



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KARACİĞER İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA  
SİLYMARİN VE REDÜKTE GLUTATYONUN KORUYUCU  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Dilara ALİYEVA**

**Samsun  
EKİM – 2017**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KARACİĞER İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA  
SİLYMARİN VE REDÜKTE GLUTATYONUN KORUYUCU  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Dilara ALİYEVA**

**Danışman  
Prof. Dr. Ramazan AMANVERMEZ**

**Samsun  
EKİM – 2017**

## TEŞEKKÜR

Başta doktora tez çalışmamı yöneten, çalışmamın her aşamasında engin bilgilerini esirgemeyen, tezimin yapılmasında ve ilerlemesinde bana yol gösteren, her zaman beni destekleyen, saygıdeğer Hocam Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ramazan Amanvermez'e tüm samimiyetimle teşekkür ederim.

Ayrıca Tez İzleme komitesinde yer alan, tez çalışmamda cerrahi bilgilerini benimle paylaşan, yardımlarını ve önerilerini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Kağan Karabulut'a teşekkür ederim.

Sayın Yrd. Doç. Dr. Seda Gün'e, tez çalışmamın histopatolojik inceleme aşamasında yardımcı olduğu ve katkılarını esirgemediği için teşekkür ederim.

Asistan arkadaşım Dr. Gülçin Elmas Erdoğan'a, tezimin istatistiksel analizinde bana yardımcı olduğu ve her zaman gösterdiği güleryüzü için teşekkür ederim.

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yaptığım doktora eğitim süresince bana emeği geçen, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren Sayın Doç. Dr. Birşen Bilgici'ye, Doç. Dr. Bahattin Avcı'ya ve Doç. Dr. Özgür Korhan Tunçel'e teşekkürlerimi sunarım.

Arkadaşım, yüksek lisans öğrencisi Kadriye Bardak'a tez dönemimde yaptığı yardımlar için teşekkür ederim. Bu süreçte destekleri ve güleryüzleri için bölüm çalışanları Neslihan Orgen, Fulnur Onar ve Fatma Yiğit'e teşekkür ederim.

Tanıştığımız günden itibaren iyi ve kötü günümde daima yanımda olan, hem arkadaşım hem canım kardeşim Gumral Alakbarova'ya minnettarım.

Her zaman hayatımda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, bana güvenip ve inandıkları için canım aileme şükranlarımı sunarım.

Hayatıma anlam katan, varlığıyla renk veren ve tez çalışmamın her aşamasında tüm zorlukları benimle göğüsleyen can yoldaşım Kamran Alakbarli'ya sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, bu çalışma PYO. TIP. 1904.17.004 proje numarası ile OMÜ Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından desteklendiği için teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

### KARACİĞER İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA SİLYMARİN VE REDÜKTE GLUTATYONUN KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

**Amaç:** Karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarı karaciğer fonksiyonlarında ve karaciğer dokusunda bozulmalara neden olabilir. Bu nedenle, karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarına karşı hepatoprotektif ajanlara- maddelere ihtiyaç duyulmaktadır. Tez amacına yönelik olarak, hepatoprotektif olduğunu düşündüğümüz silymarin ve redükte glutatyonun karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarında koruyucu olup olmadıklarını değerlendirmek için bu deneysel çalışma planlandı.

**Materyal ve Metot:** Çalışmamızda toplam 50 erişkin erkek rat 5 gruba (n=10) ayrılarak gruplar (Sham, İR, SM-İR, GSH-İR ve SM+GSH-İR) oluşturuldu. Sham grubunda ratlarda iskemi-reperfüzyon oluşturulmadan, batin açıldı ve kapatıldı. İR grubunda karaciğerde 30 dk iskemi oluşturuldu ve reperfüzyon süresi 24 saate kadar devam ettirildi. SM-İR, GSH-İR ve SM+GSH-İR gruplarına iskemi-reperfüzyondan 60 dk önce sırasıyla 100 mg/ kg silymarin, redükte glutatyon ve her ikisinin karışımı intraperitoneal olarak uygulandı. Deneysel çalışmanın 24. saatinde tüm ratlardan kan örnekleri ve karaciğer dokusu alındı, daha sonra ratlar sakrifiye edildi.

**Bulgular:** Karaciğer iskemi-reperfüzyon öncesi silymarin, redükte glutatyon ve silymarin + glutatyon uygulaması iskemi-reperfüzyon ile indüklenen transaminaz artışlarını ve hepatik iskemi-reperfüzyonun geç fazında karaciğer histopatolojik hasar skorlarını anlamlı olarak azalttı. Ayrıca, iskemi-reperfüzyon hasarı öncesi silymarin + glutatyon uygulaması serum TNF- $\alpha$ , MPO ve TBARS düzeylerindeki azalmalarla gösterildiği gibi enflamatuar kaskadları ve oksidatif stresi anlamlı olarak baskıladı.

**Sonuç:** Karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarı gelişmeden önce uygulanan silymarin ve redükte glutatyon tedavisi oksidatif stresi ve enflamasyon yanıtı baskılayarak hepatik hasarları hafifletebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Silymarin; glutatyon; karaciğer iskemi-reperfüzyon; hepatik hasar

**Dilara ALİYEVA, Doktora Tezi**  
**Öndokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Ekim -2017**

## ABSTRACT

### THE INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECTS OF SILYMARIN AND REDUCED GLUTATHIONE IN HEPATIC ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY.

**Aim:** Hepatic ischemia-reperfusion injury compromises liver function and may lead to harmful effects on liver parenchyma. For this reason, therapeutic strategies require improving in a new pharmacological agent/substances for controlling hepatic ischemia-reperfusion injury in the relevant surgical interventions as a hepatoprotective agent. The aim of this experimental study was examined whether silymarin and reduced glutathione may diminish or prevent hepatic ischemia-reperfusion damage in a liver ischemia-reperfusion rat model using biochemical and pathological findings.

**Material and Method:** 50 male rats used in our study randomly separated into 5 groups as follows: Sham, IR, SM-IR, GSH-IR and SM+GSH-IR groups (n=10). In Sham group, rats' abdomen was opened and closed without ischemia-reperfusion. In the IR groups, hepatic ischemia-reperfusion injury was performed in normally-fade rats treated with silymarin (100mg/kg), reduced glutathione (100mg/kg) and mixed silymarin plus glutathione (100mg/kg) 60 min before ischemia-reperfusion or without silymarin and glutathione, then 30 min ischemia, followed by reperfusion. After 24 h, blood and liver specimens were taken for biochemical and pathological assessments and then rats were sacrificed by exsanguination.

**Results:** Pretreatment with silymarin, reduced glutathione and silymarin plus glutathione before ischemia-reperfusion significantly decreased ischemia-reperfusion induced elevations of transaminases (ALT, AST), and significantly reduced the histopathological damage scores of the liver in the late phase of hepatic ischemia-reperfusion injury. In addition, silymarin plus glutathione prior to ischemia-reperfusion injury significantly suppressed inflammatory cascades and oxidative stress as demonstrated by attenuations in TNF- $\alpha$ , MPO and TBARS, respectively.

**Conclusion:** The treatment with silymarin and reduced glutathione prior to the development of hepatic ischemia-reperfusion injury may attenuate hepatic insults through suppressing oxidative stress and inflammatory response.

**Keywords:** Silymarin; glutathione; liver ischemia-reperfusion; hepatic damage

Dilara ALIYEVA, PhD Thesis  
Ondokuz Mayıs University - Samsun, October -2017

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP: adenzin difosfat

ALT: alanin amino transferaz

AMP: adenzin monofosfat

AST: aspartat amino transferaz

ATP: adenzin trifosfat

Ca<sup>2+</sup>: kalsiyum iyonu

DAMP: hasarlanma ilişkili moleküler biçimleri, damage-associated molecular pattern

DH: dentritik hücre

DNA: deoksiribonükleik asit

ENA78: epitelial nötrofil aktive edici protein-78, epithelial neutrophil activating protein-78

GPx: glutatyon peroksidaz

GSH: glutatyon

HIF1: hipoksiyle indüklenen faktör 1, hypoxia-inducible factor 1

HMGB1: yüksek mobiliteli grup boks 1, high mobility box 1

HSP: ısı şok proteini, heat shock protein

HUVEC: insan umbilikal ven endotel hücreleri, human umbilical vein endothelial cells

ICAM-1: intrasellüler adhezyon molekülü-1, intercellular adhesion molecule-1

İFN $\gamma$ : interferon gamma

İL-1: interlökin 1

İL-4: interlökin 4

İL-6: interlökin 6

İL-10: interlökin 10

İL-12: interlökin 12

İL-1 $\beta$ : interlökin 1 beta

İR: iskemi-reperfüzyon

KH: Kupffer hücreleri

LDL: düşük dansiteli lipoprotein

MDA: malonaldehit

MHC II: temel doku-uygunluğu bileşeni II, major histocompatibility complex II

MIP-2: makrofaj enflamasyon proteini-2, macrophage inflammatory protein-2

NADPH: nikotinamid adenin dinükleotid fostat

NF- $\kappa$ B: nükleer faktör-kapa beta

NO: nitrit oksit

MPO: miyeloperoksidaz

PAMP: patojen ilişkili moleküler biçimleri, pathogen-associated molecular pattern

PMNL: polimorfonükleer lökosit

SAPK: stresle aktive olan protein kinaz, stress-activated protein kinase

SEH: sinüzoidal endotel hücreleri

SOD: süperoksit dismutaz

SM: silymarin

TBARS: tiyobarbitürik asid-reaktif substansları (maddeleri)

TLR3: Toll benzeri reseptör 3

TLR4: Toll benzeri reseptör 4

TLR9: Toll benzeri reseptör 9

TNF- $\alpha$ : tümör nekrozis faktör alfa

VEGF: vasküler endotel büyüme faktörü, vascular endothelial growth factor





# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR .....</b>	<b>v</b>
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>3</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>5</b>
2.1. İskemi.....	5
2.2. Reperfüzyon .....	5
2.3. Karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisi .....	6
2.3.1. Oksidatif stres.....	7
2.3.2. Enflamasyon yanıt.....	10
2.3.3. İmmünojenik yanıt .....	14
2.3.4. İskemi-Reperfüzyon hasarında hücre ölümü.....	15
2.4. Silymarin.....	17
2.4.1. Farmakokinetik .....	19
2.4.2. Antioksidan özellikleri .....	19
2.4.3. Etki mekanizmaları ve fonksiyonları .....	20
2.4.4. Hepatoprotektif etkisi.....	22
2.5. Glutasyon.....	22
<b>3. MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>27</b>
3.1. MATERYAL .....	27
3.1.1. Deney hayvanları .....	27
3.1.2. Kullanılan cihazlar .....	27
3.1.3. Kullanılan kimyasallar .....	27
3.2. METOD .....	28
3.2.1. Deney hayvanlarının hazırlanması .....	28
3.2.2. Çalışma grupları .....	28
3.2.3. Silymarin çözeltisinin hazırlanması .....	29
3.2.4. Glutasyon çözeltisinin hazırlanması .....	29
3.2.5. Cerrahi işlem için ön hazırlık .....	29
3.2.6. İskemi reperfüzyon modelinin oluşturulması.....	29
3.2.7. İskemi süresinde takip.....	30
3.2.8. Reperfüzyon süresinde takip .....	31
3.2.9. Sakrifikasyon.....	31
3.2.10. Serumda ALT, AST ölçümü .....	32

3.2.11. Serumda MPO ölçümü .....	32
3.2.12. Serumda TBARS ölçümü.....	33
3.2.13. Serumda TNF- $\alpha$ ölçümü.....	35
3.2.14. Histopatolojik değerlendirme.....	37
3.2.15. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi .....	37
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>38</b>
4.1. Gruplarda serum ALT aktiviteleri.....	38
4.2. Gruplarda serum AST aktiviteleri.....	39
4.3. Gruplarda serum MPO düzeyleri .....	40
4.4. Gruplarda serumda TBARS düzeyleri .....	41
4.5. Gruplarda serumda TNF- $\alpha$ düzeyleri .....	42
4.6. Karaciğer dokusunun histopatolojik bulguları .....	45
4.7. Karaciğer dokusunun histopatolojik görüntüleri.....	47
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>51</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>56</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>57</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>65</b>

## 1. GİRİŞ

Bir organa kan akışının kesilmesi iskemiyeye neden olurken, sonradan damar blokajının açılarak yeniden dokunun kanlanması ise reperfüzyona yol açar (Chouchani ve ark., 2016).

İskemi-reperfüzyon (İR) hasarı bir organda iskemik (hipoksi) ve reperfüzyon durumu ile ilişkili olarak doku hasarına neden olur. Damar tıkanması ile ilişkili patolojik durumlar dahilinde İR hasarı beyin, karaciğer, kalp, akciğer, bağırsak, iskelet kası ve böbrek gibi çeşitli organ sistemlerinde ortaya çıkabilir.

Karaciğer İR hasarı, postoperatif morbidite, mortalite, iyileşme ve hastanın genel durumunu etkileyen, klinik uygulamada sık görülen major bir komplikasyondur. Yüksek enerji gereksinimi olan karaciğer oksijene oldukça bağımlıdır, hipoksiye veya anoksiye duyarlıdır. Karaciğer İR hasarı sıcak (çeşitli cerrahi girişimlerde) ve soğuk iskemi (organ naklinde) olarak kategorize edilebilir. Kupffer hücreleri (KH) ve nötrofillerin aktivasyonu, reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu, sitokinler, prostoglandinler ve kemokinlerin salınması, adhezyon moleküllerinin artmış ekspresyonu, İR hasarının her iki tipinde aktive olan immünolojik kaskadlardır. Bu mekanizmaların çeşitliliği, genel İR hasar patofizyolojisine farklı derecelerde katkıda bulunmaktadır (Fondevila ve ark., 2003; Papadopoulos ve ark., 2013; Zhai ve ark., 2013).

Milk Thistle (silymarin) ekstraktları alternatif tıp kapsamında yıllardır "karaciğer canlandırıcısı-güçlendiricisi" olarak kullanılmaktadır. Silymarin (SM), devedikenini (Milk Thistle) bitkisi (*Silybum marianum*) tohumunun özüdür. SM ekstraktı ve bileşenleri, biyolojik araştırmalarda çeşitli kanser hücrelerinin proliferasyonunun inhibisyonunu, hepatositler, makrofajlar ve nöronlar dahil olmak üzere birçok hücre tipindeki oksidatif stresin azaltılması, antiinflamatuvar ve diğer etkilerini içeren çok yönlü araştırmalara konu olmuştur (Hackett ve ark., 2013; Plyak ve ark., 2013).

Glutasyon (GSH) antioksidan etkisinin yanısıra, hücresel metabolizmada oksidasyon, konjügasyon ve hidroliz gibi birçok hücresel metabolik yollarda görev almaktadır (Lushchak VI, 2012). İnsan çalışmalarında ve hayvan deney modellerinde yapılan çalışmalarda, özellikle hepatositlerde GSH homeostazının önemli rol oynadığı ifade edilmektedir (Chen ve ark., 2013).

Bu bilgiler dahilinde, çalışmamız konusunu oluşturan karaciğer iskemi-reperfüzyon modelinde gelişen postoperatif hepatik hasarın patofizyolojik mekanizmalara yönelik tedavisinde, SM ve GSH'nun karaciğer İR hasarlarını önleyebileceğini düşünüyoruz.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İskemi

Kan akımının azalmasına ya da kesilmesine bağlı olarak, hipoksiye maruz kalan organlarda iskemi gelişmektedir. Bu durumda hücrelerde metabolizmanın yönü aerobikten anaerobik yöne değişir. Daha sonraki süreçte, hücresel enerji (adenozin 5'-trifosfat, ATP) tükenmesi ve toksik metabolitlerin birikimi, organ disfonksiyonuna yol açar. Oksidatif fosforilasyonun yavaşlaması, hücredeki enerji depoları (ATP ve fosfokreatin) tükenmesine neden olur. Böylece hücre membranında bulunan ATP-bağımlı Na<sup>+</sup> /K<sup>+</sup> pompası enerji yetmezliği nedeniyle bozulur. Akabinde membran potansiyeli, Na<sup>+</sup> iyon geçişi ve intrasellüler volüm artar. Dokularda laktik asit birikir ve asidoz oluşur. Aynı zamanda intrasellüler Ca<sup>+2</sup> düzeyi artmaktadır. İntrasellüler Ca<sup>+2</sup> düzeyinin artışı proteolitik enzimleri ve fosfolipazları aktive eder. Ayrıca, iskemi sürecinde adenzin nukleotid katobolizmasının aktifleşmesi, hücre içi hipoksantin birikimini ve ROT oluşumuna yol açar. Özellikle karaciğer iskemi tablosunda ROT Kupffer hücrelerini aktive eder, böylece sitokin üretimi yanı sıra ROT üretimi daha da hızlanmaktadır. Bu esnada, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) tarafından üretilen nitrit oksit (NO) düzeyleri azalır (süperoksit artı NO peroksinitrit oluşur), endotelin-1 ve NO üretimi arasında dengesizlik oluşarak sinüzoidlerin vazokonstriksüyona yol açar. Sinüzoidlerin daralması, nötrofillerin ve trombositlerin birikerek toplanmasına yol açar. Bundan dolayı hesapoteselüler apoptosiz ve nekrozis hızlanır ve hasar gelişir. Bu süreç ilerleyerek enflamatuar yanıt ile birlikte organ disfonksiyonuna sebep olur (Zummerman ve Granger, 1994; Michael ve Moore, 2004; Guan ve ark., 2014; Nastos ve ark., 2014).

### 2.2. Reperfüzyon

İskemik dokunun tekrar kanlanması, reperfüzyon olarak tanımlanır. Kan akımının yeniden başlaması dokunun oksijen ve diğer metabolik gereklerini karşılar, fakat dokuya toksik metabolitlerin dönmesi hasara neden olur. Oluşan hasar, iskemik hasardan daha fazladır. Yani İR hasarı, hipoksik organın tekrar oksijenlenmesinin ardından ortaya çıkan patolojik bir tablodur (Michael ve Moore, 2004). Ayrıca iskemiye maruz kalmış hücrenin yeniden kanlanması, hücre pH'nın normal yöne değişmesiyle ('pH paradoksu') proteolitik enzimlerin aktivasyonu, dokuya nötrofil infiltrasyonu ve

miyeloperoksidaz (MPO) aktivasyonu ile birlikte ROT oluşumu hücre hasarına neden olmaktadır.

### **2.3. Karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisi**

Karaciğerin cerrahi girişimleri ve transplantasyon sırasında sık görülen klinik tablolardan birisi de karaciğer İR'dur. İlk kez 1975'de Toledo-Pereyra ve arkadaşlarının yaptığı deneysel karaciğer nakli sırasında bu patolojik tablo görülmüştür. Yapılan bu çalışma modelinde, ilerleyici tromboz ve organ yetmezliği ile sonuçlanan greft nekrozu gibi komplikasyonlar gelişmiştir. 1980'ci yıllardan "reperfüzyon hasarı" terimi literatürde kullanılmaya başlanmıştır (Teoh ve Farrell, 2003).

Diğer organlarla karşılaştırdığımızda, karaciğerin farklı morfolojik yapısından dolayı, hipoksik duruma karşı kendini savunma mekanizması vardır. Karaciğer ikili kan dolaşımına sahiptir. Portal ven, karaciğerin %70-80 oranında kanlanmasını sağlar. Geri kalan %20-30 oranı ise hepatik arterden sağlanır.

Karaciğer İR hasarının sınıflandırılması literatürde sıcak İR hasarı ve soğuk-depolama İR hasarı olarak geçer. Karaciğerde cerrahi işlemler sırasında sıcak İR hasarı gelişir. Buna örnek olarak karaciğer transplantasyonu, hipovolemik şok, toksik karaciğer hasarı ve Budd-Chiari sendromunda görülen sıcak İR hasarı verilebilir. Soğuk-depolama İR hasarı dediğimiz ise transplantasyon öncesi nakledilen organın soğuk ortamda saklanması sırasında meydana gelir (Weigand ve ark., 2012; Go ve ark., 2015; Suyavaran ve Thirunavukkarasu, 2017).

Karaciğer İR hasarının patofizyolojisinde iki faz görülür:

1. Erken faz (~2-3 saat); Yeniden kanlanma sürecinin ilk fazında hücreler oksidatif strese maruz kalırlar. Özellikle ROT salgılanması sinuzoidal endotel hücreleri ve hepatositlerin hasar görmesine neden olur.

2. Geç faz (6-48 saat); Proenflamatuar sitokinler, kemokinler, nötrofiller ve makrofajlar tarafından enflamasyon yanıtı uyarılır, ROT üretimi artar, enflamasyon tetiklenir ve parankimal hasar meydana gelir (Lentsch ve ark., 2000; Datta ve ark., 2013).

Karaciğer İR hasarında genellikle oksidatif stres, enflamasyon yanıtı ve immünojenik yanıt devreye girerek karaciğer hasarına neden olmaktadır.

### 2.3.1. Oksidatif stres

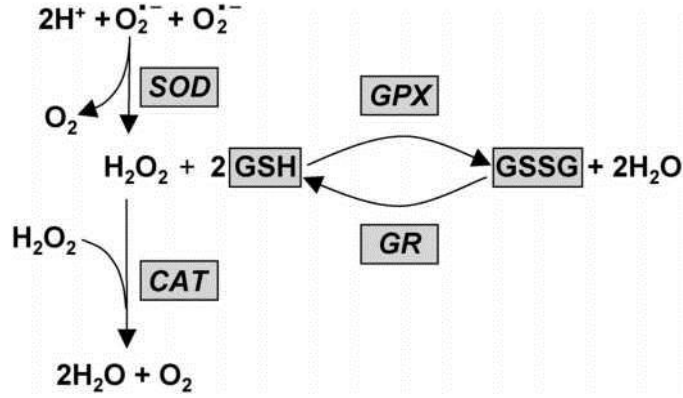
Bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren moleküller, serbest radikal olarak adlandırılır. Aldığımız oksijenin yaklaşık %3-5 kadarı vücudumuzda reaktif oksijen türevleri dönüştürülür. Serbest oksijen radikallerinden süperoksit anyonu, hidroksil radikali, nitrit oksit ve hidrojen peroksit gibi radikaller hücredeki başka moleküller ile kolaylıkla reaksiyona girebilmektedirler. Normalde, hücrelerdeki ROT oluşumunun ana kaynağı, elektron transport sisteminin tepkimeleri esnasında oluşan elektron kaçaklarıdır. Mitokondriden geçen oksijenin yaklaşık %90-95'nin suya dönüştüğü, geri kalanının ise fizyolojik ROT oluşturduğu tahmin edilmektedir. ROT'in başka kaynakları ise sitokrom P450, lipooksijenaz, ksantin oksidaz ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazdır. ROT nükleik asitler, karbonhidratlar, lipitler ve proteinler dahil, tüm biyolojik moleküller ile reaksiyona katılır ve hücreleri oksidatif hasara maruz bırakır. Hücre zarları poliansature yağ asitleri ile zengin olduğundan dolayı ROT'ne daha duyarlıdırlar, membran lipit peroksidasyonuna neden olurlar.

