

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

**KARACİĞER İSKEMİ REPERFÜZYONUNDA ARAŞİDONİK ASİT SALINIMI
VE İNFLAMATUAR YOLAKLARA ETKİSİ**

Ebru KIRAÇ

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2015

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**KARACİĞER İSKEMİ REPERFÜZYONUNDA ARAŞİDONİK ASİT SALINIMI
VE İNFLAMATUAR YOLAKLARA ETKİSİ**

Ebru KIRAÇ

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mutay ASLAN**

Bu Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 2014.02.0122.015)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir.”

Antalya, 2015

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma, j¼rimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Programınca Y¼ksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 17 Haziran 2015

- Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mutay ASLAN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı 
- ye : Prof. Dr. S. G¼tekin Y¼CEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı 
- ye : Prof. Dr. S. Halide AKBAř
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı 
- ye : Prof. Dr. Sebahat ÖZDEM
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı 
- ye : Prof. Dr. Özlem G¼ls¼m ELPEK
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi
Patoloji Anabilim Dalı 

Onay:

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun /..... /..... tarih ve /..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. zg¼l ALPER

Enstit¼ M¼d¼r¼

ÖZET

Hepatik vasküler yetmezliği takiben kan akımının yeniden sağlanması iskemik dokularda proinflatuar bir ortam yaratarak ikincil bir hasarlanmaya neden olur. Poliansatüre yağ asitleri (PUFA), prostaglandin (PG), tromboksan (TX) ve lökotrien (LT) gibi eikosanoidlerin oluşumu yoluyla inflamatuvar yolağı regüle ederler. Bu çalışmanın amacı karaciğer (KC) dokusunda omega-3 (n-3) ve omega-6 (n-6) PUFA'nın oransal değişimini incelemek ve n-6 inflamatuvar yolağının etkinliğini araştırmaktır. Çalışmaya standart sıçan yemi ile beslenmesine izin verilen 15 adet Albino Wistar Sıçan dahil edilmiştir. Karaciğer I/R'nu oluşturmak için orta ve sol hepatik lobları besleyen portal dallar 60 dakika klampe edilmiş, 60 dakikanın sonunda mikrovasküler klemp açılarak reperfüzyon tekrar sağlanmıştır. Uygulanan I/R modelinde KC'in kaudal ve sağ lobu intakt kalmış ve kontrol KC dokusunu teşkil etmiştir. Sham grubundaki hayvanlara anestezi eşliğinde sadece laparotomi yapılmıştır. Kan örnekleri iskemi öncesinde ve iskemi sonrasında sırasıyla kuyruk veninden ve sağ ventrikülden alınmıştır. Oluşturulan I/R, kontrol ve sham gruplarının KC dokularından alınan örneklerde yüksek performanslı sıvı kromatografi kütle spektrometresi (LC MS/MS) ile araşidonik asit (AA, C20:4n-6), dihomogamma-linolenik asit (DGLA, C20:3n-6), eikosapentaenoik asit (EPA, C20:5n-3) ve dokosaheksaenoik asit (DHA, C22:6n-3) ölçülmüştür. Omega-6 inflamatuvar yolağını araştırmak için total fosfolipaz A2 (PLA2), siklooksijenaz (COX) ve prostaglandin E2 (PGE2) düzeyleri belirlenmiştir. Hücresel hasarı belirleyen histopatolojik skor I/R hasarına maruz kalan dokularda anlamlı olarak artmıştır. Karaciğer I/R hasarı, hem n-3 hem de n-6 PUFA'yı kontrol ve sham gruplarına göre anlamlı olarak artırmış ancak oransal olarak belirgin bir değişime sebep olmamıştır. Fosfolipaz A2, COX ve PGE2 düzeyleri I/R grubunda kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmıştır. Karaciğer I/R hasarına maruz bırakılan dokularda PLA2 aktivite artışı ile beraber n-3 ve n-6 PUFA düzeyleri yükselmiş ve bunun sonucunda inflamatuvar yolak tetiklenerek COX ve PGE2 düzeyleri artış göstermiştir. n-6 PUFA derivativesi eikosanoidlerin oluşumunun engellenmesini değerlendiren gelecekteki çalışmalar, karaciğer I/R hasarında tedavi stratejilerinin geliştirilmesini ve uygulanması kolaylaştırabilir.

Anahtar kelimeler: Karaciğer, iskemi/reperfüzyon, poliansatüre yağ asitleri.

ABSTRACT

Hepatic vascular insufficiency accompanied by periodic restoration of blood flow, places ischemic tissues at risk of additional injury a proinflammatory state. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) regulate inflammatory responses through the production of eicosanoids including prostaglandins (PGs), thromboxanes (TXs) and leukotrienes (LTs). The aim of this study was to assess omega-3 (n-3) and omega-6 (n-6) PUFA in liver tissue and evaluate changes in n-6 inflammatory pathway following liver ischemia-reperfusion (IR) injury. Male Wistar rats which were allowed free access to standard rat chow were included in the study. Blood vessels supplying the median and left lateral hepatic lobes were occluded with an arterial clamp for 60 min, followed by 60 min reperfusion. At the end of the experimental period, blood samples were obtained from the right ventricle to determine serum alanine aminotransferase (ALT) activity and animals were sacrificed to obtain samples of nonischemic and postischemic liver tissue. Levels of arachidonic acid (AA, C20:4n-6), dihomo-gamma-linolenic acid (DGLA, C20:3n-6), eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n-3) in liver tissue were determined by an optimized multiple reaction monitoring (MRM) method using ultra fast-liquid chromatography (UFLC) coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS). Phospholipase A2 (PLA2), cyclooxygenase (COX) and prostaglandin E2 (PGE2) were measured in tissue samples to evaluate changes in n-6 inflammatory pathways. Total histopathological score of cellular damage was significantly increased following hepatic IR injury. Omega-3 and n-6 PUFA levels were significantly increased in postischemic liver tissue compared to nonischemic controls. No significant difference was observed in AA/DHA and AA/EPA ratio in postischemic liver tissue compared to control. Tissue activity of PLA2, COX and PGE2 levels were significantly increased in postischemic liver tissue compared to nonischemic controls. Current results suggest that increased hydrolysis of fatty acids via PLA2 triggers activity of COX and leads to increased PGE2 levels. Future studies evaluating agents which block formation of eicosanoids derived from n-6 PUFAs can facilitate the development and application of treatment strategies in liver I/R injury.

Keywords: Liver, ischemia–reperfusion, polyunsaturated fatty acids

TEŐEKKÖR

Bu araştırmanın her aşamasında bilgi ve desteğini esirgemeyen proje yÖrÖtÖcÖsÖ ve akademik danışmanım Sayın Prof. Dr Mutay ASLAN'a; yÖksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalıştığım ve bundan mutluluk duyduğum, bÖtÖn asistan arkadaşlarıma; hayatımın her dÖneminde her zaman yanımda olan sevgili anne ve babama sonsuz teőekkÖrlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	i
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜRLER	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1	3
Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı	
2.2	3
İskemik Dönemde Gelişen Fizyopatolojik Olaylar	
2.2.1	4
Na ⁺ -K ⁺ ATPaz Pompa Bozukluğu	
2.2.2	4
Hücre İçi Asidoz Gelişimine Bağlı Olarak pH'nın Düşmesi	
2.2.3	5
İntrasellüler Ca ⁺⁺ Birikimi	
2.2.4	5
Pürin Metabolitlerinin Birikimi	
2.3	6
Reperfüzyon Döneminde Gelişen Fizyopatolojik Olaylar	
2.3.1.	6
Serbest Oksijen Radikallerinin Ortaya Çıkması	
2.3.2.	9
Polimorf Nüveli Lökosit (PMNL) Aktivasyonu	
2.3.3.	10
Proinflamatuvar Sitokin salınımı	
2.3.4.	10
Komplemanın Rolü	
2.3.5.	11
Eikozanoidlerin Üretimi	

GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Gruplandırma	21
3.2. Cerrahi Protokol	21
3.3. Karaciğer Doku Örneklerinin Histopatolojik İncelenmesi	22
3.4. Serum Alanin Aminotransferaz (ALT) Enzim Aktivitesinin Ölçümü	23
3.5. Elektrosprey İyonizasyon Kütle Spektrometri Ölçümleri	24
3.6. Karaciğer Total Fosfolipaz A2 (PLA2) Düzeylerinin Ölçülmesi:	25
3.7. Karaciğer Siklooksijenaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü	27
3.8. Karaciğer Prostaglandin E2 Düzeylerinin Ölçülmesi	28
3.9. Protein Tayini	29
3.10. İstatistiksel Analiz	30
BULGULAR	31
TARTIŞMA	37
SONUÇLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	45
KAYNAKLAR	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	: Araşidonik asit
ADP	: Adenozin difosfat
ALA	: Alfa-linolenik asit
AMP	: Adenozin monofosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
CaLB	: Ca ⁺² bağımlı lipid bağlayan domain
EFA	: Esansiyel yağ asitleri
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentetaz
EPA	: Eikosapentaenoik asit
ET	: Endotelin
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
•OH	: Hidroksil radikali
HETE	: Hidroksieikosatetraenoik asit
HPETE	: Hidroksiperoksieikosatetraenoik asit
HSPG	: Heparin sülfat proteoglikan
ICAM-1	: İnterselüler adhezyon molekülü 1
IFN-γ	: İnterferon-gamma
IL	: İnterlökin
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit
iPLA2	: Ca ⁺² Bağımsız PLA2
XDH	: Ksantin dehidrogenaz
XO	: Ksantin oksidaz
KH	: Kupffer hücreleri
LT	: Lökotrien
LA	: Linoleik asit

LOX	: Lipooksijenaz
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NOS	: NO sentetaz
NO	: Nitrik oksit
NL	: Nötrofil lökosit
PAF	: Trombosit aktive edici faktör
HO₂•	: Perhidroksil
ONOO⁻	: Peroksinitrit
PAF	: Platelet aktive edici faktör
PMNL	: Polimorf nükleer lökosit
PUFA	: Poliansatüre yağ asitleri
PG	: Prostaglandin
PGHS	: Prostaglandin H sentaz
PSGL-1	: P-selektin glikoprotein 1
PECAM-1	: Trombosit-endotel hücresi adhezyon molekülü 1
sPLA	: Sekretuvar PLA2
ROS	: Serbest oksijen radikalleri
COX	: Siklooksijenaz
cPLA2	: Sitozolik PLA2
O₂•⁻	: Süperoksit
SOD	: Süperoksit dismutaz
Tx	: Trombokzan
TNF-α	: Tümör nekroz faktör-alfa

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
4.1	KC Kesitlerinin histopatolojik skorlaması	32
4.2	Serum alanin aminotransferaz aktivitesi	32
4.3	Karaciğer dokusunda ölçülen pufa düzeyleri	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2. 1	n-6 ve n-3 PUFA metabolizması	13
2. 2	COX-1 Monomer yapısı	16
2. 3	Siklooksijenaz yolağı reaksiyonları	17
2. 4	Siklooksijenaz yolağı ile üretilen prostanoidler	18
3.1	Sıçan karaciğeri şematik portal ven anatomisi	22
3.2	ALT enzim aktivitesi	23
3.3	PLA2 enzim aktivitesi	26
3.4	Prostaglandin E2 standart grafiğı	29
3. 5	KC dokusu protein miktarı standart grafiğı	30
4. 1	Rat karaciğेरinin hematoksilen eozin boyaması	31
4.2	Negatif iyon modunda çalışılmış esi-ms ve tandem kütle spektra örnek görüntüsü	33
4. 3.	Karaciğेर total fosfolipaz A2 aktivitesi	35
4.4	Karaciğेर total COX aktivitesi	35
4. 5	Karaciğेर PGE2 düzeyleri	36

GİRİŞ

Karaciğer (KC) iskemi-reperfüzyon hasarı (IRH), KC iskemisini takiben kan akımının yeniden sağlanması sonucunda gelişir. Travma, organ transplantasyonu, miyokard infarktüsü, inme, şok, yanık, sepsis ve daha bir çok klinik durumda iskemi reperfüzyon hasarı görülmesine rağmen gelişim mekanizması hala tartışmalıdır. İskemi reperfüzyon hasarı, karaciğer cerrahisinin muhtemelen morbiditesini etkileyen en önemli faktördür. Karaciğer (KC) transplantasyonunda, rezeksiyonunda ve ya travmada kanamanın engellenmesi için hepatik pedikül klemleme (Pringle manevrası) yöntemi sıkça kullanılmaktadır. Bu işlem sırasında hepatik arter, portal ven klemlemesi ile oluşan iskemi ve deklempe edilmesi ile oluşan reperfüzyon döneminde dokuda oluşan serbest oksijen radikallerinin verdiği doku hasarını engellemek için çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen bu problem güncelliğini korumaktadır (1).

İskemi sırasında hücresel oksidatif fosforilasyon azalır ve ilk olarak mitokondrilerde gerçekleşen adenosin trifosfat (ATP) sentezi durur (2). İskemi sırasında ATP sentezinin azalmasına bağlı olarak hücre membranında ATP bağımlı iyon pompası fonksiyonu bozulur. Böylece, hücre içine sodyum (Na^+), kalsiyum (Ca^{++}) ve su girişi artar (3). İskemik dokunun reperfüzyonu sırasında ise aynı anda ortaya çıkan reaksiyonlar dokuda sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar (2). İskemi-reperfüzyon hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bu faktörler birbiriyle ilişkisi oldukça karmaşık, hücresel ve humoral olaylar serisidir (4). I/R hasarı karakteristik olarak, serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına (5); PMNL (polimorf nükleer lökosit)'lerin aktivasyonuna (6); sitokin salınımında artışa (7); kompleman sistemin aktivasyonuna (8) ve eikozanoidlerin üretiminde artışa neden olur (9).

Eikozanoidler, I/R hasarında rol oynayan en önemli inflamatuvar mediyatörler arasındadır ve inflamatuvar cevap regülasyonunda önemli rolü vardır (10). Eikozanoidler, araşidonik asit (AA, $\text{C}_{20:4n6}$) ve eikosapentaenoik asit (EPA, $\text{C}_{20:5n3}$) gibi yirmi karbon atomlu poliansatüre yağ asitlerinden (PUFA) üretilirler. Araşidonik asitten köken alan eikozanoidler (prostaglandin; PG, lökotrien; LT, tromboksan; Tx) inflamasyonun anahtar mediyatörleridir ve proinflamatuvar olarak kabul edilirler (11). Eikosapentaenoik asit (EPA, $\text{C}_{20:5n3}$) ve dokosaheksaenoik asit (DHA, $\text{C}_{22:6n-3}$) ise inflamatuvar etkisi daha az belirgin olan ve antiinflamatuvar etki gösteren eikozanoidlerin öncülüdür (12). Yapılan çalışmalarda eikozanoid sentezi regülasyonunun bazı enzimler ile gerçekleştirildiği gösterilmiştir (13). Bu enzimlerden ilki, fosfolipaz A2 (PLA2)'dir. Bu enzim, membran fosfolipidlerinin sn-2

pozisyonuna etki ederek serbest araşidonik asit (AA) oluşumuna neden olur (14). Eikozanoid üretiminde substrat olarak davranan araşidonik asit başlıca iki yol ile metabolize edilebilir. Siklooksijenaz (COX) yolu ile prostoglandin (PG) ve tromboksan A2 (TXA2), lipooksijenaz (LOX) yoluyla lökotrienler (LT) oluşur. İskemiyle birlikte gelen sitozolik kalsiyum yükselmesi aynı zamanda hem lipooksijenaz hem de siklooksijenaz yolağını aktive eder (15). Araşidonik asitin siklooksijenaz (COX) enzimi ile reaksiyona girmesi ile öncelikle prostaglandin H2 (PGH2) oluşturulur. PGH2, ilgili spesifik sentaz enzimleri ile farklı prostanoid türlerine dönüştürülür. Siklooksijenaz yolağının PGH2'den sentezlenen prostanoid ürünleri; prostasiklin I2 (PGI2), tromboksan A2 (TxA2), prostaglandin D2 (PGD2), prostaglandin F2a (PGF2a) ve prostaglandin E2 (PGE2)'dir (16; 17).

