention of neutrofil-mediated hepatic ischemia-reperfusion injury by Superoxide dismutase and Catalase derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**; 298: 894- 99.
77. **Yildirim S, Tok H, Koksall H, et al.** Allopurinol plus pentoxifilline in hepatic ischaemia/reperfusion injury. *Asian J Surg* **2002**;25:149.
78. **Yildiz, Fahrettin, et al.** "Nigella sativa relieves the deleterious effects of ischemia reperfusion injury on liver." *World journal of gastroenterology: WJG*14.33 (2008): 5204.
79. **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.
80. **Zhang, L. and Barritt, G. J. (2004).** Evidence That Trpm8 Is an Androgen Dependent Ca²⁺ Channel Required for the Survival of Prostate Cancer Cells, *Cancer Res*, 64:8365-73.
81. **Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Cook, B. et al. (2003).** Coding of Sweet, Bitter, and Umami Tastes: Different Receptor Cells Sharing Similar Signaling Pathways, *Cell*, 112:293-301.
82. **Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusioninjury.** *SurgClin North Am* 72: 65-83; **1992**

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Elazığ'da doğdu. 2008 yılında Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon bölümünü kazandı ve 2012 yılında mezun oldu. Aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fizyoloji Anabilim Dalı'nda açılan sınavı kazanarak yüksek lisansa başladı.