ROT'ne karşı vücutta antioksidan savunma mekanizması enzimatik ve nonenzimatik olarak iki gruba ayrılır. Enzimatik antioksidan savunma sistemi süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimatik moleküllerden oluşmaktadır(bkz., Şekil 1). Nonenzimatik antioksidanlar ise askorbik asit (Vitamin C), ürik asit, bilirubin,  $\alpha$ -tokoferol (Vitamin E),  $\beta$ -karoten, koenzim Q10 ve diğerlerinden oluşmaktadır.

Hücrelerde SOD katalizi ile oluşan hidrojen peroksit en etkili olarak glutatyon peroksidaz (GPx) ile parçalanır. GPx'in aktivesi için redükte GSH'a gerek vardır.

SOD sitozolde, mitokondride ve ekstrasellüler yüzeyde bulunur. Aktif bölgesinde bakır, çinko veya manganez içerir. SOD süperoksit serbest radikalini katalize ederek hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlayan, bir oksidoredüktazdır.

Katalaz, peroksizomlarda bulunan enzimdir ve hemoprotein yapıya sahiptir. Katalize ettiği reaksiyonda hidrojen peroksiti suya ve oksijene indirger (Garden ve Granger, 2000; Glantzounisve ark., 2005).



**Şekil 1.** Antoksidan enzimler (<http://doctor-helps.net/wp-content/uploads/2013/12/Effect-of-Glutathione-Depletion-1.jpg> alınmıştır)

Karaciğer İR hasarının patofizyolojisinde çeşitli mekanizmalar devreye girer. Bunlar nötrofillerin aktivasyonu, endotel hücrelerin şişmesi, vazokonstriksiyon, mikrosirkülasyon bozukluğu, vasküler permabilitede artış ve hücre lizisidir (Michael ve ark., 2004; Kaszaki ve ark., 2006; Peralta ve ark., 2013).

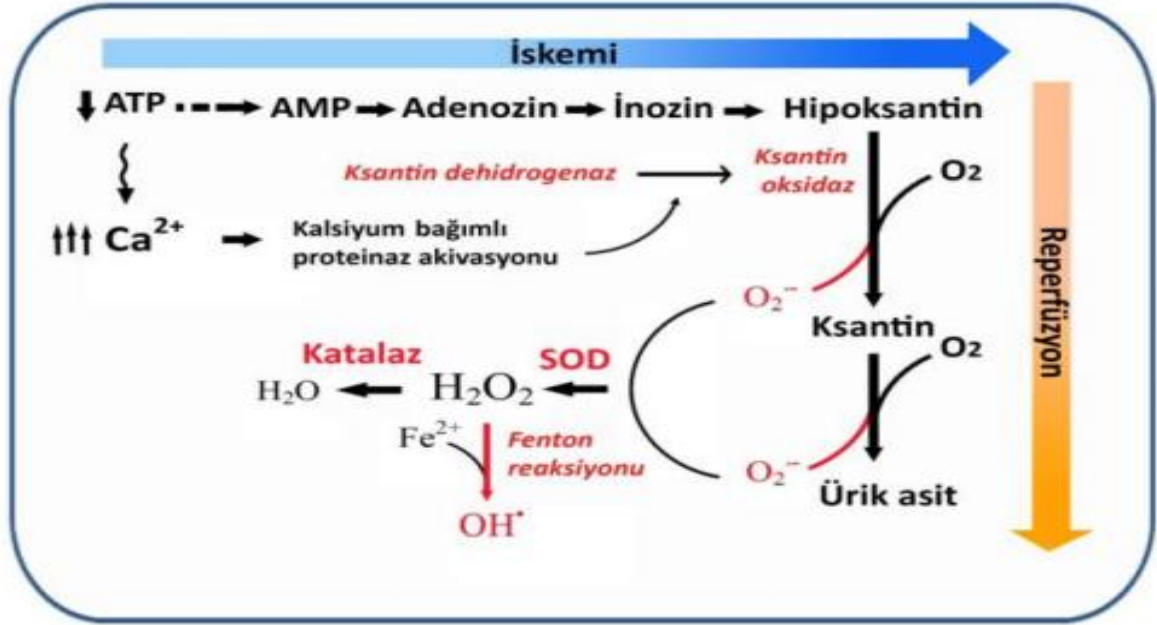
İR hasarının erken fazında ROT salgılanması hepatositlerin, sinüzoidal endotel hücrelerin (SEH) ve KH hasar görmesine neden olur.

Karaciğer İR hasarının patofizyolojisinde oksidatif stresin rolü büyüktür. Prooksidan ve antioksidan sistemleri arasındaki dengenin bozulması oksidatif strese neden olur (Teoh ve Farrell, 2003; Kaszaki ve ark., 2006).

Reperfüzyon oluştuktan birkaç dakika sonra elektron transport zincirinin reaksiyonları sonucu olarak, hepatik ksantin oksidaz, SEH ve KH'de NADPH oksidaz enzimleri etkisiyle ROT (superoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri) üretimi yükselmektedir.

İR hasarında birçok mekanizma ROT oluşumunu tetiklemektedir. Bunlardan birisi de ATP yıkımıdır. Hipoksik hücrede ATP ilk olarak adenosin difosfata (ADP) sonraki aşamada ise adenosin monofosfata (AMP) ve adenezine dönüşür. Reaksiyonun devamında hipoksantin oluşur. Hücre içi kalsiyum ve sodyum iyon konantrasyonları yükselir. Hücre içi kalsiyum artışı kalpainini aktive ederek, ksantin dehidrojenazı ksantin oksidaza dönüştürür (bkz., Şekil 2). Ksantin oksidaz, ksantin dehidrojenazdan farklı olarak, elektron alıcı olan moleküler oksijeni kullanır, ksantin oksidaz enzimatik aktivitesi ile ROT oluşur (Weigand ve ark., 2012).





**Şekil 2.** İskemi-reperfüzyon hasarında ksantin oksidaz aracılı reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu (Ozcan ve ark., 2015'den alınmıştır)

Hücre içi ROT miktarında artış, aynı zamanda eNOS enziminin inhibisyonuna neden olur ve hücrede NO miktarı düşer. Vazodilatör olarak görev yapan NO miktarının azalması sırasında, sinüzoidal lümen daralmasına yol açtığı iddia edilmektedir. İR hasarında oluşan ROT, hücreleri oksidatif stres hasarına maruz bırakarak, hepatositlerin ve SEH'nin apoptotik ve nekrotik ölümüne neden olur. ROT hücre içi moleküllere, organellere, hücre membranına verdiği zarardan ve  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaz pompasının ATP eksikliğinden çalışmaması ile hücre içine  $\text{Na}^+$  girişi artar. Akabinde hücre içi su birikir ve hücre şişerek konjesyon gelişir. Yanı sıra NO miktarı azaldığı zaman vazokonstriktör ajan endotelin ve trombaksan  $\text{A}_2$  salgılanır. Trombositlerin ve lökositlerin agregasyonu yükselir, sinüzoidal lümen daralır ve böylece kan mikrosirkülasyonu bozulur (Weigand ve ark., 2012). eNOS uyarılması 4-6 saati bulur. Ratlarda yapılan karaciğer İR hasarı deney modelinde endotelin reseptör antagonistinin (bosentan) koruyucu etkisi gösterilmiştir (Serracino-Inglott ve ark., 2001).

Karaciğerde hipoksik bölgeler arttıkça, KH'nin aktivasyonu, sitokin salınımı, ROT oluşumu ve nekroz da artar (Miyashita ve ark., 2016).

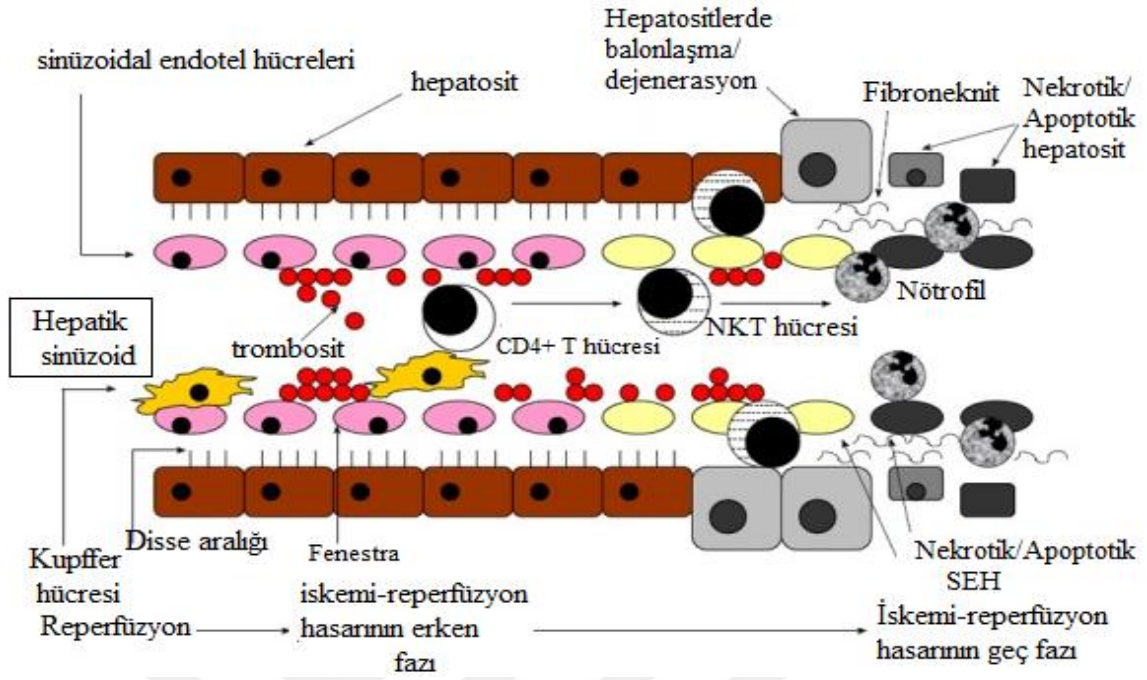
Monositlerden ve Kupffer hücrelerinden ROT'in salgılandığı zaman redoks duyarlı hipoksiyle indüklenen faktör-1'in (HIF1), nükleer faktör-kappa beta (NF-κB), aktivatör protein-1'in (AP-1), stresle aktive olan protein kinaz (SAPK) gibi çeşitli transkripsiyonel faktörlerin hepatositlerde ve sinüzoidal endotel hücrelerinde ekspresyonunun arttığı izlenmiştir (Teoh ve Farrell, 2003).

Ca<sup>2+</sup> iyonları esas olarak hücre sitozolünde, mitokondride ve endoplazmik retikulumde bulunur. Ca<sup>2+</sup> konstanrasyonu iyon kanallarıyla kontrol edilerek homeostazı korunur. Hepatositlerde endoplazmik retikulumdan Ca<sup>2+</sup> salgılanarak hücre içi kalsiyum dengesi bozulur. Artmış mitokondriyal Ca<sup>2+</sup> iyonlarının düzeyi ise mitokondrial matriks potansiyelini azaltır. Buna cevap olarak ATPaz aktivitesi baskılanarak ATP hidrolizi tetiklenir. İlerleyen mitokondri hasarı hücreyi apoptoza götürür (Guan ve ark., 2014).

### **2.3.2. Enflamasyon yanıt**

Karaciğer İR hasarının patofizyolojisinde sitokinler tarafından oluşturulan enflamatuar yanıt görülmektedir. Akut enflamatuar yanıt, proenflamatuar ve anti-enflamatuar sitokinlerin arasındaki dengenin bozulması ile gelişir. KH'nin aktivasyonu sonucunda, proenflamatuar sitokinlerden olan tümör nekrozis faktör alfa (TNF-α) ve interlökin 1 betanın (IL-1β) ekspresyonu yükselir. TNF-α, karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarında önemli bir mediyatör olup, sadece hepatik hücrelerde değil akciğerde de etkisini gösterir. Aynı zamanda interlökin-12 (IL-12) İR hasarının erken fazında salgılanarak TNF-α ve IL-1β ekspresyonunu artırdığı düşünülmektedir (Lentsch ve ark., 2000; Saidi ve Kenari, 2014).

İR hasarı sırasında KH'den salgılanan proenflamatuar sitokinlerin (TNF-α ve IL-1β) ekspresyonu artar. Sitokinlerin salgılanmasına bağlı olarak, nötrofillerin ve CD4+ T lenfositlerin aktivasyonu ve karaciğere migrasyonu gerçekleşir. Aynı zamanda sitokinler, hepatositlerde ve SEH'de ROT ekspresyonunu artırarak, lökositlerin ve trombositlerin agregasyonuna yol açarlar (bkz., Şekil 3). Bu da hepatik kan mikrosirkülasyonun bozulmasına neden olur (Weigand ve ark., 2012; Suyavaran ve Thirunavukkarasu, 2017).



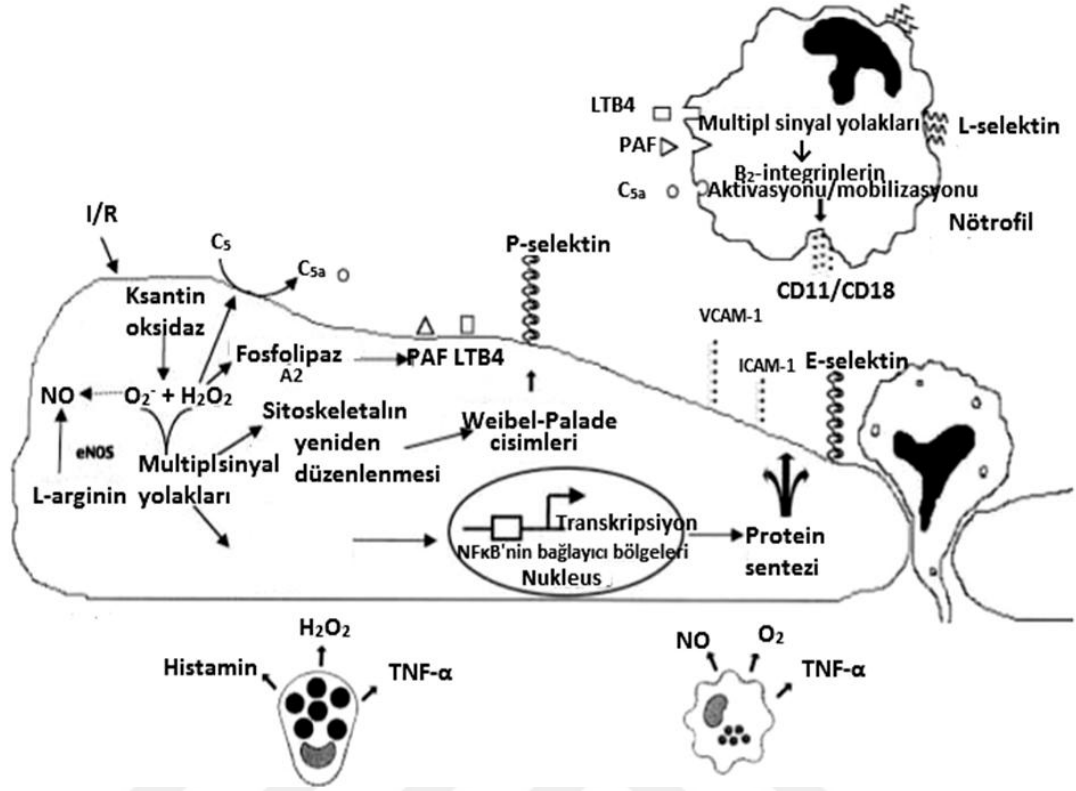
**Şekil 3.** Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı karaciğer sinüzoid ve hepatositleri içeren çevresinin hücresel mekanizmalarının şeması. İlk olarak sinüzodal perfüzyon bozulması trombositlerin tıkanmasından kaynaklanır, daha sonra Kupffer hücreleri CD4+ T hücrelerini aktive eder, onlar da natural killer T hücrelerini aktive ederek sinüzoidal endotelial hücrelerin ve hepatositlerin hasarına neden olur, daha sonra nötrofil aktivasyonu, adhezyon ve transmigrasyon çok sayıda hücre hasarına neden olur (Datta ve ark., 2013'den alınmıştır)

Ayrıca TNF- $\alpha$  vasküler endotelde adhezyon moleküllerinin salgılanmasını uyarır, hepatik endotel hücrelerinde P selektinin upregülasyonunu tetikler, nötrofil ve trombosit agregasyonuna yol açar. Bu da karaciğer disfonksiyonuna sebep olur.

İR hasarının erken fazında TNF- $\alpha$  mediatörünün salgılanması, kemokinlerin indüklenmesine yol açar. Endotelial kemokinlerin salgılanması, nötrofillerin aktivasyonunu uyarır ve sinüzoidal endotel ile adhezyonunu sağlar. Daha sonra nötrofiller hasar görmüş hepatik dokuya yönelirler. Aktive olmuş nötrofillerin hepatik parankima içinde birikmesi oksidanların ve proteazların salgılanmasına yol açar ve buda hepatik hasara neden olur. İR hasarında nötrofiller tarafından aktive olunan NADPH oksidaz, elastaz ve MPO gibi enzimler ROS kaynakları olarak görev alır. Dokunun yeniden kanlanmasıyla gelen oksijenin büyük kısmı, NADPH bağımlı oksidazı aktivleyerek, süperoksit iyonlarını oluşturmaktadır. Akabinde oluşan hidrojen peroksit, nötrofillerden salgılanan MPO enzim aracılığı ile klorür iyonları varlığında, hipokloröz

aside indirgenir. Oluşan hipokloröz asit direkt hepatik hasara neden olur ve antiproteazların deaktivasyonunu sağlar. Aynı zamanda nötrofiller birkaç mediatörün salgılanmasını indüklemektedir. Nötrofilik granüller, proteazları ve hidrolitik enzimleri salgılayarak, hepatik hasara neden olurlar (Lentsch ve ark., 2000).

İnterlökin-1 (İL-1), nötrofiller tarafından ROT'in salgılanmasını uyarır ve KH tafarından salgılanan TNF- $\alpha$  sentezini artırır. TNF- $\alpha$  SEH'de bulunan intrasellüler adhezyon molekülü-1 (ICAM-1) ekspresyonunu stimüle ederek nötrofillerin adhezyonunu, transendotelyal geçişini ve hepatik parankimaya bağlanmasını sağlar (bkz., Şekil 4). Ayrıca TNF- $\alpha$ , interlökin-6 (İL-6), makrofaj enflamasyon proteini-2 (MIP-2), epiteial nötrofil aktive edici protein-78 (ENA78) gibi diğer moleküllerin salgılanmasına neden olur (Peralta ve ark., 2013; Schofield ve ark., 2013).



**Şekil 4.** İskemik-reperfüzyon hasarında postkapiller venlerde görülen inflamatuvar yanıt, endotel bağımlı mekanizmalarla açıklanabilir. İskemik- reperfüzyon hasarında, ksantin oksidaz enziminin aktivasyonu, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve superoksit ( $O_2^-$ ) birikir. Buna bağlı olarak hücrede endotelial nitrit oksit sentaz (eNOS) tarafından salgılanan nitrit oksitin (NO) azalması görülür. Bu da kompleman aktivasyonuna, depolanmasına; fosfolipaz A2 tarafından LTB4 ve PAF üretimine yol açar. Oksidanlar, P-selektinin ekspresyonunu etkileyerek, endotel hücreleri tarafından önceden oluşturulmuş havuzdan (Weibel-Palade cisimleri) harekete geçen lökosit yuvarlanma reseptörünün aktivasyonu ve P-selektinin ekspresyonunu sağlar. B2-integrinlerin (CD11/CD18) aracılığı ile lökositlerin sıkı yapışması, kompleman aktivasyonu, LTB4 ve PAF reseptörlerinin indüklenmesi gerçekleşir. Endotel hücrelerinde lökositlerin sürekli olarak yuvarlanması ve yapışması, oksidan sentezine bağımlı, E-selektin ve ICAM-1 gibi, endotel hücreleri tarafından salgılanan adhezyon moleküllerine bağlıdır. Endotel hücreleri ve lökositler tarafından salgılanan oksidanlar, transkripsiyonel faktörlerin indüklenmesine neden olur (NFκB). Bu da adhezyon moleküllerden sorumlu olan genler üzerinde etki gösterir. İskemi-reperfüzyon hasarında oluşan inflamatuvar yanıt, postkapiler venüllerin yakınında bulunan, mast hücreler ve makrofajlar tarafından salgılanan mediyatörler ile aktive olur (Carden ve Granger, 2000'den alınmıştır)

### 2.3.3. İmmünojenik yanıt

Doğuştan gelen bağışıklık sistemi patojenlere ve enfeksiyöz olmayan doku hasarına karşı ilk savunma sistemini sağlar ve uyarlanabilir bağışıklık yanıtı başlatır. Nonparankimal hücrelerden, özellikle KH ve SEH, karaciğerde önemli doğuştan gelen bağışıklık sisteminin efektör hücreleridir.

Karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisinde proenflamatuar yanıtının rolü 1990'ların başından itibaren belgelenmiştir ve bu hasarda rol alan hücrelerin başlıca Kupffer hücreleri, dentritik hücreler (DH), T lenfositler ve natural killer/natural killer T (NK/NKT) bulunduğu tespit edilmiştir.