Literatür araştırılması yapıldığında hepatik I/R hasarını önlemek amacıyla n-3 PUFA besin takviyesinin yapıldığı çalışmalarda n-3 PUFA-zengin diyetin etkili bir şekilde hepatik steatozu ve dolayısıyla sıçanlarda hepatik I/R hasarını azalttığı gösterilmiştir (18; 19). Bu şekilde n-3 PUFA besinsel desteğinin karaciğer I/R hasarı üzerine etkisi çok fazla çalışılmış olmasına rağmen, n-3 ya da n-6 besin takviyesi olmaksızın karaciğer I/R hasarını takiben endojen PUFA düzeyleri ve değişimi araştırılmamıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda karaciğer transplantasyonu sonrası hepatik dokudan belirgin bir prostanoid salınımı olduğuna dikkat çekilmiş ve artan eikozanoid sentezinin anahtar enzimler düzeyinde regüle edildiği gösterilmiştir (13). Ayrıca, karaciğer transplantasyonu sonrasında PGE2 aktivasyonunun iskemi reperfüzyon hasarına karşı direnç sağladığı (20) ve sitokin kaskadının regülasyonu yoluyla karaciğer hasarını restore ettiği düşünülmektedir (21). Bu bağlamda, karaciğer I/R hasarının sebep olduğu mikrosirkülatör rahatsızlıkları ve inflamatuvar reaksiyonları önlemek için ameliyat öncesi ve sonrası yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Edinilen bilgiler ışığında yapılan araştırma projemizde, karaciğerde iskemi reperfüzyonun neden olduğu hasarın bazı biyokimyasal ve histolojik parametreler üzerinden değerlendirilmesi ve KC I/R modelinde araşidonik asit salınımı ve buna bağlı inflamatuvar yolağa etkisini incelemeyi amaçladık. Bu amaç doğrultusunda 3 temel hedefe erişmek istedik. 1) KC iskemi/reperfüzyonu oluşturmak. 2) Oluşturulan KC I/R modelinde araşidonik asit miktarını belirlemek. 3) KC I/R modelinde fosfolipaz A2 (PLA2) ve siklooksijenaz (COX) enzim aktivitelerini değerlendirmek ve KC dokularında AA yolağının son ürünlerinden biri olan prostaglandin E2 (PGE2) düzeylerini ölçmek.

Çalışmamızda elde ettiğimiz verileri değerlendirerek KC I/R hasarında araşidonik asit salınımı ve buna bağlı inflamatuvar yolağa etkisini inceledik. Bu anlamda çalışmamız KC I/R hasarının AA kaynaklı inflamatuvar yolağa etkisini inceleyen ilk çalışmadır ve literatürde yoktur.

GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı

Bir organa gelen kan akımının azalmasının sonucu olarak organın oksijen ve beslenme desteği de azalır. Kan akımı ve oksijen desteği tekrar sağlandığında ise reperfüzyon, iskemik dönemin neden olduğu doku hasarını hücresele seviyede arttırır. Bu fenomen iskemik reperfüzyon (I/R) hasarı olarak bilinir ve özellikle transplantasyon ve karaciğer cerrahisinde karaciğerin canlılığına doğrudan etkilidir (3). Karaciğerde I/R hasarı ilk kez 1975’de Toledo-Pereyra ve arkadaşları tarafından deneysel olarak gerçekleştirilen KC naklinde gözlenmiştir. Nakledilen KC’de konjesyon, ilerleyici trombozis, organ yetmezliği ile sonuçlanan greft nekrozu gelişmiştir (22).

Karaciğer reperfüzyon hasarı, sıcak I/R hasarı ve soğuk-depolama reperfüzyon hasarı olarak sınıflandırılabilir. Soğuk depolama reperfüzyon hasarı nakil öncesi organ korunması sırasında oluşmaktadır. Sıcak I/R hasarı ise klinik olarak KC cerrahisi ile ilişkilidir (23). Karaciğer nakli, hipovolemik şok, bazı tip toksik KC hasarları ve no-okluziv hastalıklar gibi durumlarda meydana gelir. Karaciğer nakillerinde, kanserler ve bazı hastalıkların cerrahi tedavisinde, ameliyat esnasında kan kayıplarını ve ameliyat sonrası komplikasyonların azaltılması için KC’deki farklı damarlara ait kan dolaşımının geçici olarak engellenmesi (klampe edilmesi) gerekmektedir (24; 25). Bu esnada KC kısmi veya tam iskemik ve bunu takiben de reperfüzyon etkisi altında kalmaktadır (23). Sıcak I/R hasarında iki evre söz konusudur. Başlangıç evresi, reperfüzyondan sonraki iki saatten kısa ve oksidan stresle karakterize olan dönemdir. Bu dönemde reaktif oksijen metabolitleri (ROS)’un üretimi ve salgılanması doğrudan hepatositlerde hasara neden olur. Geç evre ise hepatik reperfüzyondan 6–48 saat sonraki dönemdir. Bu evrede toplanan nötrofil lökosit (NL) aracılığıyla inflamatuvar durum gerçekleşir (25). Karaciğer I/R hasarı, lokal hepatoselüler hasarla sonuçlanan ve hepatositler, sinuzoidal hücreler, Kupffer hücreleri (KH) ile infiltre olan nötrofiller, makrofajlar ve plateletlerin dahil olduğu çeşitli ve karmaşık bir olaylar zinciridir (26).

2.2. İskemik Dönemde Gelişen Fizyopatolojik Olaylar

İskemik, arteriyel ya da venöz kan akımının azalmasına bağlı olarak organ ve dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu bu doku veya organların oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlanır. İskemik sırasında hücresele oksidatif fosforilasyon azalır ve ilk olarak mitokondrilerde gerçekleşen adenosin trifosfat (ATP) sentezi durur. ATP kaybı hücre içinde çeşitli sistemleri etkileyerek Na⁺-K⁺ATPaz pompa bozukluğuna, hücre içi asidoz gelişimine bağlı olarak pH’nın düşmesine, intrasellüler Ca⁺⁺

birikimine ve pürin metabolitlerinin birikimine sebep olur. Hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi hücre ölümüne yol açar (2).

2.2.1 Na⁺-K⁺ATPaz Pompa Bozukluğu

Fizyolojik koşullarda üç sodyum iyonunun hücre dışına, iki potasyum iyonunun hücre içine taşınması bir ATP molekülünün adenozin difosfat (ADP)'ye dönüştürülmesiyle gerçekleştirilir (2). ATP aktivitesinin azalması zarda aktif sodyum pompasının yetersizliğine yol açarak hücre içi sodyum birikimine ve potasyumun hücre dışına atılmasına yol açar. Hücre içinde solid materyalin birikmesi izoozmotik su birikimine ve akut hücresel şişmeye neden olur (3).