KH ve DH "uyarıcılara" (hasarlanma ilişkili moleküler biçimleri (DAMP) ve patojen ilişkili moleküler biçimleri (PAMP)) maruz kaldığı zaman, aktive olarak hücrel hasara neden olurlar. Sonrasında proenflamatuar sitokinler salgılanması ve polimorfonükleer lökosit (PMNL) hücrelerin aktivasyonu gelişir.

Karaciğer İR hasarının patofizyolojisinde KH'nin rolü büyük. KH'nin aktivasyonu enflamatuar kaskatlar aktive olarak karaciğer dokusuna farklı lökosit popülasyonlarının göçü tetiklenir. İlk olarak CD4+ T lenfositler aktive olurlarlar ve reperfüzyondan sonra karaciğer parankiminde hızla toplanırlar. Uyarlanabilir bağışıklık tepkilerinin başlatılmasına ek olarak, T hücreleri hepatik nötrofil alımını artırır ve böylece doku hasarı gelişir.

Karaciğer İR hasarında T lenfositlerin karaciğere antijenik veya nonantijenik mekanizmalarla bağlanmaları tam olarak aydınlanmamıştır. Bazı çalışmalar temel doku-uygunluğu bileşeni II (MHC II) bloke edici antikörlerin hepatik İR sonrası serum ALT üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını göstermektedir. Aynı zamanda antijen bağımlı aktivasyona da uğrayabilen, hem sinüzoidal endotel hücreleri hem de iskemi sırasında aktive olan hepatik DH antijen sunumu yapabilirler. Hayvan deney modelinde İR hasarında CD4+ T hücrelerin depleksiyonuyla oluşan karaciğer hasarın azaldığı görülmüştür (Caldwell ve ark., 2007; Lentsch, 2012)

Hanschen ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada ROT ve proenflamatuar sitokinlerden TNF- $\alpha$ , İL-6 salgılanmasıyla CD4+ T lenfositlerin aktivasyonu geliştiği

gözlemlenmiştir. Aynı zamanda CD4+ T lenfositlerin KH'nin aktivasyonunu arttırdığını görülmüştür.

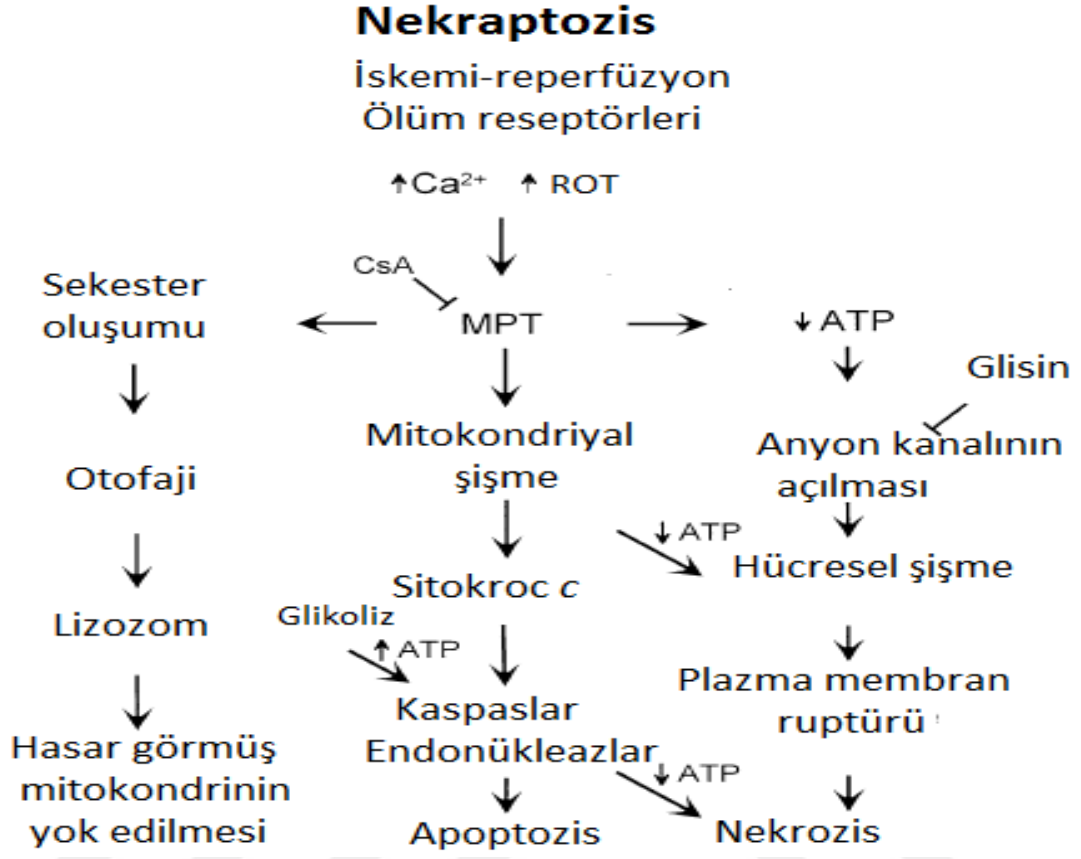
Karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisinde Toll benzeri reseptörlerin 4 (TLR4) aktivasyonu uyarılmaktadır. Hipoksiye ve enflamasyona maruz kalmış hepatik hücrelerden salgılanan yüksek mobiliteli grup boks 1 (HMGB1) proteini, nonparankimal TLR4 reseptörü için ana hedefdir. Aynı zamanda karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarında, Toll benzeri reseptörleri 3 ve 9 (TLR9 ve TLR3) reseptörlerin rolü olduğu iddia edilmektedir (Walsh ve ark., 2009; Zhai ve ark.,2011; Lu ve ark.,2016; Suyavaran ve Thirunavukkarasu, 2017).

#### **2.3.4. İskemi-Reperfüzyon hasarında hücre ölümü**

Organizmada mevcut olan tüm hücrelerin belirli bir yaşam süreci vardır. Bu sürecin bitmesi ölüm ile sonlanır. Ayrıca hücrelerin farklı stres faktörlerine maruz kalması, onların spontan bir şekilde ölümüne sebep olur.

Apoptoz, deoksiribo nükleik asit (DNA) tarafından kontrollü programlaştırılmış hücre ölümüdür. İlk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından "yaprak dökümüne" benzetilmiştir. Nekroz ise kontrolsüz şekilde ilerleyen, DNA tarafından düzenlenmeyen bir hücre ölümüdür (Abbas ve Mitchell, 2008).

Karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisinde hem apoptozun hem de nekrozun rolü vardır. Bu durum nekroptosis olarak adlandırılır. Nekroptosisin mekanizmasında mitokondriyal geçirgenlik tranzisyonunun (MPT) ATP üzerine olan etkisi, apoptozu ve nekrozu belirler (Jaeschke ve Lemasters,2003). Hücrelerin "mini-fabrikası" olan mitokondriler, hücre içi enerji kaynağıdır (Abbas ve Mitchell, 2008). Mitokondriyal hasar oluştuğunda, Mitokondriyal Geçirgenlik Tranzisyon Gözeneği (MPTP) olarak adlandırılan ve yüksek iletkenliğe sahip olan bir kanal oluşur. Bu kanalın aktivasyonu, mitokondriyal membran potansiyelini azaltarak oksidatif fosforilasyonun bozulmasına yol açar. Böylece intraselüler kalsiyum artışı, ATP'az enzim aktivasyonunu tetikleyerek ATP kaybını hızlandırır (bkz., Şekil 4.). MPT'nin artması hücreyi apoptoza yönlendirir (Go ve ark., 2015). Yani hepatositlerde MPT aktivasyonu sonrasında, ATP yüksek olduğu zaman apoptotik hücre ölümü, azaldığı zaman ise nekrotik hücre ölümü gerçekleşir (Jaeschke ve Lemasters, 2003; Casillas-Ramírez ve ark., 2006).

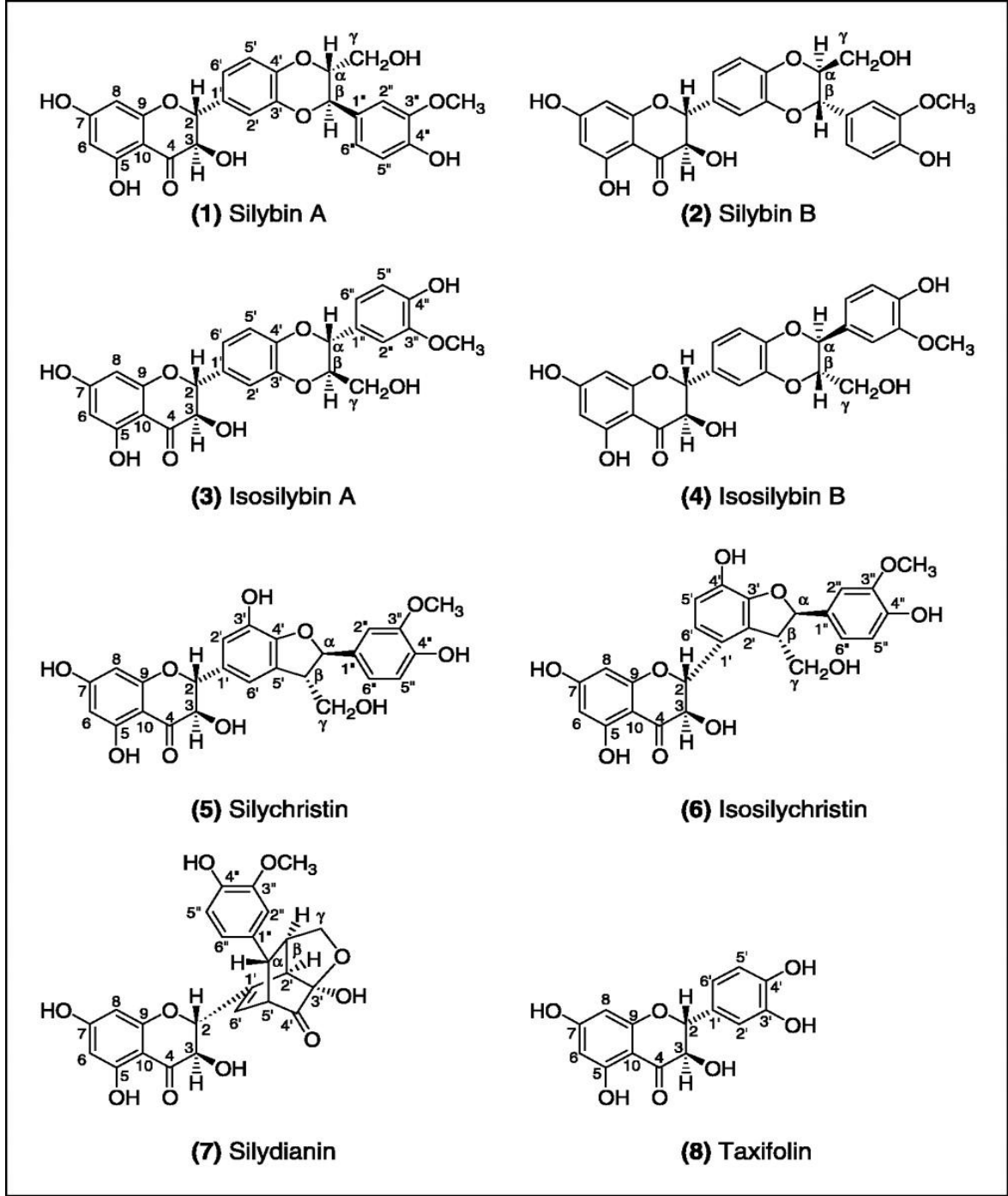


**Şekil 5.** Mitokondriyal geçirgenlik tranzisyonunun (MPT) şeması- nekraptozis bağımlı olaylar. İskemi-reperfüzyon, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, mitokondriyal  $\text{Ca}^{+2}$  iyonlarının ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) artışı MPT'nun başlangıcını teşvik eden bazı olaylardardır. Eğer MPT başlangıcı zamanı nispeten az sayıda mitokondride ortaya çıkıyorsa, organeller lizozomal sindirim için otofagozomlara tutulurlar, bu işlem hasar görmüş ve potansiyel olarak toksik olan mitokondriler ortadan kaldırır. MPT'de daha fazla mitokondriye rastlandığında ise mitokondriyal şişme, dış zar kopması ve sitokrom *c* salınması gerçekleşir. Glikolizden ve tam bozulmamış mitokondrilerden sağlanan ATP, sitokrom *c*, aşağı doğru kaspazları ve diğer apoptoz yıkıcı enzimlerini aktive eder. MPT başlangıcı ani olduğunda ve çoğunlukla mitokondri kapsadığı zaman, ATP'nin fazla tükenmesi kaspaz aktivasyonunu bloklar. ATP tükenmesi glisin duyarlı organik anyon kanalının açılmasına neden olur, sonuç olarak plazma membran ruptürü gerçekleşerek ve nekrotik hücre ölümü gerçekleşir. Apoptotik sinyalizasyon zamanı ATP tükenerek sekonder nekrozis gözlemlenebilir. CsA, siklosporin A (Jaeschke ve Lemasters, 2003'den alınmıştır)



## 2.4. Silymarin

Silymarin, *Asteraceae* familyasına ait bir bitkidir. Çeşitli flavonoliganlar (ana maddesi Silybin) içeren Silymarin, son on yılda karaciğer tedavisi için bitkisel bir ilaç olarak ilgi görmüştür. Silymarin *Silybum marianum* (devedikeni) bitkisinin tohumlarından ekstrakte edilmektedir. Günümüzde standartlaştırılmış SM ekstraktı, yaklaşık olarak %65-80 flavonoliganlar izomerleri (Silybin A ve Silybin B, İzosilybin A, İzosilybin B, Silikristin ve Silydianin), geri kalanı %20-35 yağ asidi ve polifenolik yapıda bileşikler içerir (bkz., Şekil 6.). Silybin, kapalı formülü  $C_{25}H_{22}O_{10}$ , 1959'da flavonoliganlar olarak adlandırılan yeni bir doğal bileşik ailesinin ilk üyesi olarak bulunmuştur (Surai, 2015). Daha çok karaciğer ve safra kesesi hastalıklarında kullanılan SM, uzun yıllardır toksin ve mantar zehirlenmeleri, böcek ısırıkları ve yılan sokmalarının tedavisinde de kullanılmaktadır (Rambaldi ve ark., 2005).



**Şekil 6.** Milk Thistle ekstraktının kimyasal bileşikleri (*S.Marianum*). Bu sekiz bileşikler ticari olarak Silymarin adıyla mevcut olan, Milk Thistle ekstraktlarında tespit edilmiştir. Her bir ekstraktın içeriği tabloda sıralanmıştır: Flavonoligan bileşiklerin yedisinin M.A. 482,1. Taksifolin (Dihydroquerceti) ticari SM ürünlerinde belirlenen tek flavonoiddir. Daha önce tek bir bileşik olduğu düşünülen Silibinin, şu an 1:1 diastereomer karışımından (Silybin A ve Silybin B'nin) olduğu bilinmektedir (Davis-Searles ve ark.,2005'den alınmıştır)

### **2.4.1. Farmakokinetik**

Yapılan bazı hayvan deney modellerinde SM'nin oral yolla verildikten sonra emiliminin daha az olduğu gösterilmiştir. Emilim oranı ratlarda yaklaşık %0,95 olarak görülmüştür (Surai, 2015). Yapılmış başka bir çalışmada, ratların oral SM uygulanmasından sonra, safrada SM miktarı yaklaşık % 2-3 oranında olduğu tespit edilmiştir. Yanı sıra plazmada pik konsantrasyonuna 4-6 saat sonra ulaştığı ve yarılanma ömrü 6-8 saat olduğu bulunmuştur. SM karaciğerde konjugasyona uğrayarak safraya atılır ve hidroliz edildikten sonra bağırsak florasından tekrar emilir. Buna SM'nin enterohepatik dolaşımı denir. Bir kısmı ise idrarla atılır (Fraschini ve ark., 2002). Hayvan deney çalışmalarının sonuçlarına dayanarak, SM'nin akut toksitesi düşük olduğu ve iyi tolere edildiği gözlenlenmiştir (Dixit ve ark., 2007).

### **2.4.2. Antioksidan özellikleri**

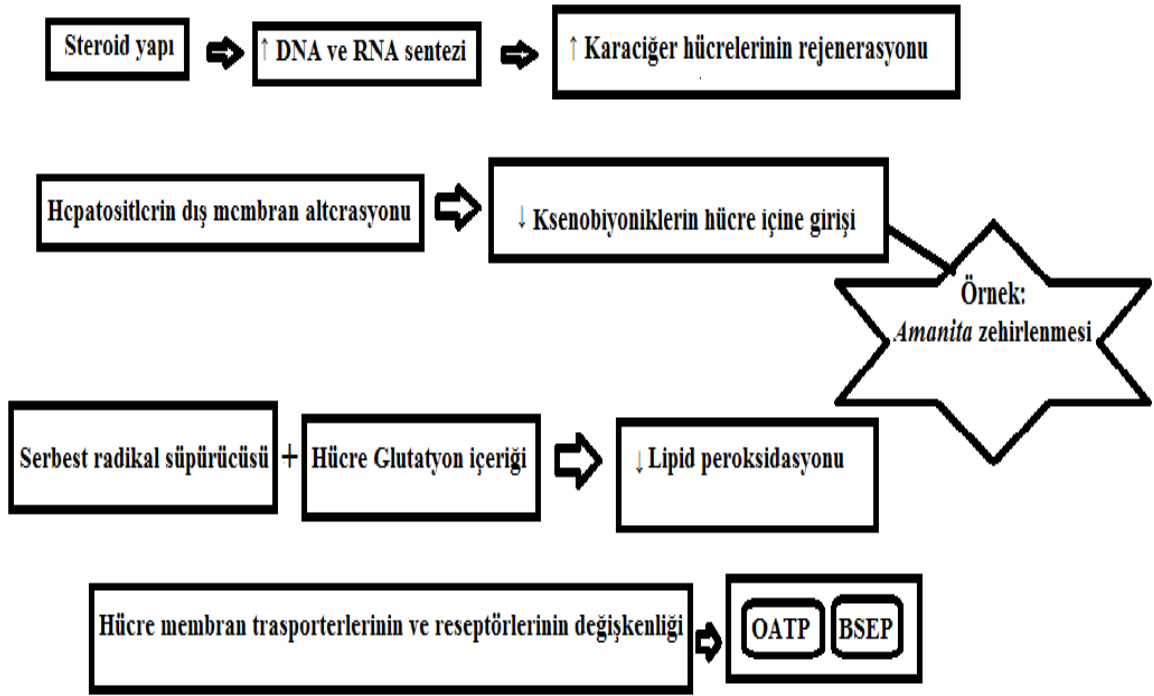
Yapılan bir çok hayvansal ve insan kaynaklı çalışmalarda endojen ve ekzojen nedenlerle oluşan oksidatif strese karşı SM'nin antioksidan etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Fraschini ve ark., 2002).

SM'nin antioksidan özellikleri şu yollarla açıklanmaktadır. Bunlar:

- a) Serbest radikal süpürücü etki gösterir.
- b) Prooksidan enzimlerin aktivitesini azaltır, mitokondriyadaki elektron transport zincirinin etkinliğini artırır, elektron kaçaklarını azaltır ve süperoksit oluşumunu engeller.
- c) Hücrede lokalize oksijenin konsantrasyonunu azaltır, serbest radikal üretiminin inhibisyonu sağlar.
- d) Hücrenin optimal redoks durumunu korur; çoğunlukla Nrf2 ve NF-κB'yi içeren transkripsiyon faktörlerini indükleyerek, antioksidan aktivasyona neden olur.
- e) Strese maruz kalmış hücrelerde, koruma sağlayan bir çeşit vitagenin (Isı Şok Proteini (HSP), tioredoksin vb.) ekspresyonunu artırır.
- f) Metal iyonlarının şelatlanmasını sağlar.
- g) Hasar görmüş moleküllerin tamiri ve uzaklaştırılmasında (DNA tamir enzimleri, şaperonlar ve başkaları) görev alır (Surai ve ark., 2015).

### 2.4.3. Etki mekanizmaları ve fonksiyonları

SM karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılan ve oldukça iyi araştırılmış bir bitkisel ekstrattır. Viral hepatit, toksik hepatit, karaciğer yağlanması, siroz, iskemik hasar ve radyasyon toksisitesinde güçlü antioksidan özelliği olduğu kanıtlanmıştır (Abenavoli ve ark., 2010). SM'nin antiinflamatuvar, proapoptotik, antikarsinojenik, antiviral, antifibrotik, antianjiyojenik, hepatoprotektif, gastroprotektif, kardioprotektif, nöroprotektif ve vasodilatör özellikleri araştırılmıştır (Demir M. ve ark., 2013).



**Şekil 7.** Silymarinin farklı etki mekanizmaları: Steroid bir yapıya sahip olduğundan dolayı, DNA ve RNA sentezini artırarak, karaciğer hücrelerinin rejenerasyonunu artırır. Hepatositlerin dış membran yapısını değiştirerek, ksenobiyotiklerin hücre içine girmesini önler (örnek: *Amanita* zehirlenmesi). Serbest radikalleri süpürerek, hücre glutasyon içeriğini artırır, lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SM'nin diğer etki mekanizması da, ABC taşıyıcıları (P-gp), organik anyon uptake taşıyıcı peptidleri (OATP), safra tuzu eksport pompası ve TNF- $\alpha$ 'ya bağlı taşıyıcıları ve reseptörleri gibi hücre zarlarının taşıyıcılarını ve reseptörlerini modifiye etmektir (Karimi ve ark., 2011'den alınmıştır)

SM ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında, prostat, böbrek, meme kanser hücrelerinde mitojenik sinyal yolağını ve hücre döngü siklüsünü baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca siklooksijenaz ve ornitin dekarboksilaz gibi enzimlerin aktivitesini indüklediği ve proliferasyonu baskıladığı gözlemlenmiştir (Kren ve Walterová, 2005).

İn vitro çalışmada, SM'nin (20 µM'de ) düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonunu düşürdüğü ve hidroksil radikal oluşumunu engellediği teyit edilmiştir (Varga ve ark., 2006).

Ratlarda cisplatin uygulanması sonrası, oluşan nefrotoksisitede SM'nin glomeruloprotektif ve nefroprotektif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Bokemeyer ve ark., 1996).

İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) ile yapılan çalışmada SM'nin vasküler endotel büyüme faktörünü (VEGF) baskılayarak, antianjiyogenik etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Jiang ve ark., 2000).

İnsan melanoma hücrelerinde (A37 5 ve Hs 294t) SM'nin hücre proliferasyonunu baskıladığı, tümör hücrelerini apoptoza uğrattığı ve hücre döngü siklüsü proteinlerinin üzerine değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Böylece SM'nin insan melanoma hücreleri üzerinde kemoterapötik bir etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir (Vaid ve ark., 2015).

SM ile yapılan birçok çalışmada lenfositlerin proliferasyonunu sağladığı, interferon- $\gamma$  (İFN $\gamma$ ), interlökin-4 (İL-4) ve interlökin-10 (İL-10) gibi sitokinleri indüklediği, yanı sıra TNF- $\alpha$ 'nın, NO'nun, interlökin-6'nı (İL-6) ve interelökin-1'in (İL-1) regulasyonunu sağladığı izlenmiştir. Böylece antienfamatuar etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Rainone F., 2005).

Yapılan hayvan deney çalışmalarında SM'nin, hasar görmüş hepatik hücrelerin üzerine etkisini rejeneratif etkili olan RNA polimeraz I'in stimülasyonunu ve protein sentezini arttırarak gösterdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda DNA sentezinin üzerinde aktive edici etkiye sahip olduğu açıklanmıştır (Abenavoli L. ve ark., 2010).

#### 2.4.4. Hepatoprotektif etkisi

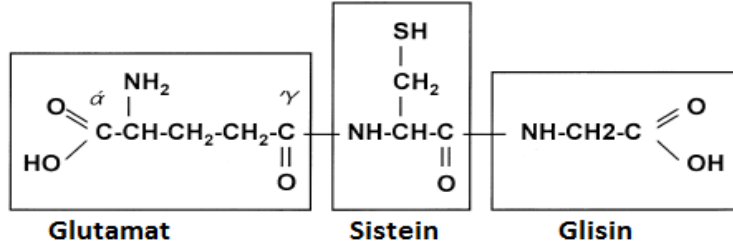
SM'nin hepatoprotektif etkisi birkaç mekanizmaya dayanmaktadır. Antioksidan etki göstererek lipid peroksidasyonunu önlemesi ve glutatyonun hücre içi dengesini koruması, açıklanabilir en önemli mekanizmalardır. Bundan başka hücre membran stabilizasyonunu ve permeabilitesini düzenleyerek, hücreyi ksenobiyotik hasara karşı korur (Fraschini ve ark., 2002). Ratlarda yapılan çalışmada karaciğer fibrogenezinde rol alan stellat hücrelerinin miyofibroblastlara transformasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Bu çalışmada 50 mg/kg günlük dozda kullanılan SM, kontrol grubuna göre %30-35 civarında antifibrotik etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Boigk ve ark., 1997). Ayrıca NF-κB baskılayarak, hepatik stellat hücrelerinin miyofibroblastlara dönüşümünü azalttığı da ortaya çıkmıştır (Pradhan S.C. ve Girish C., 2006; Radko ve Cybulski, 2007). Bu etkilerine dayanarak SM karaciğer hücrelerinin rejenerasyonunu stimüle ederek, daha çok alkolik karaciğer, viral hepatitler, siroz ve karaciğer yağlanması tedavisinde kullanılmaktadır. SM ve karaciğer üzerine çalışmalar yaklaşık 30 yıldır yapılmaktadır (Kocaman ve Dabak, 2015).

#### 2.5. Glutatyon

1924 yılında Sir Frederick Gowland Hopkins tarafından keşfedilmiştir (bkz., Şekil 8) (Ashtiani ve ark., 2011). GSH ve glutatyonla ilgili enzim sistemleri vücudumuzdaki en önemli protektif antioksidan sistemlerden birisidir (Dringen, 2000). Ayrıca GSH sitotoksik, kanserojen bileşiklerin, reaktif oksijen türlerinin metabolizmasında ve detoksifikasyonunda yer almaktadır (Knapen ve ark., 1999). GSH'nin diğer fonksiyonlar:

- a) Proteinlerin üzerinde bulunan sistein rezidülerinin tiyol statüsünü korur.
- b) γ-glutamil siklüsünü kullanarak sistein rezervlerinin depolanmasını sağlar.
- c) Östrojen, lökotrien ve prostaglandinlerin metabolizmasına katılır.
- d) Deoksiribonükleotidlerin sentezinde görev alır.
- e) Proteinlere demir-sülfür katılımında görev alır (Shelly, 2013; Aquilano ve ark., 2014).

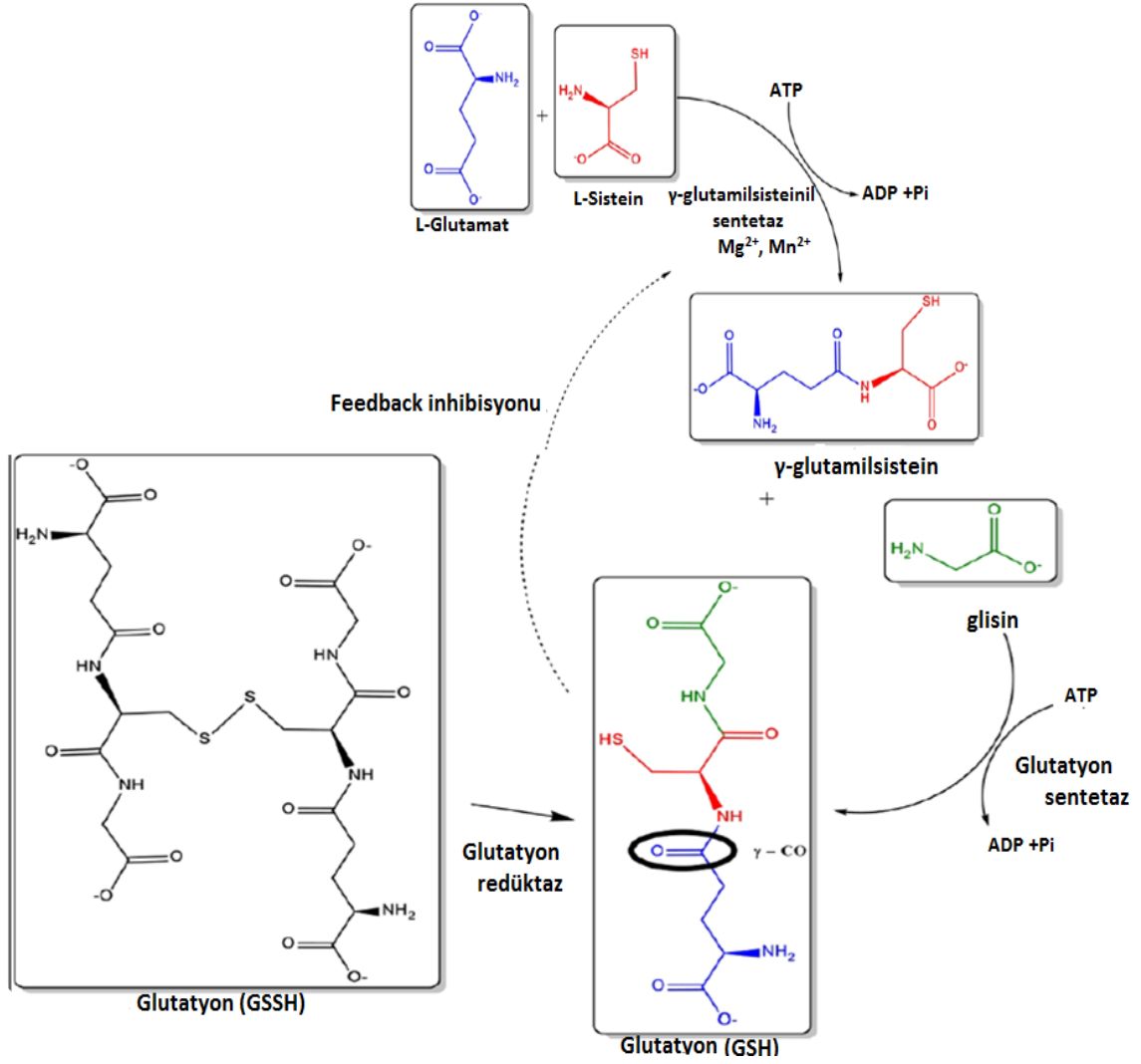
## GLUTATYON



Şekil 8. Glutatyon (Knapen ve ark., 1999'dan alınmıştır)

GSH en fazla hücre sitozolünde bulunur (%90), mitokondride ise yaklaşık %10 civarındadır (Lushchak, 2012; Aquilano ve ark., 2014). Çok az miktarda endoplazmik retikulumda ve nükleusta bulunduğu belirlenmiştir (Couto ve ark., 2016). GSH'nin sitoplazma konsantrasyonu hücre tipine bağlı olarak 1-10 mM arasında değişir ve en yüksek karaciğer hücrelerinde bulunur (Wang ve Ballatori,1998; Pastore ve ark.,2003; Halliwell ve Gutteridge, 2015).

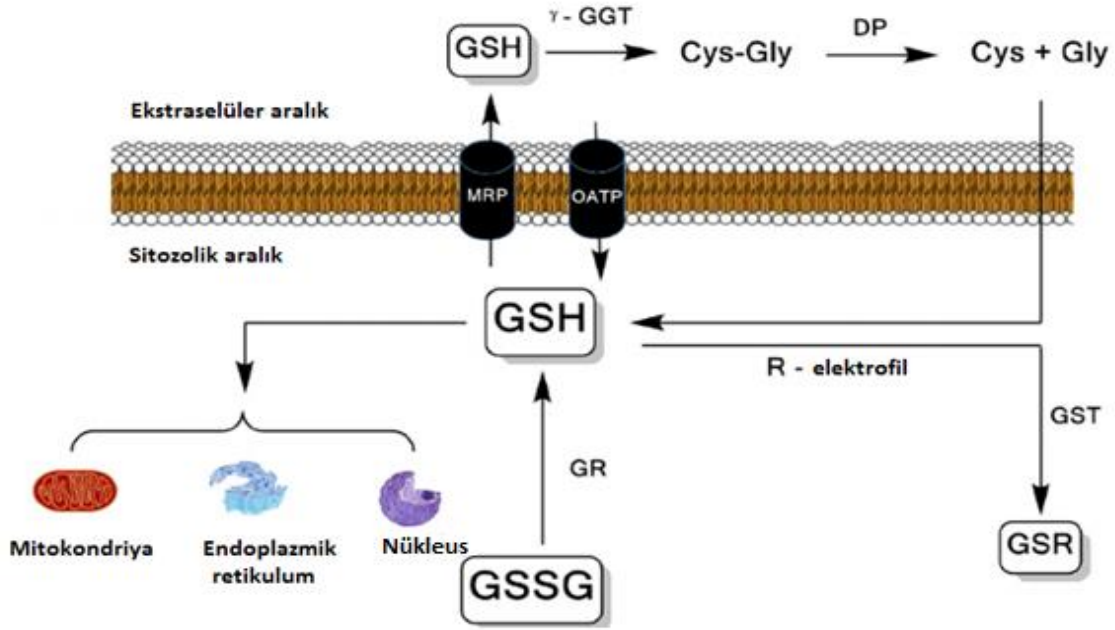
Atipik tripeptid yapıya sahip olan ve sisteinin aktif sülfidril (tiyol) grubunu içeren GSH'nun redükte ve okside formu (GSSG) bulunmaktadır. GSH hücrede proteinlere bağlı ve serbest halde, yani redükte formda bulunur. Sitozolde ve mitokondride GSH/GSSG oranı 10:1, fakat endoplazmik retikulumda bu oran 3:1'dir (Lu, 1999; Lushchak VI., 2012). Oksidatif stres durumlarında bu dengenin bozulduğu gösterilmiştir (Cnubben ve ark., 2001; Pastore ve ark., 2003).



**Şekil 9.** Glutasyon biyosentezinin ilk basamağında, 2 ATP molekülü harçayarak,  $\gamma$ -glutamilsisteinil sentetaz enzimin katalize ettiği reaksiyon sonucu,  $\gamma$ -glutamilsistein oluşur. Glutasyon bu reaksiyonun feedback inhibisyonuna neden olur. Glutasyonun yapısındaki disülfid bağı üzerinden okside glutasyon (GSSG) oluşumu gerçekleşir (Couto ve ark., 2016'dan alınmıştır)

İntraselüler GSH düzeyi birçok enzim tarafından kontrol edilmektedir. GSH sentez reaksiyonlarının içinde hız kısıtlayıcı basamak  $\gamma$ -glutamilsisteinil sentetaz tarafından düzenlenmektedir (bkz., Şekil 9). Aynı zamanda  $\gamma$ -glutamyltranspeptidaz ( $\gamma$ -GT), glutasyon sentetaz (GS), glutasyon redüktaz (GR), GPx ve aminoasit transporterleri hücre içi GSH düzeyinin homeostazında rol almaktadırlar (bkz., Şekil 10) (Cnubben ve ark., 2001).





**Şekil 10.** Hücre içi glutatyonun dolaşımı ve regülasyonu: Redükte glutatyon düzeyleri de novo sentezi, yeniden oluşan okside glutatyon ve glutatyonun ekstraselüler aralıktan giriş çıkışı ile kontrol edilir. Sitozolik alanda GSH'nun de novo sentezi gerçekleşir ve GSH bağımsız bir şekilde mitokondri, endoplazmik retikulum ve nükleus gibi organeller arasında dağıtılır. Oksidasyon sonrasında, glutatyon redüktaz (GR) aktivasyonu ile yeniden GSH oluşturulabilir. Antioksidan olarak hücre içi glutatyon, elektrofiller (R) glutatyon S-transferaz (GST) aktivasyonu ile reaksiyona girerek konjüge GSR bileşikler oluşturur. GSH hücre dışına çıkmak için spesifik membran taşıyıcı olarak Çoklu ilaç Direnci ile ilişkili Protein (MRP) ve organik anyon taşıyıcı polipeptit (OATP) ailesinin bazı üyelerini kullanmaktadır. Transport sırasında, GSH, hücrelerin dış zarında bulunan  $\gamma$ -L-glutamil transpeptidaz (GGT) ve bir dipeptidaz (DP) ile hidrolize edilir. Son ürünler (glutamat, sistein ve glisin), hücre içi glutatyon sentezi için kullanılabilir (Couto ve ark., 2016'dan alınmıştır)

Karaciğer, metiyoninden sistein sentezleyen tek organdır. Bu sentez farklı transporterler aracılığı ile plazmaya, safraya ve mitokondriye salgılanmasıyla dengelenir (Lu, 1999).

İnsan eritrositlerinde redükte GSH'nun yarılanma ömrü 4 güne kadardır. Ratların karaciğerinde ise redükte GSH'nun yarılanma ömrü yaklaşık 2-3 saattir (Halliwell ve Gutteridge, 2015).

GSH redoks bağımlı hücre sinyalinin düzenler. GPx 80 kD ağırlığında, dört subünitten oluşan tetramerik enzimdir. Yapısındaki her subünit selenyum içermektedir.

GPx, katalize ettiği reaksiyonda hidrojen peroksidin ve lipit peroksidlerinin indirđenmesini sağlar ve GSH'nu GSSG'ye dđnüştürür. GR ise katalize ettiği reaksiyonda kofaktör olarak NADPH kullanarak GSSG'nun GSH'a redüksiyonu sağlamaktadır (Cnubben ve ark., 2001; Townsen ve ark., 2003).



### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. MATERYAL

##### 3.1.1. Deney hayvanları

Çalışmamızda canlı ağırlığı ortalama 300-350 gram civarında olan toplam 50 erişkin erkek Wistar Albino rat kullanıldı.

##### 3.1.2. Kullanılan cihazlar

- a) Santrifüj cihazı (MSE, MISTRAL 3000I, seri no: 5691/02/075, U.K.)
- b) Santrifüj cihazı (Jouan, C4i, seri no: 30411037, France)
- c) Mikro pipetler (Eppendorf 20, 100, 200, 1000, Germany)
- d) Benmari (ASTEL, TIP J18 BAIN UNIVERSAL, seri no: 3940517, Jouan, France)
- e) Benmari (Termal Lab. Aletleri, seri no: 821911, Türkiye)
- f) Vorteks VM3 (Windaus, 3392, Germany)
- g) Elektronik terazi (Chyo Balanced Corporation, JL-180, seri no: 300258, Japan)
- h) Manyetik karıştırıcı (IKAMAG RH Janke ve Kunkel)
- i) pH metre (Microprocessor pH meter, EDT Instruments RE 357, 702 U.K.)
- j) Dondurucu, -80 °C (NUAIRE Ultra-Low Freezer, Model no: Nu-6420E)
- k) Spektrofotometre cihazı (SHIMADZU, UV-160A)
- l) Distile su cihazı (Ecoro Reverse Osmosis Systems, USA)
- m) BioTek SYNERGY 4 Multi- Detection Microplate reader

##### 3.1.3. Kullanılan kimyasallar

- a) Tiyobarbütirik asit ( $C_4H_4N_2O_2S$ , MA:144,1 g/mol, Art:8180, Merck)
- b) Glasiyal asetik asit ( $CH_3COOH$ , %100, MA:60,05 g/mol, 1lt:1.05 kg, Merck)
- c) Sodyum hidroksit (NaOH, MA: 40 g/mol, B639062 016, Merck)
- d) Potasyum dihidrojen fosfat ( $KH_2PO_4$ , MA: 136,09 g/mol, Art: 4871, Merck)
- e) Dipotasyum hidrojen fosfat ( $K_2HPO_4$ , MA: 174,18 g/mol, Art: 5101, Merck)

- f) Trikloroasetik asit ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ , MA: 163,39 g/mol, Art:810, Merck)
- g) Malondialdehit ( $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{O}_4$ , MA: 164,2 g/mol, T-1642, Sigma)
- h) Hidroklorik asit ( $\text{HCl}$ , %37, MA: 36,46 g/mol, 1lt:1,19 kg, Art:314, Merck)
- i) Dimetil Sülfoksit (SİGMA, lot#SHBG5286V)
- j) Silymarin (Milk Thistle (Silybum Marianum, Solgar, A.Ş.)
- k) L- redükte glutatyon, (Sigma-Aldrich, lot#021M1811V)

### **3.2. METOD**

#### **3.2.1. Deney hayvanlarının hazırlanması**

Yaptığımız deney hayvan çalışması, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 26.10.2016 tarih ve 68489742-604.01-E.25477 sayılı onayı alınarak, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Çalışmamızda canlı ağırlığı ortalama 300-350 gram civarında olan toplam 50 erişkin erkek Wistar Albino rat kullanıldı. Deney hayvanları standart laboratuvar koşullarında, musluk suyu ve standart pellet yem ile beslendi. Deney ortamında sıcaklık  $22\pm 1$  °C olarak sabitlendi.

#### **3.2.2. Çalışma grupları**

Her deney grubunda 10 rat olacak şekilde 5 çalışma grubu oluşturuldu. Bunlar;

1. Kontrol (sham) grubu, (n=10): İntraperitoneal yolla %10'luk Dimetil Sülfoksit (DMSO) içeren serum fizyolojikten 1 ml verildi. İskemi reperfüzyon oluşturulmadan önce sadece batın açıldı ve sonra kapatıldı.

2. İskemi-reperfüzyon grubu, (İR grubu (n=10): Hepatik arter, portal ven ve ekstrahepatik safra duktusuna aynı anda antitravmatik vasküler klemp konularak, 30 dk'lık karaciğer iskemisi oluşturuldu. 30 dk sonra klemp açılarak karaciğerde reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon süresi 24 saate kadar devam ettirildi.

3. SM-İR (100 mg/kg) grubu (n=10): İskemi-reperfüzyondan 60 dk önce intraperitoneal yolla silymarin verildi. Akabinde grup 2'ye benzer iskemi-reperfüzyon yapıldı.

4. GSH-İR (100 mg/kg) grubu (n=10) : İskemi-reperfüzyondan 60 dk önce intraperitoneal yolla redükte glutatyon verildi. Akabinde grup 2'ye benzer iskemi-reperfüzyon yapıldı.

5. (SM+GSH)-İR grubu (n=10): İskemi-reperfüzyondan 60 dk önce intraperitoneal yolla silymarin ile glutasyon birlikte verildi ve grup 2'ye benzer iskemi reperfüzyon yapıldı.

### **3.2.3. Silymarin çözeltisinin hazırlanması**

Çalışmada kullanılan Milk Thistle (Silybum Marianum, Solgar) 1 kapsülü 80 mg silymarin içerdiği için, 1.25 kapsül kullanılarak dozu 100 mg olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra %10'luk DMSO içeren 10 mL serum fizyolojikte çözülerek hazırlandı. SM-İR ve (SM+GSH)-İR grubundaki her bir rata 1 mL içerisinde 100 mg/kg SM intraperitoneal yolla uygulandı.

### **3.2.4. Glutasyon çözeltisinin hazırlanması**

Redükte glutasyon (L-redükte glutasyon, SIGMA-ALDRICH), %10'luk DMSO içeren 10 mL serum fizyolojikte çözülerek hazırlandı. GSH-İR ve (SM+GSH)-İR grubundaki her bir rata 1 mL içerisinde 100 mg/kg GSH intraperitoneal yolla uygulandı.

Deneyisel çalışmamızda çözücü olarak kullandığımız %10 DMSO'nun toksik etkisinin olmadığı teyit edilerek kullanıldı (Galvao ve ark., 2014).