2.2.2 Hücre İçi Asidoz Gelişimine Bağlı Olarak Ph'nın Düşmesi: Hücrede ATP iki yolla üretilir:

A) Glikolitik yol (Glikoliz): Glikoliz hemen tüm canlı hücrelerde işleyen, prokaryotlarda ve ökaryotlarda büyük benzerlik gösteren ve organizmaya enerji sağlayan bir reaksiyon dizisidir. Glikoliz sırasında kazanılan enerji oldukça az olmasına rağmen, bu yol mitokondri içermeyen eritrosit gibi dokuların enerji ihtiyacının karşılanmasında ve kas aktivitesinin yoğun olduğu, dolayısıyla oksijen miktarının yetersiz olduğu koşullarda enerji elde etmek için gereklidir. Glikoliz sırasında bir glikoz molekülü iki molekül üç karbonlu piruvata dönüşürken 2 ATP'lik bir enerji kazanımı gerçekleşir. Bir molekül glikozun iki molekül piruvata yıkımı tüm organizmalarda ve hücrelerde ortak yoldur. Koşulların aerobik ve anaerobik olması piruvatın daha sonra dönüşeceği metaboliti belirler. Anaerobik ortamda piruvat hücrenin sitozolünde laktata dönüşür. Aerobik koşullarda ve mitokondrisi olan hücrelerde ise önce asetil koenzim A (asetil KoA)'ya, daha sonra sitrik asit siklusu ile CO₂ ve H₂O'ya oksitlenir (27). Glikolizde, bir glikoz molekülü başına elde edilen toplam enerji, glikozun oksidasyonu ile elde edilen enerjiden çok daha azdır. Fakat düşük oksijen basıncında bile, dokuların gereken enerjiyi bu yoldan sağlayabilmeleri yönünden oldukça önemlidir. İskemi sırasında hücreler glikozun % 80-90'ını sitoplazmada glikoliz yoluyla kullanır.

B) Oksidatif fosforilasyon (Sitrik asit döngüsü-Krebs döngüsü): Sitrik asit siklusu organizmanın enerji gereksinimini sağlayan, karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasında çok önemli bir ortak son yoldur. Bu reaksiyon dizisi hücrenin mitokondrisinde ve oksijen varlığında gerçekleşir. Döngünün amacı glikoz, yağ asitleri ve bazı amino asitlerden oluşan asetil KoA'yı CO₂ ve H₂O'ya oksitlemek ve bu sırada enerji sağlamaktır. Glikozun döngüye girebilmesi için önce piruvata ve onun aracılığıyla asetil KoA'ya dönüşmesi gerekir. Yağ asitleri genellikle β-oksidasyon olarak adlandırılan bir reaksiyon dizisi ile asetil KoA'ye dönüşmektedir. Amino asitler ise doğrudan ya da piruvat üzerinden asetil KoA'ye dönüşebilirler. Sitrik asit siklusu bu üç kaynaktan gelen asetil KoA'yı kullanabilir (27). Mitokondrilerdeki oksijen yetersizse sitrik asit siklusu gerçekleşemez ve böylece glikozdan enerji üretimi sitrik

asit siklusu basamağında takılır. Sitrik asit siklusu yolu tıkanıldığında glikozun yıkımı tam olmadığından üretilecek ATP oranı azalır ve hücre büyük oranda ATP kaybeder. Çünkü glikoz pirüvat düzeyine kadar yıkılabilmiş, böylece 36-38 ATP yerine yalnız 2 ATP üretilebilmiştir.

İskeminin ilk dakikalarında glikolitik yol aşırı stimüle olur. İskemik dokuda var olan oksijen oksidatif fosforilasyonu desteklemek için yetersiz kalır. Glikoliz sonucu oluşan piruvat, sitrik asit siklusuna devam edemediğinden laktata dönüşü gerçekleşir. Glikoliz, laktik asit ve fosfat türevlerinden hidroliz sonucu oluşan inorganik fosfat birikimine neden olur. Sonuçta hücre içi pH düşer ve asidoz gözlenir (2). Bu oluşan metabolik asidoz hepatositlerde nekrotik hücre ölümünün başlamasına karşı koruyucudur. Ancak iskemik hücrelerde reperfüzyonun sağlanmasıyla birlikte pH'nın normale dönmesi pH bağımlı proteazları ve fosfolipazları aktive ederek hücre ölümüne neden olur. Bu fenomen "pH paradoksu" olarak adlandırılır (28-30).

2.2.3 . İntrasellüler Ca⁺⁺ Birikimi

Normal durumlarda sitozolik Ca⁺⁺ konsantrasyonu 10 mM iken hücre dışında sitozolden 10.000 kat daha fazla bulunur. Bu denge membranlar yardımıyla Ca⁺⁺-ATPaz tarafından modüle edilir. Hücre içinde yüksek konsantrasyonda Ca⁺⁺ gerektiği zaman, plazma membranındaki Ca⁺⁺ kanalları aracılığıyla hücre dışından veya endoplazmik retikulumdaki depolardan hızla Ca⁺⁺ salınır. Bu geçici yükselme sonrası Ca⁺⁺ hücre membranı ve endoplazmik retikulum membranlarına yerleşmiş Ca⁺⁺-ATPaz ile hücre dışına veya endoplazmik retikuluma pompolanarak hücre içi konsantrasyonu normale getirilir (27). İskemi ve belirli toksinler nedeniyle erken dönemde mitokondri ve ER'dan Ca⁺⁺ salınımı ve plazma membranını geçen net Ca⁺⁺ akışı sitozolik kalsiyum konsantrasyonunda artmaya neden olur. Hücrede Ca⁺⁺ yükselişi daha sonra membran permeabilitesinde nonspesifik artışla desteklenir. Artan Ca⁺⁺ konsantrasyonu fosfolipaz (membran hasarını başlatır), proteaz (membran ve sitoskeletal proteinleri parçalar), ATPaz (ATP azalmasını hızlandırır) gibi çok sayıda enzimin aktivasyonuna yol açar (2).

2.2.4 . Pürin Metabolitlerinin Birikimi

İskemi döneminde ATP üretimi durduğu halde kullanımı devam ettiği için ATP'den adenosin monofosfat (AMP) ve adenosin oluşur. Adenosin, hızla hücre dışına difüze olarak inozin ve hipoksantine parçalanır. Normalde hipoksantin, ksantin dehidrogenaz (XDH) enzimi ile nikotin adenin dinükleotit (NAD) kullanılarak ksantine dönüştürülür. Ancak iskemi sırasında XDH, Ca⁺⁺ bağımlı proteazlar aracılığı ile ksantin oksidaza (XO) dönüşür (2). Bu iki enzim arasındaki fark, XDH, NAD'ı elektron alıcısı olarak kullanırken; XO, O₂'ni elektron alıcısı olarak kullanarak süperoksit ve/veya hidrojen peroksit oluşturur. Ancak her iki form da hipoksantinden ksantin oluşumunu ve ksantinden ürik asit oluşumunu katalizler (31; 32). Süperoksit oluşması için gerekli olan oksijen iskemi döneminde bulunmazken reperfüzyon sırasında oksijenin aniden ortama katılması serbest radikal patlamasına

yol açar ve XO tarafından oluşturulan süperoksit anyonu, doku yaralanmasına neden olur (33).

2.3. Reperfüzyon Döneminde Gelişen Fizyopatolojik Olaylar

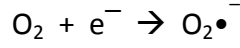
İskemik dokuya kan dolaşımının yeniden sağlanması reperfüzyon olarak tanımlanır. İskemik dokuya hem hücrenin rejenerasyonu hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı gerekir. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu sırasında aynı anda ortaya çıkan reaksiyonlar dokuda sadece iske mi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar (2). İskemi-reperfüzyon hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bu faktörler birbiriyle ilişkisi oldukça karmaşık, hücre sel ve humoral olaylar serisidir (4). I/R hasarı karakteristik olarak, serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına (5); PMNL'nin aktivasyonuna (6); sitokin salınımında artışa (7); kompleman sistemin aktivasyonuna (8) ve eikozanoidlerin üretiminde artışa neden olur (9).

2.3.1. Serbest Oksijen Radikallerinin Ortaya Çıkması

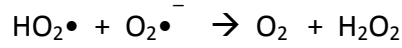
Bir atom çekirdeği pozitif yüklü protonlar ve yüksüz nötronlardan oluşur. Ayrıca atom çekirdeğini saran negatif yüklü bir elektron bulutu vardır (34). Atom çekirdeğinin etrafında bulunan bu elektronlar 'orbit' denilen yörüngelerde hareket halindedir. Atom kararlı durumda iken ilk orbitte iki, diğerlerinde sekiz elektron bulunur (35). Genel olarak atom veya molekülde elektronlar eşlenik olarak bulunduğu ndan molekül stabildir ve reaktif değildir. Ancak moleküle bir elektron ilavesi ya da molekülden bir elektron kaybı olduğunda oluşan serbest radikaller oldukça kararsız yapılardır ve yüksek enerjilerinden kurtulmak için başka bir iyon ve/veya atomla etkileşime girerler (34). Canlılarda ROS endojen olarak fizyolojik veya patolojik mekanizmalar sonucu oluşabilir. İyonizan radyasyon ve ısı, hücre içi serbest radikal oluşumuna yol açan eksojen etkenlere örnektir. Reaktif oksijen metabolitlerinin başlıca endojen kaynaklarına ise nötrofiller, mitokondrial elektron transport sistemi, mikrozomal elektron transport sistemi, oksidan enzimler (ksantin oksidaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz), vasküler endotel (spontan olarak nitrik oksit üretmektedir), endojen substratların otooksidasyonu örnek verilebilir. Serbest oksijen radikalleri başta yağlar, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere yükseltgenebilen tüm hücre elemanları ile etkileşirler. Fazla reaktif oldukları için genelde karşılaştıkları ilk yapı ile reaksiyona girerler ki bu yapı çoğunlukla hücre ya da organel membranlarının lipit komponentidir (35).

Karaciğer I/R hasarında rol oynadığı düşünülen başlıca serbest oksijen radikalleri şunlardır:

Süperoksid ($O_2^{\bullet-}$): Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur (36; 37). Hücre membranlarından kolay geçemediği için kendisi direkt olarak fazla zarar vermez ancak, hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağı olması nedeniyle önem kazanır.



Süperoksit radikali mitokondriyal elektron transfer zincirinde NADH'ın NAD⁺'e okside olması ile fizyolojik olarak üretilebildiği gibi pek çok oksidaz tarafından da üretilebilir. Süperoksit, düşük pH değerlerinde protonlanarak oksidan bir molekül olan perhidroksil (HO₂•) radikalini oluşturur. Perhidroksil radikali ile reaksiyona girdiğinde ise biri okside olurken diğeri indirgenir. Reaksiyon sonucunda oksijen ve H₂O₂ meydana gelir.

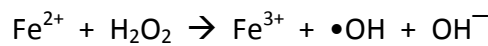
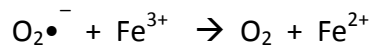


Bu reaksiyon spontan gerçekleşebildiği gibi süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından da katalizlenebilir. Artmış süperoksit düzeyleri SOD enzimi ile H₂O₂ ve oksijene dönüştürülerek azaltılır (36-39). SOD enziminin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının zararlı etkilerinden korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD aktivitesi oksijen kullanımı yüksek olan dokularda fazladır ve dokudaki oksijen basıncının artması ile artar. Bu enzim sayesinde intrasellüler süperoksit düzeyleri düşük tutulur (36).

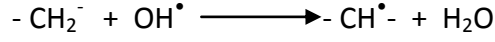
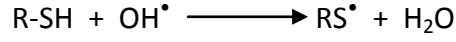
Hidrojen peroksit (H₂O₂): Hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçebilen zayıf bir oksidandır (37). Kendisi serbest radikal olmadığı halde, serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü "Haber-Weiss" reaksiyonu adı verilen bir reaksiyonda süperoksit radikali (O₂•⁻) ile reaksiyona girerek, en aktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini (•OH) oluşturur.



Haber-Weiss reaksiyonu ya katalizör varlığında ya da katalizörsüz oluşabilir. Fakat katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda ferri demir (Fe³⁺), O₂•⁻ tarafından ferro demir (Fe²⁺)'e indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak "Fenton reaksiyonu" ile hidrojen peroksitten •OH ve OH⁻ üretilir (40).



Hidroksil Radikali (OH•): Hidroksil radikali en reaktif oksijen türevidir. Amino asitler, nükleik asitler, organik asitler, fosfolipidler ve şekerler gibi biyokimyasal maddelerin bir çoğuyla reaksiyona girebilir (41; 42). Hidroksil radikali, Fenton reaksiyonuyla meydana gelir ve oluştuğu yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikaller (•RS[•]), karbon merkezli organik radikaller (•R[•]), organik peroksitler (RCOO•) gibi yeni radikaller oluşturarak büyük hasara neden olur.



Lipid peroksidasyonu O_2^- ve H_2O_2 tarafından başlatılmadığında OH^\bullet , alkoksil radikalleri (RO^\bullet) ve peroksil radikali (ROO^\bullet) lipid peroksidasyonunun başlamasına yol açar. Lipid peroksil radikalleri diğer lipitler, proteinler ve nükleik asitler ile reaksiyona girerek elektron transferinin artmasına ve substratların oksidasyonuna sebep olur. Hücre membranları yapısal olarak oksidatif saldırıya oldukça hassas olan çok miktarda poliansature yağ asitlerinden (PUFA) oluşmuştur. PUFA'da meydana gelen önemli değişiklikler, membran akışkanlığı ve geçirgenliğinde değişikliğe ve hücre metabolik disfonksiyona yol açar (43).

Singlet Oksijen (O_2): Singlet oksijen, oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spinini ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur. Ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur.

Reaktif Nitrojen Türleri: Karaciğer oldukça vasküler bir organ olduğundan endotel hücrelerinden zengindir. Endotel hücreleri de oksidatif hasardan ciddi şekilde etkilenmektedir. Aslında fizyolojik dozlardaki bazı serbest radikaller KC sirkülasyonunun optimal olarak gerçekleşmesinde yararlıdır ve bunların başında nitrik oksit (NO) gelmektedir (44-46). NO, serbest oksijen radikallerini bağladığı için bir bakıma oksidatif stresin zararının sınırlanmasına katkıda bulunmaktadır. Ancak bu bağlanma esnasında oluşan peroksinitrit süratle dispose edilemediği takdirde nitrosatif strese yol açmakta ve lipid peroksidasyonu ile sonuçlanmaktadır.

Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelin (ET) ve NO üretir (44-47). NO, L-Arginin'in guanidyum grubundan, endotel hücrelerinde eNOS (endotelial nitrik oksit sentetaz) ve kupfer hücresinde iNOS (indüklenen nitrik oksit sentetaz) tarafından üretilerek nötrofil adezyonunu, platelet agregasyonunu, stellat hücre relaksasyonunu ayarlar ve I/R hasarının şiddetini belirler (45; 48; 49). İskemi intraselüler nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve oksijen (NO sentezi için gerekli faktörler) konsantrasyonlarını düşürür. Sonuçta NO sentezinde önemli bir azalma gerçekleşir (50). Reperfüzyonun başlangıç döneminde, mikrosirkülasyonun tüm segmentlerinde aktive edilmiş endotel hücrelerinden fazla miktarda süperoksit radikali oluşurken, nitrit oksitin süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle yarışmaya girmesi sonucu peroksinitrit (ONOO^-) oluşarak ortamdaki NO miktarı azaltılır. Böylece nitrik oksitin fizyolojik etkisi inhibe edilir ve oksidatif etkisi ortaya çıkar. I/R hasarında NO ve endotelin (ET) arasındaki hassas dengenin bozulmasıyla vazokonstrüksiyon, sinuzoidal lümende daralma ve lökosit akımında artış gerçekleşir. Sonuç olarak iskemiye maruz kalan endoteliumda, NO salınımında

ciddi bir azalma ile karşılaşılır ise oluşacak iskemi-reperfüzyon hasarı fazlalaşacaktır.(51).