### **3.2.5. Cerrahi işlem için ön hazırlık**

Deneyisel çalışmamıza başlamadan 12 saat önce ratlar aç bırakıldı. Cerrahi girişim öncesi, ilk olarak ratlar tartıldı ve intraperitoneal yolla 80 mg/kg ketamin hidroklorit (Ketalar ®; Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 3 mg/kg ksilazin (Rompun ®; Bayer, İstanbul, Türkiye) uygulanarak, anestezi yapıldı. Daha sonra anestezi alan ratların insizyon bölgesi traş edildi. Ratlara, sırt üstü pozisyon verildikten sonra, batikon ile cilt antisepsisi sağlanarak, medyan laparotomi uygulandı. Üst orta hat bölgesi daha az kanama olduğundan dolayı tercih edildi.

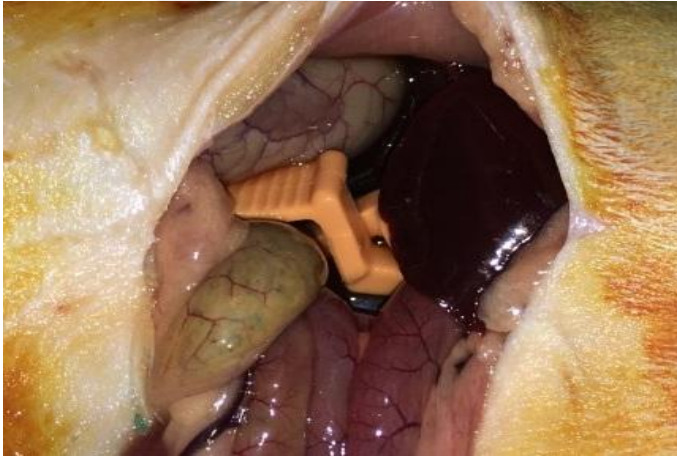
### **3.2.6. İskemi reperfüzyon modelinin oluşturulması**

İlk olarak Sham grubumuzda batın açılarak hepatik arter, portal ven ve ekstrahepatik safra duktusu görünür hale getirildi ve başka bir işlem yapılmadan batın kapatıldı. Çalışmamızda oluşturduğumuz İR modelinde total hepatik iskemi amacıyla hepatik arter, portal ven ve safra duktusuna antitravmatik vasküler klemp uygulanarak 30 dk iskemi izlendi (bkz., Şekil 11). Yarım saatlik iskemi süresi dolduğunda klemp kaldırılarak karaciğer 24 saate kadar reperfüze edildi. Klemp açıldığında karaciğer dokusunda koyu kahverenginde morarması fark edildi (bkz., Şekil 12). Klemp

uygulanmasından 60 dk önce, 3.,4. ve 5. gruplara silymarin (100 mg/kg) , redükte glutasyon (100 mg/kg) tek tek ve kombine (SM+GSH, 100mg/kg) halde intraperitoneal yolla verildi.



**Şekil 11.** Hepatik arter, portal ven ve safra duktusuna antitravmatik vasküler klemp uygulanması



**Şekil 12.** İskemik karaciğer (klempi uygulandıktan 30 dk sonra)

### **3.2.7. İskemi süresinde takip**

Yaptığımız iskemi-reperfüzyon modelinde ratlarda hipotermi oluşmaması dikkate alınarak ön işlemler yapıldı. Açık olan peritona önce 37 °C’de 1 mL vucut ısısına uyumlu %0,9’luk NaCl verildi. Sıvı kaybını önlemek için kesiğe tek tabaka halinde dikiş atıldı. Aynı zamanda oda sıcaklığına dikkat edildi.

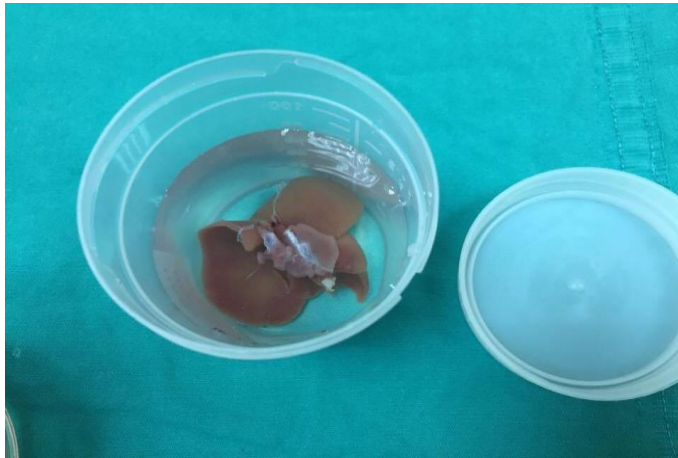
### 3.2.8. Reperfüzyon süresinde takip

İskemi süresi dolduğunda, hepatic pediküle uyguladığımız antitravmatik klemp çıkarıldı. Ratların abdominal bölgesine yaptığımız insizyon ilk olarak periton 2/0 piester sütür ile, sonra ise deri 0 ipek ile kapatıldı. İnsizyon bölgesi kapatılmadan önce ratların vücut sıvı kaybını önlemek için intraperitoneal yolla batin içine 37 °C’de 1 mL vucut ısısına uyumlu % 0,9’luk NaCl verildi. Viocid Blue deri spreyi yara iyileşmesi için kullanıldı. Aynı zamanda antibiotik terapisi yapıldı (20 mg/kg/gün Cefuroxime). Anestezi etkisi geçene kadar ratların genel durumu takip edildi.

### 3.2.9. Sakrifikasyon

Ratlar, sakrifikasyon öncesi aç bırakıldı. Oluşturduğumuz İR modelinde reperfüzyon süresi sona geldiği zaman, çalışma sonlandırıldı. Ratlara anestezi uygulandı, akabinde 5’lik bir enjektör ile intrakardiyak yolla (bkz., Şekil 14) kan örnekleri alındı. Kan örneği alındıktan hemen sonra 1-2 mL serum fizyolojik intrakardiyak yolla verilerek organların reperfüzyonu sağlandı. Ratlara eksanguinasyon metodu ile ötanazi yapıldı. Devamında patolojik inceleme için karaciğer dokusu alındı. Patolojik inceleme için alınan karaciğer dokusu uygun miktarda %10’luk formaldehit içeren plastik tüplere konuldu (bkz., Şekil 13). Biyokimya tüpüne alınan kan örnekleri 3000 g’de +4 °C’de, 5 dk santrifüj edildi. Aldığımız serum örnekleri çalışma gününe kadar -80 °C’de saklandı.

Çalışmamız için gereken örnekleri aldıktan sonra, ortaya çıkan tıbbi atıklar Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanlar Birimi’nin kurallarına göre imha edildi.



**Şekil 13.** %10’luk formaldehit içerisinde karaciğer doku örneği



**Şekil 14.** Kalpten kan örneklerinin alınması

### **3.2.10. Serumda ALT, AST ölçümü**

Biyokimyasal parametrelerden karaciğer fonksiyon testlerinin (ALT, AST) ölçümleri OMÜ Tıp Fakültesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi rutin Biyokimya laboratuvarında, Cobas 6000 C501 otoanalizöründe spektrofotometrik yöntem ile ölçümleri yapıldı. Ölçüm yaptığımız gün analizlerin tekrarlanabilirlik değerleri çalışma için uygun olarak tespit edildi (%CV < 2).

### **3.2.11. Serumda MPO ölçümü**

Serum MPO düzeyleri ELISA yöntemi (YLBiont Rat myeloperoxidase, MPO) ELISA Kit; Cat No: YLA0046RA) ile ölçüldü.

Bu kitin test prensibi: Serum örnekleri MPO antikorları ile kaplı kuyucuklara pipetlendi. Bu antikorlara bağlanan serumdaki MPO enziminin üzerine biotin ile işaretli MPO antikorları ilave edildi. Oluşan bu komplekse HRP-konjugat streptavidin eklendi. Kompleks Kromojen A ve Kromojen B ile oluşan rengin yoğunluğuna göre MPO düzeyini belirlendi.

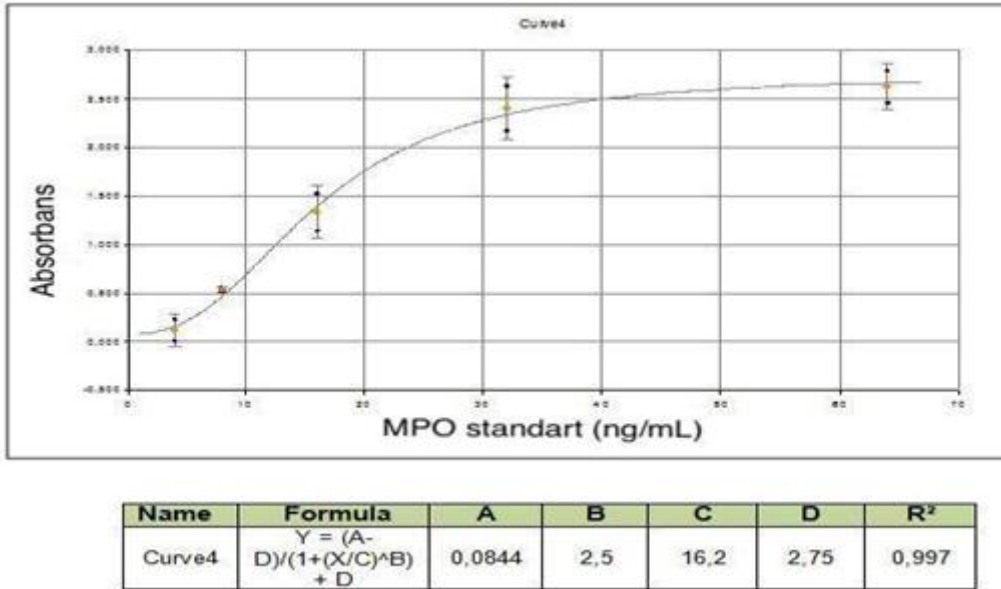
MPO serum ELISA protokolü:

1. Standartlar hazırlandı.
2. Standart kuyucuğuna 50 µl ve 50 µl streptavidin-HRP pipetlendi. Örnek kuyucuğuna 40 µl örnek serumu ve 10 µl biotin ile işaretli MPO antikorları eklendi. Bu aşamada blank kuyucuğu boş bırakıldı.
3. Plate 1 saatlik 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.



4. İnkübasyon sonrası ELİSA Washer cihazında 5 kere yıkandı.
5. Tüm kuyucuklara (blank, standart, örnek) 50 µl Kromojen A ve 50 µl Kromojen B eklendi.
6. Plate 10 dk'lık 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
7. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa enzimatik reaksiyonu durdurmak için 50 µl stop solüsyonu eklenerek, iyice karıştırıldı. 10 dk içerisinde absorbansları 450 nm dalga boyunda okutuldu.

Hesaplama: Seri dilüsyonla hazırlanan standartlar, blank ve serum örneklerinin konsantrasyonları BioTek SYNERGY 4 Multi- Detection Microplate reader cihazında, MPO Gen5™ programı kullanılarak hesaplandı.



Şekil 16. MPO kalibrasyon grafiği

### 3.2.12. Serumda TBARS ölçümü

Çalışmamızda lipid peroksidasyon düzeyini ölçmek için, Singh ve ark. (2000) tarafından tarif edilen tiyobarbitürik asid-reaktif substansları (maddeleri) (TBARS) metodu kullanıldı. Kullandığımız spektrofotometrik yöntem, lipid peroksidasyonunun ürünlerinden olan malondialdehit (MDA) ile tiyobarbitürik asidin reaktif ürünlerinin reaksiyona girmesine dayanır.

Reaktif ve standartların hazırlanması:

1. Tiyobarbitürik asit (TBA): 52 mM, pH: 2,1

0.748 g TBA tartılıp, 1M 60 mL glasiyal asetik asit içerisinde çözüldü ve NaOH ile pH'sı 2.1'e getirildi. Hacim balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

2. Tampon çözelti:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 100 mM, pH: 7,4

6,804 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 8,75 gr  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  tartıldı, bir miktar distile su ile çözüldükten sonra, NaOH ile pH 7,4'e getirildi ve çözelti miktarı balon jodede 500 mL'ye tamamlandı.

3. Standart MDA: 10  $\mu\text{mol/L}$

6M olan ana stoktan 16,6  $\mu\text{l}$  alındı ve distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. 1000  $\mu\text{mol/L}$  olan solüsyondan kullanımdan hemen önce 1/100 dilüsyon yapılarak ve 1 ml stok solüsyonu hazırlandı. Elde edilen 10  $\mu\text{mol/L}$  stoktan seri dilüsyon ile 5; 2.5; 1.25; 0.625; 0.312; 0.156  $\mu\text{mol/L}$  olacak şekilde standartlar hazırlandı.

4. Trikloroasetikasit (TCA): %30'luk

30 gr TCA tartıldı ve bir miktar distile suda çözüldü. Çözelti miktarı balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

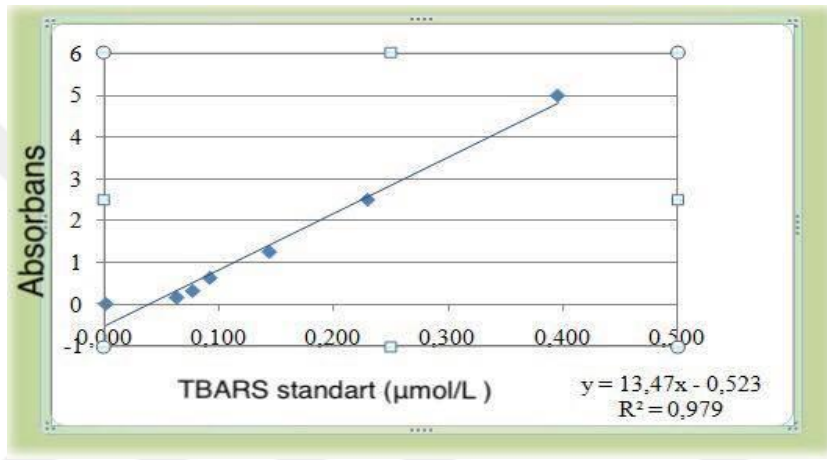
Test prensibi:

Çalışmamızda buharlaşmayı önlemek için vidalı kapaklı tüpler kullanıldı. Kullanılan prosedür tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri düzeyi tayini

	Numune	Standart	Blank
<b>Serum</b>	200 $\mu\text{l}$	-	-
<b>Standart</b>	-	200 $\mu\text{l}$	-
<b>Deiyonize su</b>	-	-	200 $\mu\text{l}$
<b>Tampon</b>	800 $\mu\text{l}$	800 $\mu\text{l}$	800 $\mu\text{l}$
<b>TCA</b>	250 $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$
<b>TBA</b>	250 $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$

Serum ve reaktifler vortekslendikten sonra, 45 dk 80 °C’de su banyosuna inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi dolduğu zaman, örnekler oda ısısında 10 dk 3000 rpm’de santrifüj edildi. Numunelerin absorbansları 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede (SHIMADZU, UV-160 A) ölçüldü. Standartların konsantrasyonlarının absorbanslarına bölünmesiyle elde edilen kalibrasyon grafiği ile lineer regresyon analizi ( $y=13,47x-0,523$ ) yapıldı. Örneklerdeki TBARS miktarı  $\mu\text{mol/L}$  olacak şekilde hesaplandı.



Şekil 15. TBARS kalibrasyon grafiği

### 3.2.13. Serumda TNF- $\alpha$ ölçümü

Serum TNF- $\alpha$  düzeyleri ELISA yöntemi (YLBiont Rat tumor necrosis factor TNF- $\alpha$ , ELISA Kit; Cat No: YLA0118RA) ile ölçüldü.

Bu kitin test prensibi: Serum örnekleri TNF- $\alpha$  antikorları ile kaplı kuyucuklara pipetlendi. Bu antikorlara bağlanan serumdaki TNF- $\alpha$  enziminin üzerine biotinlenmiş TNF- $\alpha$  antikorları ilave edildi. Oluşan bu komplekse HRP-konjugat streptavidin eklendi. Kompleks Kromojen A ve Kromojen B ile oluşan rengin yoğunluğuna göre TNF- $\alpha$  düzeyi belirlendi.

TNF- $\alpha$  serum ELISA protokolü:

1. Standartlar hazırlandı.

2. Standart kuyucuğuna 50 µl ve 50 µl streptavidin-HRP pipetlendi. Örnek kuyucuğuna 40 µl örnek serumu ve 10 µl biyotinlenmiş TNF-α antikorları eklendi. Bu aşamada blank kuyucuğu boş bırakıldı.

3. Plate 1 saatlik 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.

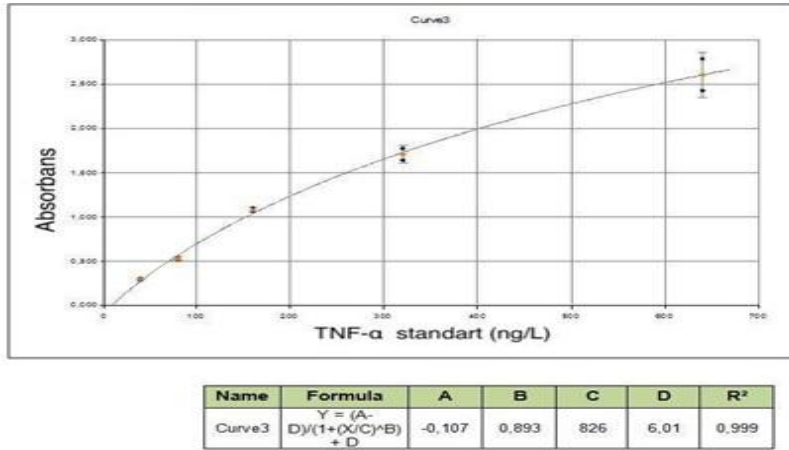
4. İnkübasyon sonrası ELİSA Washer cihazında 5 kere yıkandı.

5. Tüm kuyucuklara (blank, standart, örnek) 50 µl Kromojen A ve 50 µl Kromojen B eklendi.

6. Plate 10 dk’lık 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.

7. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa enzimatik reaksiyonu durdurmak için 50 µl stop solüsyonu eklenerek, iyice karıştırıldı. 10 dk içerisinde absorbansları 450 nm dalga boyunda okutuldu.

Hesaplama: Seri dilüsyonla hazırlanan standartlar, blank ve serum örneklerinin konsantrasyonları BioTek SYNERGY 4 Multi- Detection Microplate reader cihazında 4TNF-α ELISA Gen5™ programı kullanılarak hesaplandı.



Şekil 17. TNF-α kalibrasyon grafiği

### 3.2.14. Histopatolojik değerlendirme

Karaciğer doku örnekleri %10'luk nötral, tamponlanmış formaline fikse edildi ve parafine gömüldü. Örneklerden 4 mikron kesit alınarak, Hematoksilen Eozin (H&E) boyası ile boyandı, akabinde ışık mikroskopisi (Olympus Optical Co, Osaka, Japan) altında enflamasyon ve doku hasarı incelendi. Örneklerin fotoğrafları kaydedildi.

Sinüzoidal konjesyon, hepatosit nekrozu, hepatositlerde şişme (balonlaşma dejenerasyonu) Suzuki skorlama sistemine göre değerlendirildi (Suzuki ve ark.,1991, Nong ve ark., 2016). Bu skorlama sistemine göre:

- a) Nekroz, konjesyon, hepatositlerde şişme ve portal enflamasyon hiç yoksa skor "0"
- b) Minimal konjesyon, tek hücre nekrozu ve şişme varsa skor "1"
- c) Hafif konjesyon , < % 30 nekroz veya şişme varsa skor "2"
- d) Orta derecede konjesyon, < % 60 nekroz veya şişme varsa skor "3"
- e) Şiddetli derecede konjesyon , > % 60 nekroz veya şişme var ise skor "4" olarak alındı.

### 3.2.15. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi

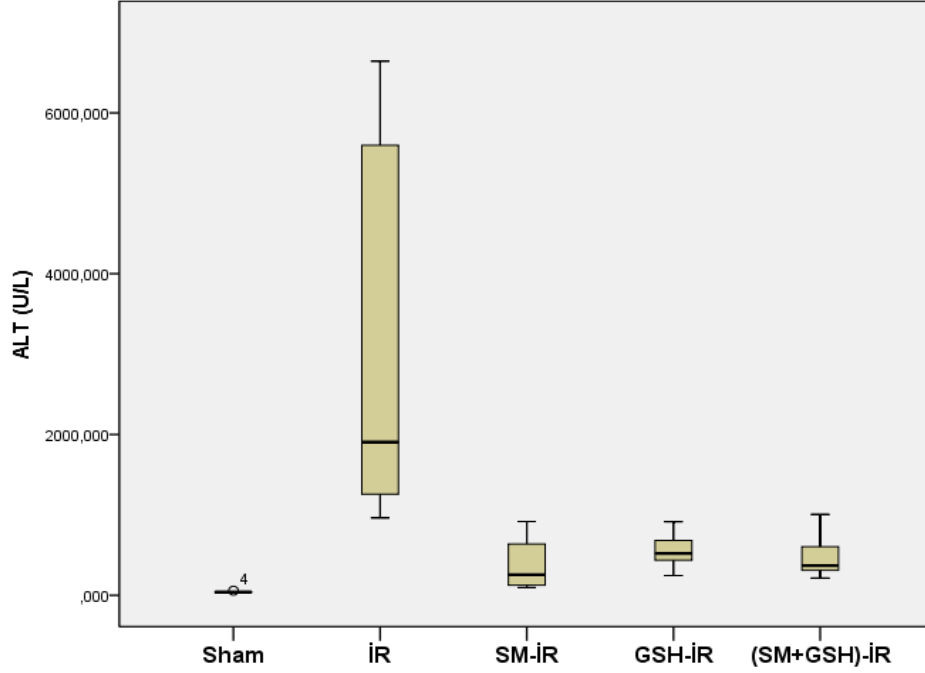
İstatistiksel sonuçları OMÜ Tıp Fakültesi Halk-Sağlığı Anabilim Dalında IBM SPSS Statistics 22.00 programı kullanılarak değerlendirildi. Gruplardaki değerlerin normal dağılıma uygunluğunu değerlendirmek için Shapiro Wilks testi kullanıldı. Normal dağılım göstermediği için, nonparametrik testlerden ikişer grup karşılaştırılmasında medyan değer kullanıldı ve karşılaştırma için Mann-Whitney U testi yapıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak  $p < 0.05$  alındı. Elde ettiğimiz değerler medyan (min-max) şeklinde ifade edildi.