2.3.2. Polimorf Nüveli Lökosit (PMNL) Aktivasyonu

I/R hasarında polimorf nüveli lökositlerin rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bunlar; 1. Mikrovasküler oklüzyon; 2. ROS salınması; 3. Sitotoksik enzim salınması; 4. Vasküler permeabilite artışı ve 5. Sitokin salınımında artıştır. Polimorf nüveli lökositlerin başlangıçtaki kemoatraksiyonları endotel hücreleri ve ksantin oksidaz aracılığı ile olur. Aktivasyon ve migrasyonları ise endotel hücrelerde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığı ile olur. (52; 53) Selektinler olarak bilinen adhezyon moleküllerinin L, P ve E selektin olmak üzere bilinen üç üyesi vardır. I/R, endoteldeki P-selektin ekspresyonunu artırır. Bu molekül, PMNL'lerde bulunan P-selektin glikoprotein 1 (PSGL-1) adlı reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteli lökosit endotel bağlantısını oluşturur. İkinci aşamada, lökosit beta-2 integrinler (CD11a/CD18 ve CD11b/CD18) ile endoteldeki interselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1) arasındaki etkileşim ile lökosit adhezyonu ve agregasyonu gelişir. Üçüncü aşamada ise trombosit-endotel hücresi adhezyon molekülü 1 (PECAM-1) ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim sonucu lökosit transmigrasyonu gerçekleşir. Aktive edilen lökositler damar dışına ulaştınca hasar bölgesine doğru göç etmeye başlarlar (kemotaksis) (54).

Serbest radikallerin oluşumunda ve I/R hasarında önemli bir kaynak olan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz enzimlerini içerirler. Bu enzimler oksidan doku hasarında önemli roller üstlenir. Aktive nötrofillerde ksantin-oksidad'ın artması ile ROS'un salınması "solunum patlaması" olayını meydana getirir. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile birlikte, dokuya sunulan oksijenin yaklaşık %70'i süperoksit iyonlarına oksitlenmektedir. Süperoksit iyonları çoğu kez spontan dismutasyonla hidrojen peroksida dönüşür. Hidrojen peroksit ise klorür iyonlarının varlığında miyeloperoksidaz enzimi aracılığı ile hipoklorik aside indirgenir. Hipoklorik asit güçlü bir oksidandır ve birçok biyolojik molekülle kolayca reaksiyona girebilir. Nötrofillerin aktivasyonu ile nötrofil granüllerinden salıverilen apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim, elastaz, kolajenaz ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olur. Proteinazların etkisi ile damar duvarında yapının değişimi ve duvar yapısının gevşemesi nötrofillerin dokuya göçünü kolaylaştırır (55). Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya dilüe etmeye yönelik bu inflamatuvar cevap sonucu mikrovasküler permeablite artışı, ödem, tromboz ve parenkim hücresi ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümüne uğrarlar ve lenfatik dolaşım ile ortamdaki uzaklaştırılır (53).

2.3.3. Proinflamatuvar Sitokin salınımı

Sitokinler I/R hasarında inflamatuvar cevabın başlamasında ve devam etmesinde rol oynayan en önemli mediyatörlerdir. Bu bağlamda en çok araştırılan maddeler Tümör nekroz faktör (TNF)- α , interlökin (IL)-1 ve IL6'dır. Bu sitokinler büyük oranda proinflamatuvar aktiviteye sahiptir. Kompleman faktörlerle birlikte polimorf nüveli lökositleri etkileyerek dolaşımdaki nötrofilleri inflamasyon bölgesine çekmelerinin yanısıra ROS ve çeşitli proteazların salınması suretiyle iskemik hasarın devam ettirilmesi ve şiddetinin artmasından sorumludur (56). Doku travması veya enfeksiyonlar sonucu oluşan inflamatuvar kompleks proinflamatuvar sitokin döngüsünün başlamasına ve TNF- α , IL-6, IL-1, platelet aktive edici faktör (PAF) gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin ve IL-10 ve IL-13 gibi anti-inflamatuvar mediyatörlerin salınımına neden olur. Bu inflamatuvar sitokinlerden en göze çarpanları TNF- α , IL-6 ve IL-1'dir (3).

TNF- α , proinflamatuvar sitokinler arasında konakçı cevabının oluşumuna yol açan ilk ve en potent mediatörlerden biridir. Kaynağı periton ve splanknik dokularda çok bulunan monositler, makrofajlar ve T hücreleridir. Kupffer hücreleri, insan vücudunda bir arada bulunan en büyük makrofaj topluluğudur (57). Kupffer hücrelerinin aktivasyonu ile üretilen TNF- α , kaspaz aktivasyonu yoluyla lökosit kemotaksisi, nötrofil aktivasyonu, serbest radikal oluşumu, mitokondriyal toksite ve hücre ölümüne sebep olur. (3). Ayrıca TNF- α , IL-1 salınımına sebep olur. IL-1'nin karaciğerdeki ana kaynağı TNF α gibi Kupffer hücreleridir. TNF α ' dan farklı olarak nötrofiller, epitelyal hücreler ve endotel hücreleri tarafından da sentezlenir. IL-1, Kupffer hücrelerinden TNF- α salınımını ve nötrofillerden ROS salınımını uyarır. Ayrıca IL-1 ve TNF- α , anti-inflamatuvar bir sitokin olan IL-10 seviyesini düşürerek pro-inflamatuvar etki gösterir ve her ikisinde hepatik endotelial hücrelerde interselüler adezyon molekülü 1 (ICAM 1) ekspresyonunun artması ile ilişkilidir. Sıcak I/R hasarında TNF- α ve IL-1 ile karşılaştırıldığında IL-6 salınımı biraz gecikmeli olarak gerçekleşir. Serum seviyeleri reperfüzyondan dakikalar sonra artırılır (3). IL-6, monosit, makrofaj, lenfosit ve fibroblastlar tarafından sentezlenir. IL-6 bağımlı sinyalizasyon yolağının en önemli neticesi karaciğerden akut faz protein sekresyonunu uyarılmasıdır (58).

Kupffer hücre aktivasyonu neticesinde üretilen sitokinlerden TNF- α , IL-1 ve IL-6'nın pro-inflamatuvar etkisinin aksine anti-inflamatuvar sitokin olarak tanımlanan IL-10 ve IL-13'ün anti-inflamatuvar rolleri sıcak I/R hayvan modelleri üzerinde çalışılmıştır. Bu anti-inflamatuvar sitokinlerin TNF- α aktivasyonunu baskıladığı, karaciğer nötrofil birikimini, ödem ve hepatoselüler hasarı azlattığı gösterilmiştir (3).

2.3.4. Komplemanın Rolü

Kompleman sistemi plazmada inaktif halde bulunan enzimlerin kademeli olarak aktivasyonu ile inflamatuvar peptidlerin, opsoninlerin ve hücre zarı saldırı kompleksinin oluştuğu bir yoldur. Bu yolda oluşan proteinler anafilatoksik, inflamasyon bölgelerinde vazodilatasyon, vasküler permeabilite artışı (C3a, C4a,

C5a) ve fagositlerin endotele yapışmasını tetikleyen etkiler gösterirler. Kompleman sistemi yaklaşık olarak 35 proteine sahiptir. Bazı enzimler (C1r, C1s, C2, Faktör B, Faktör D), kofaktörler, inhibitör veya inaktivatörler, membran ilişkili protein ve reseptörler (C1q, C3a, C4a, C5a, CR1, CR2, CR3) içerir. Ayrıca; CD55-CD59 gibi membran bileşenleri ve C8 ve C9 gibi membran inhibitörleri de kompleman sisteminin önemli düzenleyici proteinleridir. Hepatositler, monositler, makrofajlar, böbreğin tübül ve glomerüler hücreleri kompleman komponentlerinin sentez yerlerinden bazılarıdır. Kompleman sistemi proteinleri, serum total proteinin %10'unu oluşturur.

Kompleman sistemi üç yol ile aktive olur:

- 1-Antikor bağımlı klasik yol
- 2-Antikor bağımsız alternatif yol (**Properdin Yolu**)
- 3-Mannoz bağlayıcı lektinin (MBL)-MASP yolu (**Lektin Yolu**) (59-62).

I/R hasarında kompleman sisteminin her 3 yolu da aktive olmaktadır (63; 64). Reperfüzyon sırasında kompleman bağımlı proinflamatuvar peptidler (C3a ve C5a) salınır. Bu peptidler; nötrofil aktivasyonuna, düz kas hücrelerinde kasılmaya, vasküler permeabilitede artışa, makrofaj aktivasyonunda artışa, C5b-9 polimerizasyonu ile saldırgan yabancı hücre lizisine, fosfolipid tabakasının bütünlüğünün bozulmasına, C3b opsonizasyonuna, anafatoksinlerin aktivasyonuna, endotel hücrelerinde fibrin depositlerinin birikimine ve trombosit agregasyonuna neden olur (65; 66).

2.3.5. Eikozanoidlerin Üretimi

Yağ asitleri, bir ucunda karbonil grubu (C=O) diğer ucunda metil grubu (-CH₃) bulunan hidrokarbon zincirinden oluşan yapılardır. Bu hidrokarbon zincirinde çift bağ içerip içermemelerine göre doymuş yağ asitleri ve doymamış yağ asitleri olarak sınıflandırılırlar. Doymuş yağ asitlerinin yapısında çift bağ bulunmaz; doymamış yağ asitlerinin yapılarında ise bir ya da daha fazla sayıda çift bağ bulunur (67). Yapılarında iki ya da daha fazla çift bağ içeren doymamış yağ asitleri poliansatüre yağ asitleri (PUFA) olarak adlandırılır (10). PUFA, önemli bir hücre membranı bileşenidir. Vücutta kan basıncı, kan pıhtılaşması, beyin ve sinir sisteminin gelişimi ve fonksiyonu gibi çok geniş kapsamlı olayları regüle eder. Ayrıca, eikozanoid üretimi yoluyla inflamatuvar cevap regülasyonunda önemli rol oynar. (10).

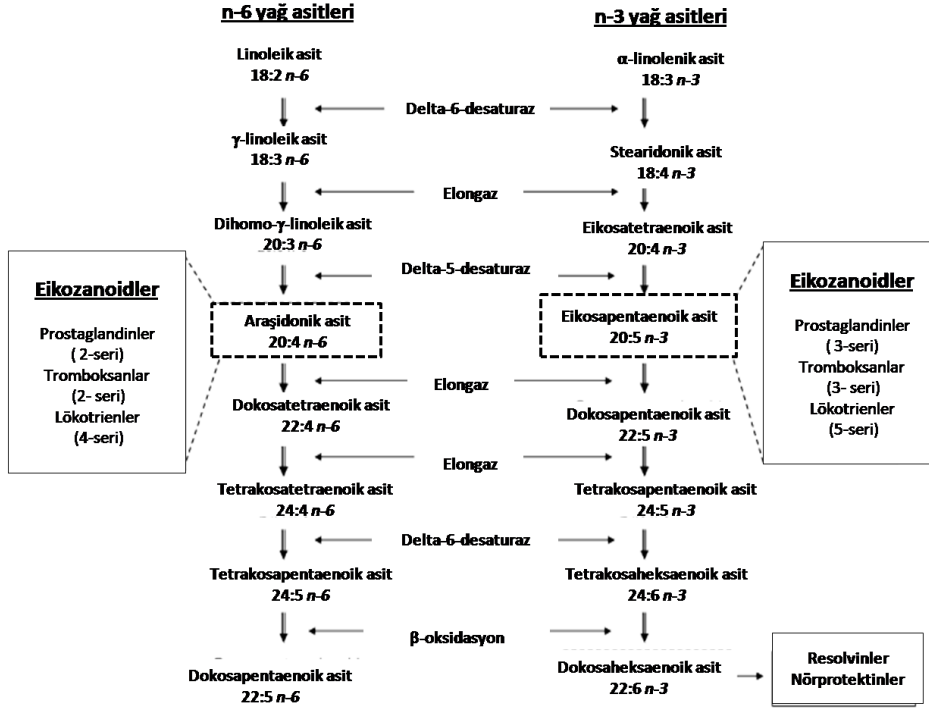
Poliansatüre yağ asitleri, hidrokarbon zincirinde bulunan son çift bağın, molekülün terminal metil grubuna yakın yerleşimine göre omega-6 (n-6) ve omega-3 (n-3) yağ asitleri olarak sınıflandırılır. Memeliler, n-6 seri PUFA'ları sentezlemek için öncül olarak linoleik asit (LA, 18:2, ω-6); n-3 seri PUFA'ları sentezlemek için ise α-linolenik asit (ALA, 18:3, ω-3)'e ihtiyaç duyar. Fakat, bu öncül yağ asitlerini de novo olarak sentezleyemediklerinden diğer PUFA serilerini üretmeden önce bu yağ asitlerini diyet yoluyla almak zorundadır. Memeli hücreleri LA ve ALA'ı

sentezleyememelerine rağmen D5 ve D6 desaturaz enzimleri ile daha ileri çift bağ girişi sağlayarak (desaturasyon) ve elongaz enzimi ile açıl zincirini uzatarak (elongasyon) bu esansiyel yağ asitlerini fizyolojik olarak daha aktif bileşiklere metabolize edebilir. Sonuç olarak; diyet ile alınan LA, araşidonik asit (AA, C20:4n-6)'e; ALA ise eikosapentaenoik asit (EPA, 20:5n-3) ve dokosaheksaenoik asit (DHA, C22:6n-3)'e metabolize edilir. Memelilerde, n-3 ve n-6 yağ asitlerinin desaturasyon ve elongasyon yolları esas olarak karaciğerde gerçekleşir. LA ve ALA aynı enzimlerle metabolize edildiği için bu iki yağ asidi arasında bir yarış söz konusudur; birinin aşırı olması diğerinin metabolizmasının azalmasına sebep olur. Normalde D5 ve D6 desaturaz ve elongazlar n-3 PUFA'ya daha fazla affinite gösterir. Diyetteki EPA ve DHA kısmen eikozanoid substratı olarak hücre membranındaki araşidonik asitin yerini alır böylece n-6 türevi pro-inflamatuar eikozanoidlerin üretimi baskılanır (11; 68). Vücutta EPA ile 3-seri prostaglandin (PG) ve tromboksan (Tx), 5-seri lökotrien (LT) ve hidroksi-EPA üretilirken araşidonik asitten 2-seri PG ve Tx ile 4-seri LT üretilir. İnflamatuar hücreler tipik olarak yüksek konsantrasyonda araşidonik asit ve düşük konsantrasyonda EPA içerdiğinden eikozanoid üretiminde genel olarak araşidonik asit substrat olarak kullanılır. Buna göre araşidonik asit (AA, C20:4n6) gibi n-6 PUFA derivesi olan eikozanoidler pro-inflamatuar ve immün aktif fonksiyona sahipken eikosapentaenoik asit (EPA, C20:5n3) ve dokosaheksaenoik asit (DHA, C22:6n3) gibi n-3 PUFA derivesi olan eikozanoidler anti-inflamatuar özellik gösterirler ve n-6 PUFA derivesi eikozanoidlerin oluşumunu engellerler. EPA ve araşidonik asitten üretilen eikozanoidlerin farklı inflammatuar etkisine en iyi örnek LTB5'e karşı LTB4'tür. EPA'dan üretilen LTB5 araşidonik asitten üretilen LTB4'e göre nötrofil kemotaktik ajan olarak 10-100 kat daha az etkilidir daha zayıf inflamasyon uyarıcıdır (69).