#### **4. BULGULAR**

Yaptığımız iskemi-reperfüzyon hayvan deney modelinde (Sham, İR, SM-İR, GSH-İR, (SM+GSH)-İR grupları) elde ettiğimiz serum örneklerinde: hepatosellüler hasar belirteçlerinden ALT ve AST aktiviteleri; oksidatif stres belirteçleri (marker) MPO ve TBARS düzeylerini ve enflamasyon belirteçlerinden TNF- $\alpha$  düzeylerinin ölçümleri yapıldı. Aynı zamanda karaciğer dokusu histopatolojik olarak incelendi. Daha sonra kullandığımız maddelerin (SM ve GSH) hepatoprotektif olup olmadığı dair verilerin istatistiksel analizi yapıldı. İstatistiksel olarak  $p < 0.05$  olan değer, anlamlı olarak kabul edildi.

##### **4.1. Gruplarda serum ALT aktiviteleri**

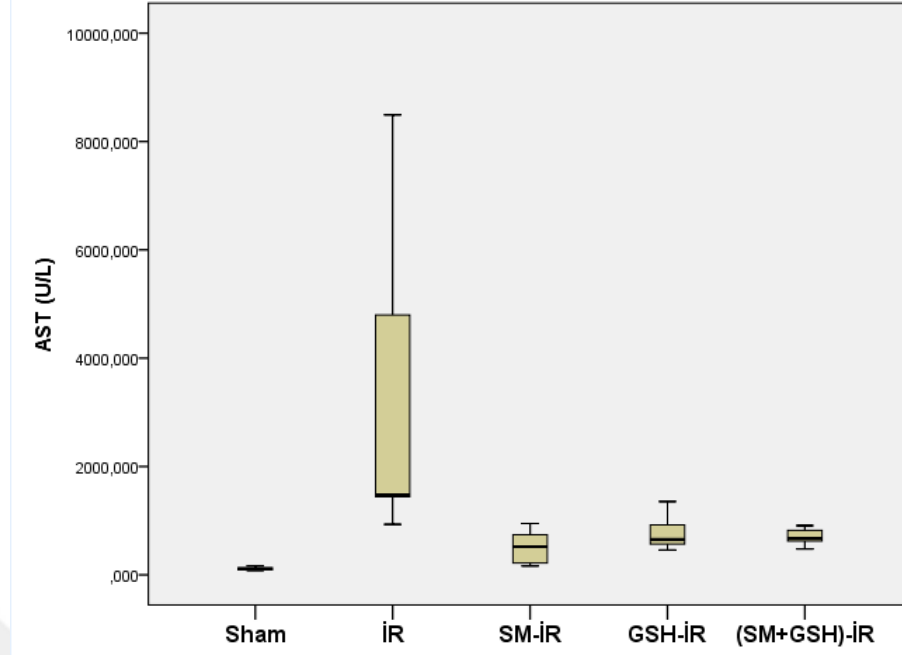
Sham grubu ile İR grubunun serum ALT aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ( $p < 0.001$ ). Sham grubu ile karşılaştırıldığında ilaç uygulanan SM-İR, GSH-İR ve (SM+GSH)-İR gruplarının hepsinde serum ALT aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ( $p < 0.001$ ). İR grubu ile ilaç uygulanan SM-İR, GSH-İR ve (SM+GSH)-İR gruplarının hepsinde serum ALT aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ( $p < 0.001$ ). SM-İR grubu ile GSH-İR ve (SM+GSH)-İR grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. GSH-İR grubu ile (SM+GSH)-İR grubunun serum ALT aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (bkz., Şekil 18, Tablo 2).



Şekil 18. Çalışma gruplarında serum ALT aktiviteleri

#### 4.2. Gruplarda serum AST aktiviteleri

Sham grubu ile İR grubunun serum AST aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ( $p < 0.001$ ). Sham grubu ile karşılaştırıldığında ilaç uygulanan SM-İR, GSH-İR ve (SM+GSH)-İR gruplarının hepsinde, serum AST aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ( $p < 0.001$ ). İR grubu ile ilaç uygulanan SM-İR, GSH-İR ve (SM+GSH)-İR gruplarının hepsinde serum AST aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ( $p < 0.001$ ). SM-İR grubu ile GSH-İR ve (SM+GSH)-İR grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. GSH-İR grubu ile (SM+GSH)-İR grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (bkz., Şekil 19, Tablo 2).

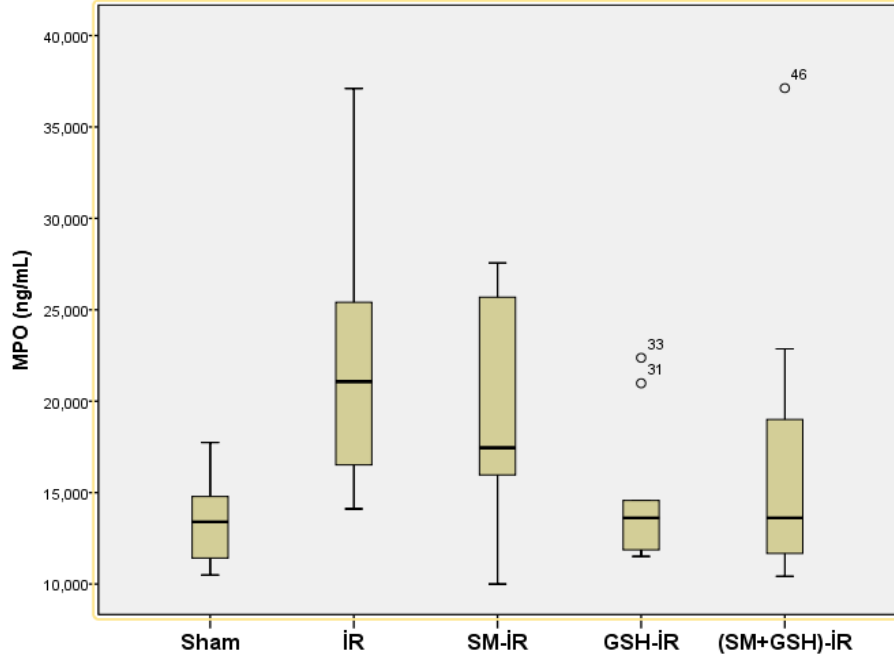


Şekil 19. Çalışma gruplarında serum AST aktiviteleri

#### 4.3. Gruplarda serum MPO düzeyleri

Sham grubu ile İR grubunun serum MPO düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ( $p= 0.002$ ). Sham grubu ile ilaç uygulanan SM-İR, GSH-İR ve (SM+GSH)-İR gruplarının hepsinde serum MPO düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar saptanmadı. İR grubu ile GSH-İR ve (SM+GSH)-İR gruplarının serum MPO düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ( $p=0.005$ ,  $p=0.019$ ). Fakat İR grubu ile SM-İR grubunun serum MPO düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmadı. SM-İR grubu ile GSH-İR ve (SM+GSH)-İR gruplarının serum MPO düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. GSH-İR grubu ile (SM+GSH)-İR grubunun serum MPO düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (bkz., Şekil 20, Tablo 2).

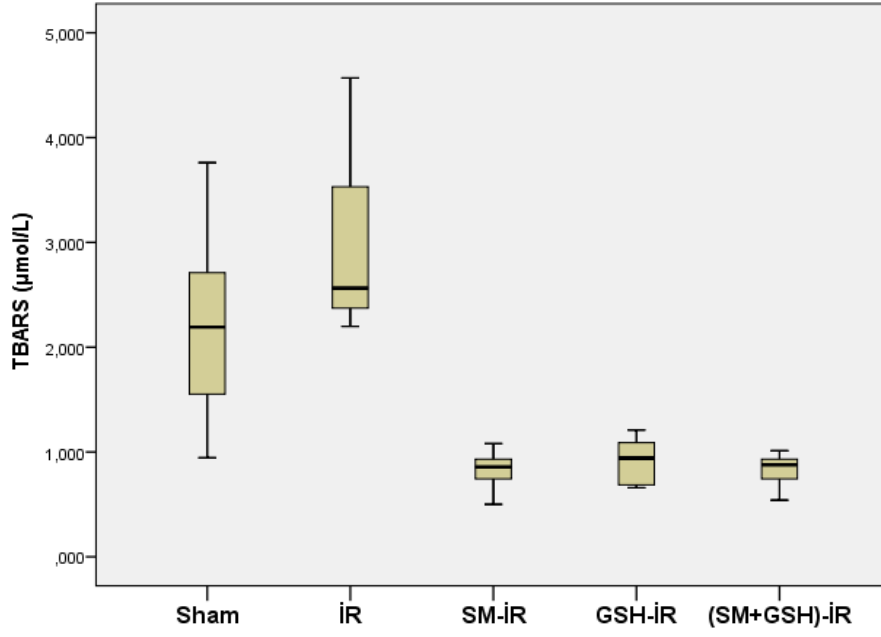




Şekil 20. Çalışma gruplarında serum MPO düzeyleri

#### 4.4. Gruplarda serumda TBARS düzeyleri

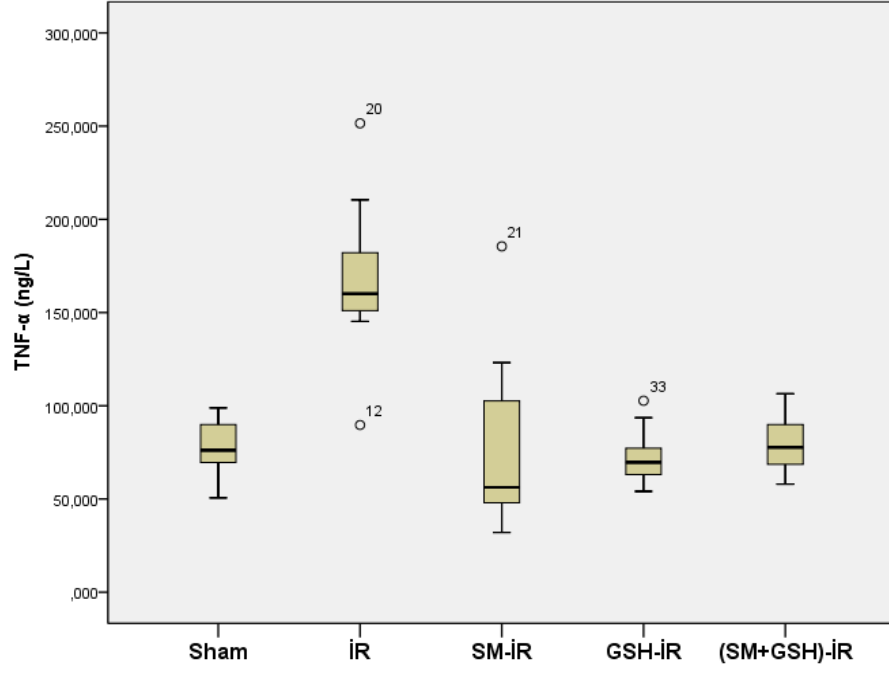
Sham grubu ile İR grubunun serum TBARS düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmadı. Sham grubu ile ilaç uygulanan SM-İR, GSH-İR ve İR-(SM+GSH) gruplarının serum TBARS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). İR grubu ile karşılaştırıldığında SM-İR, GSH-İR ve İR-(SM+GSH) gruplarının serum TBARS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar saptandı ( $p < 0.001$ ). SM-İR grubu ile GSH-İR ve (SM+GSH)-İR-GSH grubu ile (SM+GSH)-İR grubunun serum TBARS düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (bkz., Şekil 21, Tablo 2).



Şekil 21. Çalışma gruplarında serum TBARS düzeyleri

#### 4.5. Gruplarda serumda TNF- $\alpha$ düzeyleri

Sham grubu ile İR grubunun serum TNF- $\alpha$  düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ( $p < 0.001$ ). Sham grubu ile ilaç uygulanan SM-İR, GSH-İR ve (SM+GSH)-İR gruplarının hepsinde serum TNF- $\alpha$  düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmadı. İR grubu ile SM-İR, GSH-İR ve (SM+GSH)-İR grupların serum TNF- $\alpha$  düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ( $p = 0.003$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). SM-İR grubu ile GSH-İR ve (SM+GSH)-İR grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. GSH-İR grubu ile (SM+GSH)-İR grubunun serum TNF- $\alpha$  düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (bkz., Şekil 22, Tablo 2).



Şekil 22. Çalışma gruplarında serum TNF- $\alpha$  düzeyleri

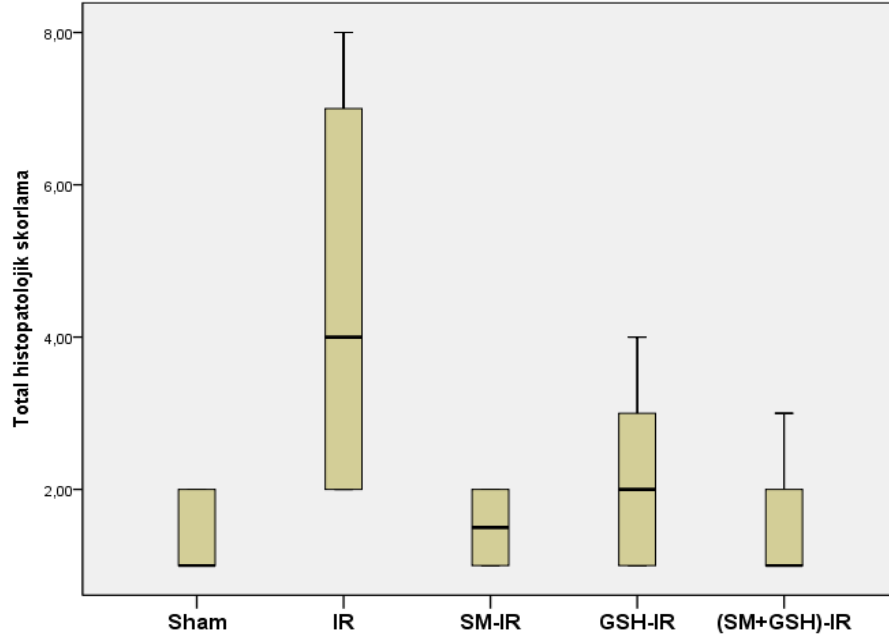
**Tablo 2.** Her bir grupta belirlenen parametrelerin median (min-max) değerleri

Gruplar (n=10)	Parametreler				
	ALT (U/L)	AST (U/L)	MPO (ng/mL)	TBARS ( $\mu$ mol/L)	TNF- $\alpha$ (ng/L)
Sham	39,00 (36,00-58,00)	108,00 (83,00-166,00)	13,39 (10,50-17,74)	2,19 (0,94-3,76)	76,12 (50,61-98,80)
İR	1904,00 (963,00- 6644,00)	1469,00 (933,00- 8492,00)	21,07 (14,11-37,10)	2,56 (2,2-4,57)	160,10 (89,69-251,50)
SM-İR	255,00 (97,00-918,00)	519,00 (163,00-947,00)	17,45 (10,00-27,56)	0,86 (0,50-1,08)	56,21 (32,05-185,50)
GSH-İR	520,00 ( 245,00-916,00)	652,00 (457,00- 1352,00)	13,62 (11,51-22,37)	0,94 (0,66-1,21)	69,69 (54,12-102,70)
(SM+GSH )-İR	370,00 (215,00- 1005,00)	671,00 (478,00- 909,00)	13,62 (10,42-37,12)	0,88 (0,54-1,01)	77,65 (57,93-106,46)

#### 4.6. Karaciğer dokusunun histopatolojik bulguları

Sık kullanılan Suzuki skorlama sistemine göre her grupta karaciğer dokusu kesitleri değerlendirildi (Suzuki ve ark.,1991, Nong ve ark., 2016). Sham grubundaki incelenen karaciğer dokusu kesitlerinde düzenli lobular görüntüye sahip belirgin konjesyon, enflamasyon ve hücresel şişme içermeyen hepatik dokusu izlenmektedir (bkz., Şekil 24). İR grubunda karaciğer parankiminde çok sayıda enflamatuvar hücreler ile çevrili hepatositler, belirgin konjesyon gözlenmiştir (bkz., Şekil 25). SM-İR grubunda santral ven çevresindeki hepatositlerde hafif vakuoler dejenerasyon görülmektedir (bkz. Şekil 26). GSH-İR grubunda hafif konjesyon görülmektedir (bkz., Şekil 27). (SM+GSH)-İR grubunda hafif konjesyon ve sinüzoidal dilatasyon içeren karaciğer parankimi izlenmektedir (bkz., Şekil 28).

Suzuki skorlama sonucu elde ettiğimiz total skor verilerinin gruplar arası karşılaştırdığımızda (bkz., Şekil 23, Tablo3, 4), Sham grubu ile İR grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ( $p < 0,001$ ). Sham grubu ile ilaç uygulanan SM-İR, GSH-İR ve (SM+GSH)-İR gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. İR grubu ile ilaç uygulanan SM-İR, GSH-İR ve (SM+GSH)-İR gruplar arasında istatistiksel olarak azalma saptandı ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,013$ ,  $p = 0,002$ ). SM-İR grubu ile GSH-İR ve (SM+GSH)-İR gruplarını karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Aynı zamanda GSH-İR ve (SM+GSH)-İR gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.



Şekil 23. Her bir grupta incelenen karaciğer total histopatolojik skörları

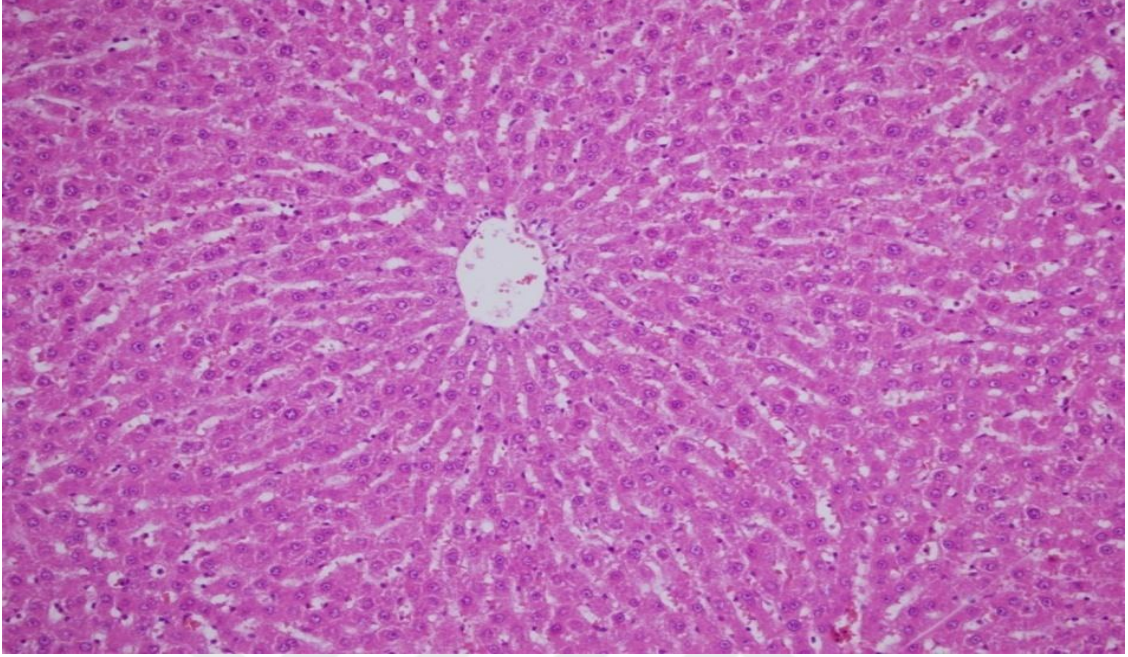
Tablo 3. Her bir grupta incelenen karaciğer total histopatolojik skörların median (min-max) değerleri

	Gruplar				
	Sham (n=10)	İR (n=10)	SM-İR (n=10)	GSH-İR (n=10)	(SM+GSH)-İR (n=10)
<b>Histopatolojik skörlama</b>	1 (1-2)	4 (2-8) <sup>a</sup>	1,5 (1-2) <sup>b</sup>	2 (1-4) <sup>b</sup>	1 (1-3) <sup>b</sup>

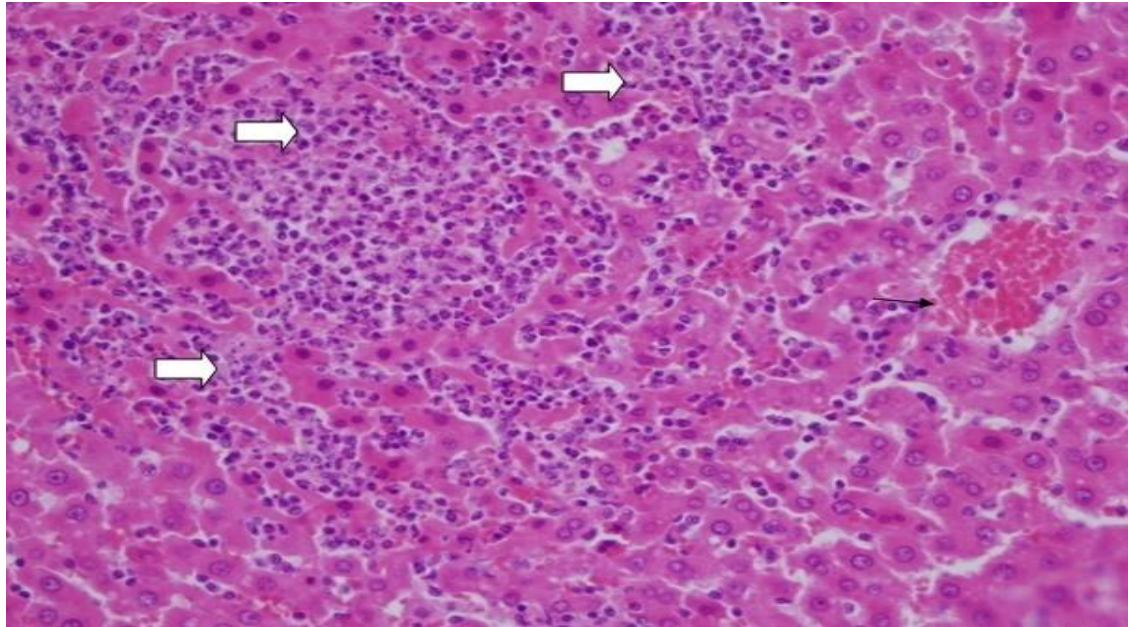
a: Sham grubuna göre istatıksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ )

b: İR grubuna göre istatıksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ )

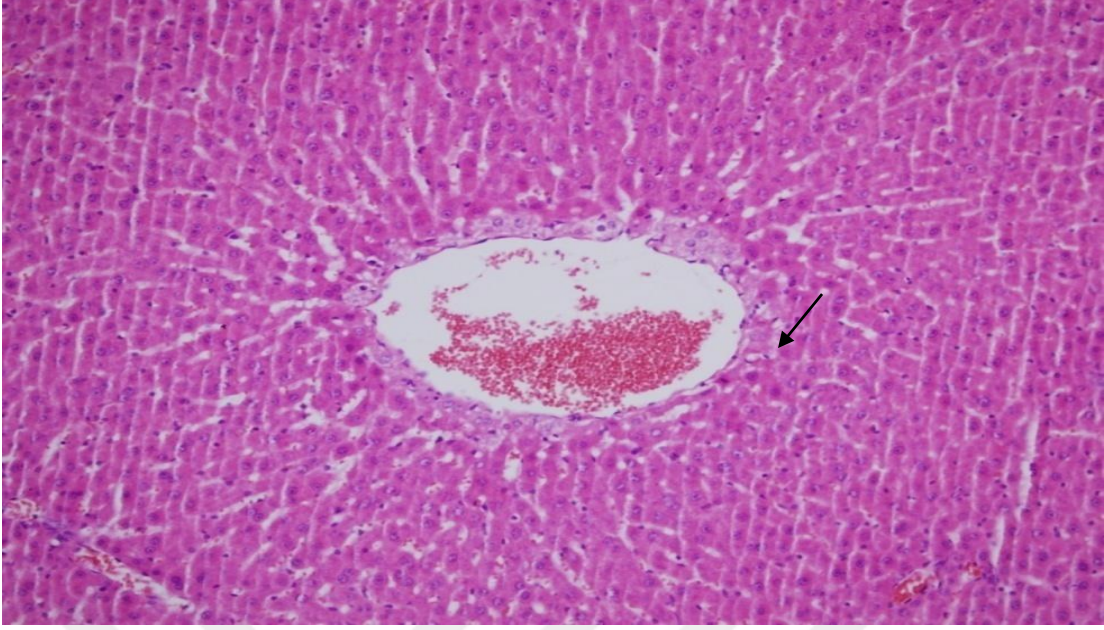
#### 4.7. Karaciğer dokusunun histopatolojik görüntüleri



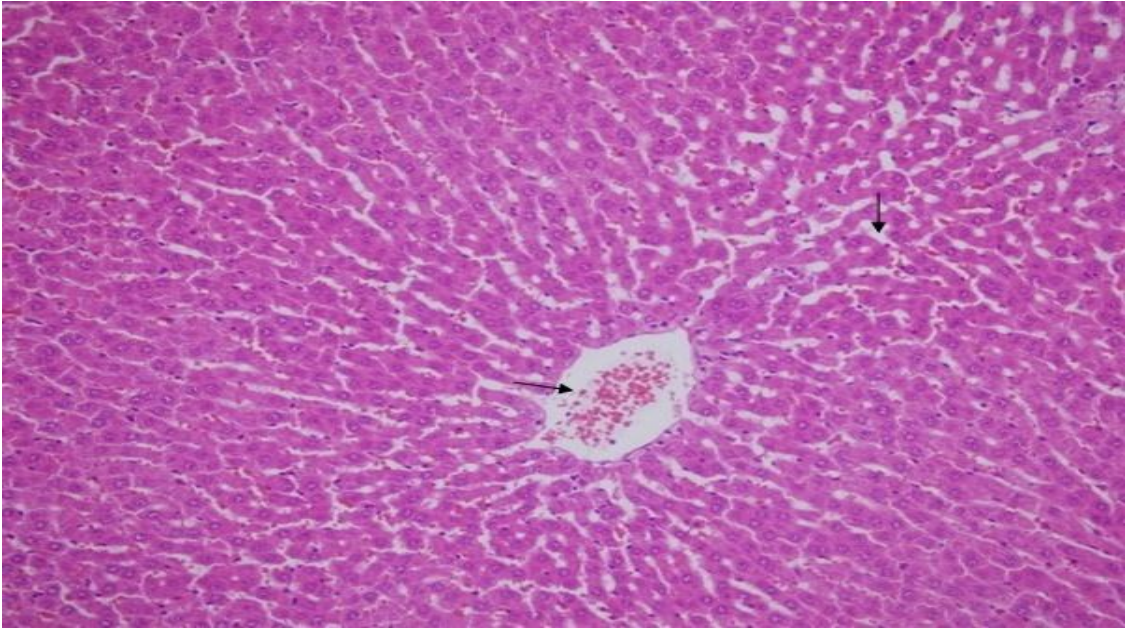
Şekil 24. Sham grubunda düzenli lobular görüntüye sahip belirgin konjesyon, enflamasyon ve hücresel şişme içermeyen karaciğer dokusu, H&E X200



Şekil 25. İR grubunda çok sayıda enflamatuar hücreler ile çevrili hepatositler, belirgin konjesyon içeren karaciğer parankimi (beyaz oklar enflamatuar hücreler, siyah ok konjesyon), H&E X400

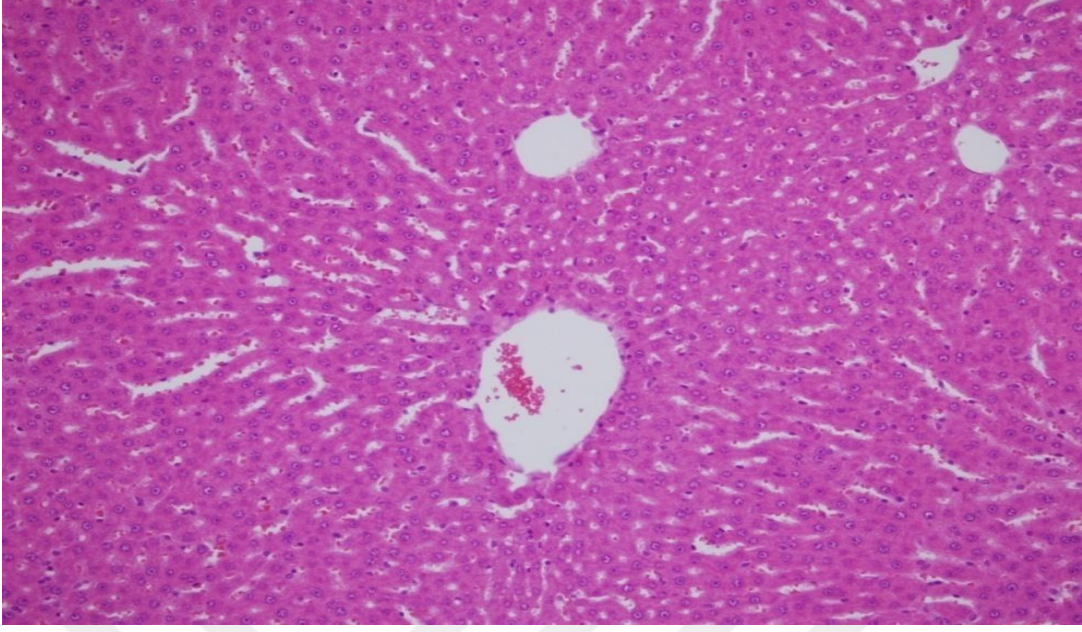


**Şekil 26.** SM-İR grubunda santral ven çevresindeki hepatositlerde hafif vakuoler dejenerasyon (siyah ok) ve konjesyon içeren karaciğer parankimi, H&E X400



**Şekil 27.** GSH-İR grubunda hafif konjesyon (siyah oklar) içeren karaciğer parankimi, H&E X200





**Şekil 28.** (SM+GSH)-İR grubunda hafif konjesyon ve sinüzoidal dilatasyon içeren karaciğer parankimi, H&E X200

**Tablo 4.** Karaciğer dokusunun histopatolojik skorlaması

<b>Sham (n=10)</b>	<b>Konjesyon</b>	<b>Hidropik şişme</b>	<b>Nekroz</b>	<b>Toplam skor</b>
1	1	0	0	1
2	1	0	0	1
3	1	0	0	1
4	1	0	0	1
5	1	1	0	2
6	1	0	0	1
7	1	0	0	1
8	1	1	0	2
9	1	1	0	2
10	1	1	0	2
<b>İR (n=10)</b>				
1	1	1	0	2
2	3	3	1	7
3	3	2	3	8
4	2	1	1	4
5	1	1	0	2
6	2	2	3	7
7	3	2	2	7
8	3	1	0	4
9	1	1	0	2
10	2	1	0	3
<b>SM-İR (n=10)</b>				
1	1	1	0	2
2	1	1	0	2
3	1	0	0	1
4	1	0	0	1
5	1	0	0	1
6	2	0	0	2
7	1	0	0	1
8	1	1	0	2
9	2	0	0	2
10	1	0	0	1
<b>GSH-İR (n=10)</b>				
1	1	0	0	1
2	1	0	0	1
3	1	0	0	1
4	1	1	2	4
5	1	1	0	2
6	1	1	1	3
7	1	1	0	2
8	1	1	1	3
9	2	0	0	2
10	1	1	0	2
<b>(SM+GSH)-İR (n=10)</b>				
1	1	1	1	3
2	1	0	0	1
3	1	0	0	1
4	1	0	0	1
5	1	0	0	1
6	1	0	0	1
7	1	0	0	1
8	1	1	1	3
9	1	1	0	2
10	1	1	0	2

## 5. TARTIŞMA

Karaciğer İR hasarı, karaciğer cerrahi girişimleri sırasında kan akışının kısmen veya tamamen kesilmesine bağlı oluşan komplikasyonlardan birisidir. Bir organın İR sırasında oluşan hasarına karşı koruma amaçlı ön tedavi uygulanabilir.

Karaciğer İR hasarına karşı karaciğer parankimal dokusunu koruma amacı ile birçok farmakolojik ajanların araştırılması güncellik kazanmıştır. Bu ajanlar arasında karnozin, parikalsitol, tert-butilhidroguonin, apigenin, melatonin, askorbik asit,  $\alpha$ -lipoik asit ve diğerleri yer almaktadır (Deng ve ark., 2016; Tsaroucha ve ark., 2016; Cannistra ve ark., 2016; Fouad ve ark., 2017; Kim ve ark., 2017).

Son yıllarda ise SM'in teropotik ajan olarak farmakolojik etkisi, farklı hastalık durumlarında, özellikle karaciğer hastalıklarında tedavi edici rölü oldukça dikkat çekmektedir. SM'nin birçok etkiye sahip olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Bunlar; antioksidan, hepatoprotektif, antienflamatuar, antifibrotik, proapopitotik, antikarsinojen, antidiabetik, antihepatotoksik etkileri kapsamaktadır. Ayrıca hücresel canlılığı arttırdığı, mitokondriyal bütünlüğü sağladığı, oksidatif stresi azalttığı, apoptozis ve hücrenel nekrozu azalttığına dair araştırmalar mevcuttur (Bahmani ve ark., 2015; Federico ve ark., 2017).

GSH, hücre fonksiyonları ve hücre hayatta kalması için kritik öneme sahiptir. Toksik karaciğer, kronik viral hepatitler, kronik alkololik hepatitler, steatohepatit ve farklı kanser hücreleri üzerinde GSH etkisi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Forman ve ark., 2009; Yuan ve Kaplowitz, 2009; Wu ve Batist, 2013).

Yapılan bir çalışmada SM'nin etkin bir antioksidan fonksiyonu ilişkisinde, 40 dk.'lık karaciğer iskemi öncesinden intraperitoneal yolla SM (100 mg/kg) uygulanmıştır. İskemi grubundaki ratlarda İR hasarı %70 iken, tedavi verilen gruplarda %25 olduğu saptanmıştır. Ayrıca İR grubu ile kıyaslandığında serum ALT ve AST değerleri de SM verilen grupta azalmıştır. Böylece SM'nin karaciğer İR hasarın erken fazında sitoprotektif ve antioksidan etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda histopatolojik inceleme sonuçlarında SM'nin karaciğer İR üzerine koruyucu etkisi görülmüştür (Oliveira ve ark., 2001).

Liu ve ark. (2013) ise ratlarda oluşturdukları karaciğer İR modelinde (1 saat iskemi ve 1 saat reperfüzyon) SM'nin hepatik hasarın erken fazında antioksidan ve antienflamatuar etkisi incelemiştir. Bunun için serumda ALT, AST, MDA ve TNF- $\alpha$  düzeyleri ölçölmüş ve bu parametrelerde anlamlı düşüş saptanmıştır. Daha çok karaciğerde, yanı sıra kalp ve iskelet kasında bulunan transaminaz enzimleri, hücrenin sitozolünde (hem ALT, hem AST) ve mitokondrisinde (AST) hepatosellöler hasarı gösterirler. Yüksek transaminaz seviyeleri ciddi hasar göstergesidir. Böylece yapılan araştırmada serumdaki transaminaz enzim düzeylerinin karaciğer İR hasarının derecesini doğrudan yansıtabileceği düşöndürmektedir. Bu çalışmada ayrıca lipid peroksidasyon markeri olan MDA bakılmıştır. MDA oksidatif hasar göstergesi olarak, SM ile tedavi edilen grupta anlamlı azalma göstermiştir.

Oliveira ve ark. (2001) ve Liu ve ark. (2013) yaptıkları çalışmalara benzer olarak, çalışmamızda SM'nin antioksidan ve antienflamatuar etkilerini olduğu gözökmektedir. Fakat bu çalışmalardan farklı olarak, çalışmamızda SM'nin karaciğer İR hasarının geç fazında da etkin olduğunu gözlemledik. Böylece, araştırmamızda serum transaminazlar, oksidatif stres belirteçleri (MPO, TBARS) ve TNF- $\alpha$  üzerine anlamlı azalma saptanmıştır. Aynı zamanda yaptığımız histopatolojik inceleme sonuçları SM'nin hepatoprotektif etkilerini daha önce yapılan çalışmalara benzer şekilde doğrulamaktadır.

Hücre költürü çalışması sonuçları SM'nin antienflamatuar ve immünoregölatör etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir. SM'nin T lenfositler, CD4 + ve CD8 + T hücreleri üzerinde baskılayıcı etkisi rapor edilmiştir (Lovelace ve ark., 2017).

Guo ve ark. (2016) farelerde oluşturdukları diyete bağlı obezite üzerine SM'in antienflamatuar etkilerini belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışmada SM ile uygulanan farelerin serumunda sitokinlerden TNF- $\alpha$ , İL-1 $\beta$  ve İL-6 düzeylerinde azalma saptanmıştır. Younis ve ark. (2016) yaptıkları in vivo çalışmada safra kanalı kapatılmış ratlara 3 hafta boyunca her gün oral yolla SM (125 mg/kg) verilmiştir. Sonrasında karaciğer fonksiyon testleri, oksidatif stres ve fibroz/fibrogenez süreci biyokimyasal ve histopatolojik olarak incelenmiştir. Böylece SM'nin antioksidan, antifibrotik ve antienflamatuar etkilere sahip olabileceği sonucuna varılmıştır.

Başka bir hayvan deney modelinde, ratlarda asetaminofen ile indüklenen hepatotoksositeye karşı SM uygulanmıştır. Böylece SM'nin antioksidan ve antitoksik aktivitesi gösterilmiştir (Reddy ve ark., 2017).

SM'nin hepatoprotektif etkiye sahip olup, karaciğerin morfofonksiyonel ve biyokimyasal değişimlerinin üzerinde ne kadar etkili olacağına dair insan çalışmaları da yapılmıştır. Akut viral hepatitli hastalara 140 mg dozda günde 3 defa SM verilmiştir. Çalışmanın 6. gününde ALT, AST ve total bilirubin düzeylerinde anlamlı azalma görülmüştür. Farklı deneyde kronik alkol tüketimine bağlı karaciğer hastalarında, SM'nin serum ALT, AST, GGT ve prokollajen III seviyeleri üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmaların sonuçlarına dayanarak, SM'nin antienflamatuvar ve antioksidan etkisi ortaya çıkmıştır (Flora ve ark., 1998).

Schauer ve ark. (2004) yaptıkları çalışmanın sonucu:

a) GSH'nun reperfüzyon sırasında intravenöz infüzyonu, uzun süreli sıcak iskemiyeye maruz kalan karaciğer dokusunda, parankimal hasarın yanı sıra mikrovasküler reperfüzyon hasarında belirgin bir azalmaya neden olmaktadır.

b) Sitoprotektif etkisinin asıl mekanizması nekrotik hücre hasarının azaltılması gibi gözükmemektedir.

c) GSH tedavisi, plazma AST ve ALT düzeylerinde belirgin şekilde azalmaya neden olmaktadır. Aynı zamanda GSH ile tedavi edilen hayvanlarda apoptotik hepatositler nadir gözükmemektedir.

d) GSH uygulanması, hücre içi GSH durumunu etkilememekte, fakat vasküler antioksidan kapasitesini arttırarak hücre dışı ROT'in detoksifikasyonunu arttırmaktadır.

Bilzer ve ark. (2002) çalışmalarında oluşturdukları karaciğer iskemi-reperfüzyon modelinde reperfüzyon üzerine ekstraselüler GSH konsantrasyonunun arttırarak gadolinyum klorid ile KH blokajı uygulamışlardır. Böylece karaciğer İR hasarında belirgin azalma gözlemlemişlerdir. Çalışmada GSH uygulaması, seçici KH aktivasyonunu takiben karaciğer hasarını önlediği, fakat karaciğer fonksiyonunu etkilemediği gösterilmiştir. GSH ile tedavinin KH'den salgılanan hidrojen peroksiti parçalayan glutatyon peroksidaz aktivitesini arttırarak hücre hasarını azalttığı

gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak GSH'nun karaciğer İR hasarında antioksidan etkisi düşünülmektedir.

Xue ve ark. (2008) ratlarda oluşturdukları karaciğer iskemi-reperfüzyon modelinde portal venden iskemi öncesi glutatyon uygulamışlar, bu çalışma sonucunda GSH'nun hasarı önleyici olabileceği sonucuna varmışlardır. Böylece GSH'nun iskemi-reperfüzyon hasarında oluşan ROT'e karşı antioksidan ve antienflamatuar etki göstererek, hepatoprotektif aktivite gösterdiği iddia edilmektedir. Histoimmünoloji inceleme sonucunda, karaciğer dokusuna nötrofillerin infiltrasyonunu azaltarak, GSH'nun antienflamatuar etkisinin olabileceği ileri sürülmüştür. Bu çalışmada ayrıca serum örneklerinde ALT, AST, MPO ve MDA değerleri İR hasarında yüksek ölçülmüştür, fakat GSH ile tedavi edilen grupta bu parametreler düşük bulunmuştur. Buradan hareketle, karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarının erken ve geç fazında GSH'nun etkili olduğu ifade edilmektedir.

Suyavaran ve ark. (2015) ratlarda oluşturdukları karaciğer İR modelinde (90 dk iskemi, 120 dk reperfüzyon) yarım saat iskemi öncesi GSH'nu 200 mg/kg doz şeklinde intraperitoneal yolla uygulamışlardır. İR hasarının erken fazı KH aktivasyonu ile karakterizeyken, geç fazda ise nötrofillerin aktivasyonu, progressif hepatik hasar ve ilerde fibrozis ile karakterize edilmektedir. Genç ve yaşlı ratlarda glutatyon ile yapılan ön tedavi, apoptozu ve TNF- $\alpha$  düzeyini azaltılmasıyla, mitokondriyal GSH/GSSG oranının düzenlenmesi ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Böylece, araştırmada GSH ile tedavi edilen gruplarda ALT, AST, TBARS, TNF- $\alpha$  serum düzeylerinde istatistiksel azalma saptanmıştır. Aynı zamanda GSH verilen grupta karaciğer histopatolojik bulguları iskemi-reperfüzyon grubuna kıyasta anlamlı olarak azalmıştır. Böylece GSH'nun İR hasarının erken fazında antioksidan ve antienflamatuar etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalara benzer şekilde bizim çalışmanın sonuçlarına göre; serum transaminaz enzim düzeyleri, TNF- $\alpha$ , MPO ve TBARS düzeyleri GSH verilen grupta düşük bulunmuştur. Karaciğer total patolojik bulguları İR gruba kıyasla düşük bulunmuştur. Buradan hareketle, 1 saat İR öncesi intraperitoneal yolla GSH (100mg/kg) uygulaması hepatoprotektif (antioksidan ve antienflamatuar olarak) aktivite gösterdiğini düşündürmektedir.

Başka bir hayvan deney modellerinde, ratlarda karbon tetraklorit ile oluşturulan akut hepatotoksik hasarda GSH'nun antienflamatuar ve antioksidan etki göstererek hepatoksiteye karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Arosio ver ark., 1997; Kantah ve ark., 2016).

Çalışmamızda SM ile GSH kombine uygulayanarak her iki bileşiğin total etkisi incelenmiştir. İR öncesi SM+GSH kombine verildiği grupta serum ALT, AST, MPO, TBARS ve TNF- $\alpha$  düzeylerinde istatikiel olmayan azalma saptanmasına rağmen, SM+GSH verilen grubun total patolojik skor ortalaması tek başına SM verilen gruba göre %66,6 ve tek başına GSH verilen gruba göre %50 azalma görülmüştür (bkz., Tablo 3). Bu bilgiler ışığında; SM+GSH kombine verildiğinde karaciğer histopatolojik hasarı daha etkinlikle azalttığı görülmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, karaciğer İR öncesi SM+GSH kombine ön tedavisi hepatik hasarın geç fazda oluşan oksidatif stresi ve enflamasyonu azaltmaktadır, böylece hepatik fonksiyon bozulması ve karaciğer hasarı önlenebilir. Karaciğer transplamtasyon ve cerrahi girişimleri sonrasında gelişen İR hasarına bağlı komplikasyonları önlemek amacıyla cerrahi öncesi SM+GSH tedavisi diğer tedavilerle sinerjik olarak kullanılabilir.

İleride yapılacak bilimsel çalışmalarda; deneysel hayvan sayısının artırılması, karaciğer dokusunda oksidatif stres markerları ve enflamasyon belirteçlerinin serum veya plazma düzeyleriyle birlikte değerlendirilmesi önerilir. Ayrıca silymarin+ glutatyon kombinasyonun klinik çalışmalarda dikkate alınmasının karaciğer İR hasarının önlenmesinde önemli olacağını düşünüyoruz.



## KAYNAKLAR

- Abanavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytother Res* 2010; 24(10): 1423-32.
- Abbas K, Mitchell F. Robbins Temel Patoloji. 8. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi. 2008; 1-903.
- Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol* 2014; 5: 196; doi: 10.3389/fphar.2014.00196.
- Arosio B, Santambrogio D, Gagliano N, Ryan A, Biasi F, Vergani C, Annoni G. Glutathione pretreatment lessens the acute liver injury by carbon tetrachloride. *Pharmacol Toxicol* 1997; 81(4): 164-8.
- Ashtiani HRA, Bakhshandi AK, Rahbar M, Mirzaei A, Malekpour A, Rastegar H. Glutathione, cell proliferation and differentiation. *Afr J Biotechnol* 2011; 10(34): 6348-6363.
- Bahmani M, Shirzad H, Rafieian S, Rafieian-Kopaei M. *Silybum marianum*: Beyond Hepatoprotection. *J Evid Based Complementary Altern Med* 2015; 20(4): 292-301.
- Bilzer M, Baron A, Schauer R, Steib C, Ebersberger S, Gerbes AL. Glutathione treatment protects the rat liver against injury after warm ischemia and Kupffer cell activation. *Digestion* 2002; 66(1): 49-57.
- Boigk G, Stroedter L, Herbst H, et al. Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. *Hepatology* 1997; 26: 643-9.
- Bokemeyer C, Fels LM, Dunn T, Voigt W, Gaedeke J, Schmoll H-J, Stolte H, Lentzen H. Silibinin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising cisplatin or ifosfamide anti-tumour activity. *Br J Cancer* 74 1996; 2036- 2041.
- Caldwell CC, Tschoep J, Lentsch AB. Lymphocyte function during hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Leukoc Biol* 2007; 82(3): 457-64.
- Cannistra M, Ruggiero M, Zullo A, Gallelli G, Serafini S, Maria M, Naso A, Grande R, Serra R, Nardo B. Hepatic ischemia reperfusion injury: A systematic review of literature and the role of current drugs and biomarkers. *Int J Surg* 2016; 33; 1: 57-70.

- Carden L. Donna, Granger D. Neil. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190(3): 255-66.
- Casillas-Ramírez A, Mosbah IB, Ramalho F, Roselló-Catafau J, Peralta C. Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantaion. *Life Sci* 2006; 79(20): 1881-94.
- Chen Y, Dong H, Thompson DC, Shertzer HG, Nebert DW, Vasiliou V. Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models. *Food Chem Toxicol* 2013; 60: 38-44.
- Chouchani ET, Pell VR, James AM, Work LM, Saeb-Parsy K, Frezza C, Krieg T, Murphy MP. A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion injury. *Cell Metab* 2016; 23(2): 254-63.
- Cnubben NH, Rietiens IM, Worterboer H, van Zanden J, van Bladeren PJ. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environ Toxicol Pharmacol* 2001; 10(4): 141-52.
- Couto N, Wood J, Barber J. The glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med* 2016; 95: 27-42.
- Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: insights from transgenic knockout models. *World J Gastroenterol* 2013; 19(11): 1683-98.
- Davis- Searles PR, Nakanishi Y, Kim NC, Graf TN, Oberlies NH, Wani MC, Wall ME, agarwal R, Kroll DJ. Milk thistle and prostate cancer: differential of pure flavonolignans from *Silybum marianum* on antiproliferative and points in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 2005; 65(10): 4448-57.
- Demir M, Amanvermez R, Kamalı Polat A, Karabıçak I, Çınar H, Kesicioğlu T, Polat C. The Effect of Silymarin on Mesenteric Ischemia-Reperfusion Injury. *Med Princ Pract* 2013; 23(2): 140-4.
- Deng WS, Xu Q, Liu Q, Jiang CH, Zhou H, Gu L. Effects of melatonin on liver function and lipid peroxidation in a reat model of hepatic ischemia/reperfusion injury. *Exp Ther Med* 2016; 11(5): 1955-1960.
- Dixit N, Baboota S, Kohli K, Ahmad S, Ali J. Silymarin: A review of and bioavailability enhancement approaches. *Indian J Phanrmacol* 2007; 39: 172-179.

- Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology* 2000; 62: 649-671.
- Federico A, dallio M, Loguercio C. Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. *Molecules* 2017; 22(2); pii: E191. doi: 10.3390/molecules22020191.
- Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K. Milk thistle (*Silybum Marianum*) for the therapy of the liver disease. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(2): 139-43.
- Fondevila C, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury- a fresh look. *Exp Mol Pathol* 2003; 74(2): 86-93.
- Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 2009; 30(1-2): 1-12
- Fouad AA, El-rehany MA, Maghraby HK. The hepaoprotective effect of carnosine against ischemia/reperfusion liver injury in rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 572(1): 61-8.
- Fraschini F, Demartini G, Esposti D. Pharmacology of Silymarin. *Clin Drug Invest* 2002; 22(1): 51-65.
- Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF. Unexpected low-dose toxicity of universal solvent DMSO. *FASEB J* 2014; 25(3): 1317-30.
- Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, Davidson BR, Seifalian AM. The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: a review. *Liver Transpl* 2005; 11(9): 1031-47.
- Go KL, Lee S, Zendejas I, Behrns KE, Kim JS. Mitochondrial Dysfunction and Autophagy in hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *Biomed Res Int* 2015;183469.
- Guan LY, Fu PY, Li ZN, Liu HY, Xin MG, Li W. Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide. *World J Gastrointest Surg* 2014; 6(7): 122-8.
- Guo Y, Wang S, Wang Y, Zhu T. Silymarin improved diet-induced liver damage and insulin resistance by decreasing inflammation in mice. *Pharm Biol* 2016; 54(2): 2995-3000.

- Hackett ES, Twedt DC, Gustafson DL. Milk thistle and its derivative compounds: a review of opportunities fortreatment of liver disease. *J Vet Intern Med* 2013; 27(1): 10-6.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5 Ed., New York, Oxford University Press 2015; 99-111.
- Harmut Jaeschke, Jonn J Lemasters. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 2003; 125(4):1246-57.
- Jiang C, Agarwal R, Lu JX. Anti-angiogenic potential of a cancer chemopreventive flavonoid antioxidant, silymarin: Inhibition of key attributes of vascular endotelial cells and angiogenic cytokine secretion by cancer epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276, 371–378.
- Kantah MK, Kumari A, He F, Sollano J, Alagozlu H, Min CH, Lorenzetti A, Morita Y, Marotta F. An orally-bioavailable Glutathione-based hepatoprotective compound in experimental acute liver injury: more effective than Silymarin and YHK. *J Gastrointest Dig Syst* 2016; 6: 4.
- Karimi G, Vahabzadeh M, Lari P, Rashedinia M, Moshiri M. ‘‘Silymarin’’, a promising pharmacological agent for treatment of diseases. *Iran J Basic Med Sci* 2011; 14(4): 308-17.
- Kazsaki J, Wolfard A, Szalay L, Boros M. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2006; 38(3): 826-8.
- Kim MS, Lee S, Jung N, Lee K, Choi J, Kim SH, Jun J, Lee WM, Chang Y, Kim D. The vitamin d analogue paricalcitol attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury through down-regulation of Toll-like receptor 4 signaling in rats. *Arch Med Sci* 2017; 13(2): 459-469.
- Knapen MFCM, Zusterzeel PLM, Peters WHM, Steegers EAP. Glutathione and Glutathione-related enzymes in reproduction: A review. *Eur J Obstet and Gynecol and Reprod Biol*. 1999; 82 (2) ;171-84.
- Kocaman N, Özlem D. Hepatoprotektif bir ajan: Silymarin. *Firat Tıp Derg/Firat Med J* 2015;20(3); 128-132.
- Kren V, Walterová D. Silybin and silymarin--new effects and applications. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc* 2005; 149(1): 29-41.

- Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000; 32(2): 169-73.
- Lentsch AB. Regulatory mechanisms of injury and repair after hepatic ischemia/reperfusion injury. 2012: 513192 doi: 10.6064/2012/513 192.
- Liu S, Chen Z, Cao D, Liu F, Wang X, Zhao L, Liu R, Xiao Z. A study on the protective effect of Silybum marianum extract on hepatic ischemia-reperfusion injury. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2013; 10(5): 310-2.
- Lovelace ES, Maurice NJ, Miller HW, Slichter CK, Harrington R, Magaret A, Prlic M, De Rosa S, Polyak SJ. Silymarin suppresses basal and stimulus-induced activation, exhaustion, differentiation, and inflammatory markers in primary human immune cells. *PLoS One* 2017; 12(2): e0171139.
- Lu L, Zhou H, Ni M, Wang X, Busuttill R, Kupiec-Weglinski J, Zhai Y. Innate Immune Regulations and Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Transplantation* 2016; 100(12): 2601-2610.
- Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *Faseb J* 1999; 13(10):1169-83.
- Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids* 2012; 2012: 736837; doi: 10.1155/2012/736837.
- Maureen McMichael, Rustin M. Moore. Ischemia–reperfusion injury pathophysiology, part I. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2004; 14(4): 231-241.
- Miyashita T, Nakanuma S, Ahmed AK, Makino I, Hayashi H, Oyama K, Nakagawara H, Tajima H, Ninimiya I, Fushida S, Harmon JW, Ohta T. Ischemia reperfusion –facilitated sinusoidal endothelial cell injury in liver transplantation and the resulting impact of extravasted olatelet aggregation. *Eur Surg* 2016; 48: 92-98.
- Nastos C, Kalimeris K, Papoutsidakis N, Tasoulis MK, Lykoudis PM, Theodoraki K, Nastou D, Smyrniotis V, Arkadopoulos N. Global consequences of liver ischemia/reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev* 2014; doi:10.1155/2014/906965.

- Ozcan O, Erdal H, Yonden Z. İskemi-reperfüzyon hasarı ve oksidatif stres ilişkisine biyokimyasal bakış. *Mustafa Kemal Üniver Tıp Derg* 2015; 6(23): 27-33.
- Papadopoulos D, Siempis T, Theodorakou E, Tsoulfas G. Hepatic ischemia and reperfusion and trauma: current concepts. *Arch Trauma Res* 2013; 2(2): 63-70
- Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003; 333 (1): 19-39.
- Peralta C, Jimenez-Castro MB, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol* 2013; 59(5): 1094-106.
- Polyak SJ, Ferenci P, Pawlotsky JM. Hepatoprotective and antiviral functions of silymarin components in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2013; 57(3): 1262-71.
- Pradhan SC, Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res* 2006; 124(5): 491-504
- Radko L, Cybulski W. Application of silymarin in human and animal medicine. *Journal of Pre-Clinical and clinical Research* 2007; 1(1): 22-26.
- Rainone F. Milk thistle. *Am Fam Physician* 2005; 72(7): 1285-8.
- Rambaldi A, Jacobs BP, Iaquinto G, Glud C. Milk thistle for alcoholic and/or hepatitis B or C liver diseases- a systematic cochrane hepato-biliary group review with meta-analyses of randomized clinical trials. *Am J Gastroenterol* 2005;100(11):2583-91.
- Reddy MK, Reddy AG, Kumar BK, Madhuri D, Boobalan G, Reddy MA. Protective effect of rutin in comparison to silymarin against induced hepatotoxicity in rats. *Vet World* 2017; 10(1): 74-80.
- Ribas V, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Glutathione and mitochondria. *Front Pharmacol* 2014; 5: 151 doi: 10.3389/fphar.2014.00151.
- Saidi RF, Kenari SK. Liver ischemia/reperfusion injury: an overview. *J Invest Surg* 2014; 27(6): 366-79.
- Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, Meissner H, Michl P, Leiderer R, Schildberg FW, Messmer K, Bilzer M. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia. *Ann Surg* 2004; 239(2): 220-31.
- Schofield ZV, Woodruff TM, Halai R, Wu MC, Cooper MA. Neutrophils – a key component of ischemia-reperfusion injury. *Shock* 2013; 40(6): 463-70.

- Sener, G., A. Sakarcan, and B.C. Yegen, Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Mol Nutr Food Res* 2007. 51(11); 1345-52.
- Serracino-Inglott F, Habib NA, mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001; 181(2): 160-6.
- Shelly C. Lu. Glutathione synthesis. *Biochem Biophys Acta* 2013; 1830(5): 3143-3163.
- Singh RP, Padmavathi B, Rao R. Modulatory influence of *Adhatoda vesica* (*Justicia adhatoda*) leaf extract on the enzymes of xenobiotic metabolism, antioxidant status and lipid peroxidation in mice. *Mol Cell Biochem* 2000; 213(1-2): 99-109.
- Surai PF. Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants (Basel)* 2015; 20; 4(1): 204-47.
- Suyavaran A, Ramamurthy C, Mareeswaran R, Subastri A, Lokeswara Rao P, Thirunavukkarasu C. TNF- $\alpha$  suppression by glutathione preconditioning attenuates hepatic ischemia reperfusion injury in young and aged rats. *Inflamm Res* 2015; 64(1): 71-81.
- Suyavaran A, Thirunavukkarasu C. Preconditioning methods in the management of hepatic ischemia reperfusion- induced injury: Update on molecular and future perspectives. *Hepatol Res* 2017; 47(1): 31-48.
- Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18(8):891-902.
- Townsen DW, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* 2003; 57(3-4): 145-55.
- Tsaroucha AK, Tsaiasidou A, Ouzounidis N, Tsalkidou E, Lambropoulou M, Giakostidis D, Chatzaki E, Simopoulos C. Intraperitoneal administration of apigenin in liver ischemia/reperfusion injury protective effects. *Saudi J Gastroenterol* 2016; 22(6): 415-422.
- Vaid M, Singh T, Prasad R, Katiyar SK. Silymarin inhibits melanoma cell growth both in vitro and in vivo by targeting cell cycle regulators, angiogenic biomarkers and induction of apoptosis. *Mol Carcinog* 2014; 54(11): 1328-39.
- Varga Z, Seres I, Nagy E, Ujhelyi L, Balla G, Balla J, Antus S. Structure prerequisite for antioxidant activity of silybin in different biochemical systems in vitro. *Phytomedicine* 2006; 13(1-2): 85-93.

- Walsh KB, Toledo AH, Rivera-Chavez FA, Lopez-Neblina F, Toledo-Pereyra LH. Inflammatory mediators of liver ischemia-reperfusion injury. *Exp Clin Transplant* 2009; 7(2): 78-93.
- Wang W, Ballatori N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol Rev* 1998; 50(3): 335-56.
- Weigand K, Brost S, Steinebrunner N, Büchler M, Schemmer P, Müller M. Ischemia/Reperfusion injury in liver surgery and transplantation: pathophysiology. *HPB Surg* 2012; doi: 10.1155/2012/176723.
- Wu JH, Batist G. Glutathione and glutathione analogues; therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830(5): 3350-3.
- Xue F, Wang G, Pang Z, Liu C, Liang T. Protective effect of glutathione against liver warm ischemia-reperfusion injury in rats is associated with regulation of P-selectin and neutrophil infiltration. *Anat Rec (Hoboken)* 2008; 291(8): 1016-22.
- Younis N, Shaheen MA, Abdullah MH. Silymarin-loaded Eudragit® RS100 nanoparticles improved the ability of silymarin to resolve hepatic fibrosis in bile duct ligated rats. *Biomed Pharmacother* 2016; 81: 93-103.
- Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol Aspects Med* 2009; 30(1-2): 29-41.
- Zeng XP, Li XJ, Zhang QY, Liu QW, Li L, Xiong Y, He CX, Wang YF, Ye QF. Tert-Butylhydroquinone Protects Liver Against Ischemia/Reperfusion Injury in Rats Through Nrf2-Activating anti-Oxidative Activity. *Transplant Proc* 2017; 49(2): 366-372.
- Zhai Y, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation. *Am J Transplant* 2011; 11(8) 1563-69.
- Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Ischemia-reperfusion injury in liver transplantation- from bench to bedside. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10(2): 79-89.
- Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci* 1994; 307(4): 284-92.
- <http://doctor-helps.net/wp-content/uploads/2013/12/Effect-of-Glutathione-Depletion-1.jpg>



## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Dilara ALİYEVA

**Doğum Yeri:** Azerbaycan, Gence

**Doğum Tarihi:** 25.01.1990

**Medeni Hali:** Bekar

**Bildiği Yabancı Diller:** Rusça, İngilizce, Türkçe

**Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):** Azerbaycan Tıp Üniversitesi Tıp fakültesi Mezunu 2012  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora 2013-

**E-posta:** dr\_aliyeva@hotmail.com



GİZLİ  
T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu



Sayı : 68489742-604.01-E.25477

14/11/2016

Konu : HADYЕК Kurul Kararı

PROF. DR. RAMAZAN AMANVERMEZ  
Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

Karar No: 3	Karar Tarihi:26.10.2016			
PROJE BAŞLIĞI: Karaciğer İskemi-reperfüzyon hasarında Silymarin ve redükte Glutatyonun koruyucu etkisinin araştırılması				
YÜRÜTÜCÜ: Prof. Dr. Ramazan AMANVERMEZ	TC NO: 40063993048			
E-POSTA: aramazon@omu.edu.tr	MOBİL TEL NO:			
KURUM: Tıp Fakültesi	İÇ HAT TEL NO: 2534			
ARAŞTIRICILAR: (Yürütücü dışındakiler)				
SIRA	ÜNVAN	ADI SOYADI	TC NO	KURUMU
1	Yard.Doç.	Kağan KARABULUT	19114235444	TF Genel Cerrahi AD
2	Doç.Dr.	Gökhan Selçuk ÖZBALCI	52237573666	TF Genel Cerrahi AD

- Yukarıda tanımlanan çalışmayı; belirtilen araştırmacılar ile gerçekleştireceğini, ekip dışında başka kişileri HADYЕК ten İzin almadan iştirak ettirmeyeceğini, çalışmanın başından sonuna kadar başkaları ile paylaşmayacağını ve yayın haline dönüştüğünde belirtilen katkı sırasına göre yayınlayacağını,
- Üniversitemiz WEB sayfasında güncel hali yayınlanan, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine uygun olarak çalışacağını,
- Onay alınmış Projede belirtilen Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası olan kişilerin haricinde başkalarına Deney/Yaban hayvanlarında herhangi bir işlem yaptırmayacağını,
- Proje sürecinde işlemlerde ve çalışma ekibinde yapılacak değişiklikler için OMU-EBYS sistemi üzerinden HADYЕК'e İzin başvurusunda bulunacağını ve onay gelinceye kadar çalışmalarını durduracağını,
- Proje onay tarihinden itibaren her 6(altı) ay sonrasında OMU-EBYS sistemi üzerinden HADYЕК'e gelişim raporu vereceğini,
- Proje bitim tarihini müteakiben 3 ay içerisinde çalışma sonucunu OMU-EBYS sistemi üzerinden HADYЕК'e bildireceğini,
- Bu Proje süresince, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu Yönergesinde yer alan etik ilkelerle uyumsuz veya beklenmeyen ters bir etki veya olay olduğunda derhal Yerel Etik Kurul'a bildireceğini Kabul ve taahhüt eden kimlik ve iletişim bilgileri yukarıda yazılı yürütücünün Araştırma Projesi, Etik Kurul Üyeleri tarafından OMU HADYЕК yönergesi kapsamında Etik İlkelerine Uygun bulunmuştur.

e-İmzadır

Prof. Dr. Feriät KOLBAKIR  
HADYЕК

Adres: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Rektörlüğü

Telefon: 0362 312 19 19 Faks: 0362 457 60 91

Elektronik Ağ: <http://www.omu.edu.tr/>

Keş Adresi: [omu@hs01.kep.tr](mailto:omu@hs01.kep.tr)

Feriät KOLBAKIR

5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu'na uygun olarak Güvenli Elektronik İmza ile üretilmiştir.

Evrak teyidi <https://ebysorgu.omu.edu.tr> adresinden 831B-51EB-86U2 kodu ile yapılabilir.



Karar No: 3	Karar tarihi: 26.10.2016
<b>DENEY HAYVANLARI YEREL ETİK KURUL KARAR ONAYI</b>	
PROJE BAŞLIĞI: Karaciğer iskemî-reperfüzyon hasarında Silymarin ve redükte Glutatyonun koruyucu etkisinin araştırılması	
YÜRÜTÜCÜ: Prof. Dr. Ramazan AMANVERMEZ	
İMZA Prof. Dr. Abdurrahman AKSOY Üye	İMZA Prof. Dr. Mehmet Ender ARITÜRK Üye
KATILMADI Prof. Dr. Ahmet GÜLER Üye	İMZA Prof. Dr. Hasan Tahsin KEÇELİGİL Üye
İMZA Prof. Dr. Umur SAKALIOĞLU Üye	KATILMADI Prof. Dr. Rüştü Cankon GERMIYANOĞLU Üye
İMZA Doç. Dr. Berfin M GÖLCÜ Üye	İMZA Doç. Dr. Yüksel TERZİ Üye
KATILMADI İnş. Müh. Ahmet CENGİZ Üye	KATILMADI Doç. Dr. Oğuzhan YANAR Üye
İMZA Ecz. Onur Ferhat KARACAN Üye	İMZA Vet. Hek. Mustafa ERMIŞ Üye
İMZA Prof. Dr. Ferişt Kolbakir Başkan	

5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu'na uygun olarak Güvenli Elektronik İmza ile üretilmiştir.  
Evrak teyidi <https://cbysorgu.omu.edu.tr> adresinden 83IB-5IEB-86U2 kodu ile yapılabilir.