Eikozanoid üretiminde substrat olarak davranan araşidonik asit başlıca iki yol ile metabolize olur. Siklooksijenaz (COX) yolu ile prostoglandinler (PG) ve tromboksan A2 (TXA2), lipooksijenaz yoluyla lökotrienler (LT) oluşur. İskemiyle birlikte gelen sitozolik kalsiyum yükselmesi aynı zamanda hem lipooksijenazı hem de siklooksijenaz yolağını aktive eder (15).

Lipooksijenaz yolu: LOX enzimleri stereoselektif bir davranışla çeşitli PUFA substratlarına OH grupları ekler. Bununla birlikte bu izoenzimler araşidonik asiti okside ettiği zaman pozisyonel selektivitesine göre tanımlanır. LOX enzimleri memelilerde bu şekilde 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX ve 15-LOX olarak tanımlanmıştır. LOX izoenzimleri ilk olarak stabil olmayan hidroksiperoksitleri oluşturur daha sonra hidroksi asitlere indirger. LOX enzim aktivitesi sonucu, AA ile hidroksieikosatetraenoikasit (HETE), LT, lipoxinler (LX); EPA ile hidroksieikosapentaenoikasit HEPE) ve E seri resolvinler (RvE); DHA ile; hidroksi-dokosaheksaenoikasit (HDHA), D-seri resolvinler (RvD) ve protektinler (PD) üretilir (70). Nötrofillerde baskın olarak bulunan araşidonik asit metabolizması enzimi 5-lipooksijenazdır. Araşidonik asitten bu enzim aktivitesiyle oldukça kararsız olan ve araşidonik asitin 5-hidroksiperoksi ürünü olan 5-HPETE (Hidroksiperoksieikosatetraenoik asit) üretilir. 5-HPETE ya nötrofiller için kemotaktik 5-HETE'e indirgenir ya da topluca lökotrienler diye adlandırılan bileşiklere dönüşür.

5-HPETE'den ilk türeyen lökotrien LTA4 olup bu enzimatik hidrolizle LTB4 oluşumuna veya glutatyon eklenmesiyle LTC4 oluşumuna yol açar. LTB4 güçlü kemotaktik bir ajandır ve nötrofillerin agregasyonuna yol açar. LTC4 ve onların alt ürünleri LTD4 ve LTE4 vazokonstriksiyon, bronkospazm ve vasküler permeabilite artışına neden olurlar (53). (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1 n-6 ve n-3 PUFA Metabolizması (68)

Siklooksijenaz (COX) yolu: Araşidonik asitin COX enzimi tarafından metabolizmasıyla 2-seri PG ve 2-seri TX meydana gelir. Prostanoid olarak da adlandırılan siklooksijenaz ürünü eikozanoidlerin biyosentezi üç basamaklıdır: A) Membran fosfolipidlerinden serbest yağ asitlerinin oluşması B) Serbest yağ asitlerinin siklooksijenazlarla siklikendoperoksidlere oksidlenmesi. C) Siklikendoperoksidlerden yukarıda sayılan prostanoid türlerinin oluşması (71).

A) Serbest Yağ Asitlerinin Oluşması: Eikozanoidlerin sentezinde kullanılan yağ asitlerinin kaynağı, hücre membranında bulunan fosfolipidlerdir. Fosfolipidlerden serbest yağ asitlerinin oluşumu başlıca Fosfolipaz A₂ yoluyla gerçekleşir. Fosfolipaz aktivitesi ilk olarak 1900'lü yılların başında kobra venomu ve pankreatik sıvıda çalışılmış ve fosfolipaz A₂ enzimleri çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılmıştır (14). Fosfolipazlar enzimatik olarak aktif ve substrat seçiciliği, pH

duyarlılığı ve subseleler lokalizasyonu farklı olan 13'ten fazla farklı izoform içeren bir enzim süperailesi olarak tanımlanmıştır. En iyi tanımlanan üç fosfolipaz ailesi Ca^{+2} bağımlı sekretuar PLA (sPLA) ve sitozolik PLA2 (cPLA2) ile Ca^{+2} bağımsız PLA2 (iPLA2)'dir.

Sekretuar PLA2 (sPLA2): sPLA2 enzim ailesinin üyeleri 14–19 kDa arasında değişen moleküler ağırlığa sahiptir. Ekstaselüler sıvıda lokalize olmuşlardır ve hasarlı doku ya da aktive edilen inflamatuvar hücrelerden salınırlar. Optimal aktivasyon için milimolar seviyede kalsiyuma ihtiyaç duyarlar (72). Rijid bir tersiyer yapıları vardır; 5-8 arasında disülfid bağı içermeleri nedeniyle proteoliziz ve dentürasyona direnç gösterirler. insanlarda sistein rezidülerinin sayısı ve pozisyonuna göre farklılık gösteren 10 farklı sPLA2 tanımlanmıştır (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA). sPLA2 enzimleri genellikle yağ asidi spesifitesi göstermez fakat son zamanlarda yapılan çalışmalar sPLA2'nin yağ asidi spesifitesi göstermemesine rağmen AA salınımını diğer yağ asitlerine tercih ettiği gösterilmiştir. Lipolitik enzimler olarak sPLA2 salgılanması iki mekanizma ile lipid mediyatörü oluşumuna katkıda bulunur. Birinci mekanizmada, bazı sPLA2 enzimleri (IA, IIF, III, V, X) memeli hücrelerinin dış membranına bağlanarak hidroliz eder. Diğerinde ise heparin bağlayan domain içeren sPLA2 enzimleri (IIA, IID, IIF, III, V) heparin sülfat proteoglikanlarla (HSPG) etkileşime girerler. Bu HSPG mekik yoluyla sPLA2'nin COX ve LOX gibi eikozanoid üretiminde rol alan enzimlerle kontakt kurmasına imkan sağlar. Lipolitik aktivitesinin yanı sıra bazı sPLA2 enzimleri (1B ve X) reseptör ligandı olarak hareket eder ve hücre sinyalizasyonunu ve ardından cPLA2 aktivasyonunu uyarır. Böylece sPLA2 enzimleri litolitik enzim olarak direkt ve intraselüler PLA2 aktivatörü olarak indirekt şekilde inflamatuvar lipid mediyatörlerinin üretilmesine katkı sağlar. cPLA'nin AA taşıyan fosfolipidlere spesifite göstermesine rağmen sPLA'nin inflamatuvar rolüne dikkat etmek gerekir. sPLA2 aktive edildiği durumlarda yağ asidi spesifitesi göstermediği için fosfolipitleri geniş çapta hidroliz etme kapasitesine sahiptir. Bu yüzden cPLA2'den daha fazla proinflamatuvar lizofosfolipid üretimine katkıda bulunur. İnflamasyon durumlarında bütün sPLA2 izoenzimleri bulunur. Başlıca nötrofil ve mast hücreleri gibi bazı inflamatuvar hücrelerde sPLA2 sentezlenerek aktive edildiğinde hemen salınmak üzere granüllerde depo edilir. Ayrıca LPS, TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ gibi mediyatörlerle uyarılan bazı hücrelerde PLA2-IIA ekspersyonu artırılır (73)

Ca^{+2} Bağımsız PLA2 (iPLA2): iPLA2 enzimi, sitoplazma yerleşimli, 85 kDa ağırlığında ve kalsiyum bağımsız olarak aktivasyon gösteren bir enzimdir. sPLA2 gibi AA spesifitesi göstermez (72). Genel olarak iPLA2 enziminin ana fonksiyonu membran fosfolipdlerinin yeniden yapılandırılması yoluyla homeostazisi sağlamak olduğu kabul edilir. Biriken deliller göstermiştir ki; iPLA2, ROS metabolizması ile ilişkili normal ve patolojik süreçlerde rol oynar. Örneğin, normal hücrelerde ve apoptoziste reaktif oksijen metabolitlerinin metabolizmasında spesifik rol oynar ve okside fosfolipidleri tercih eder. Az sayıda çalışmada ise fosfolipid hidrolizi, yoluyla inflamasyon başlangıcında rol alabileceği ve inflamatuvar süreçte uyarılabileceği gösterilmiştir.(73)

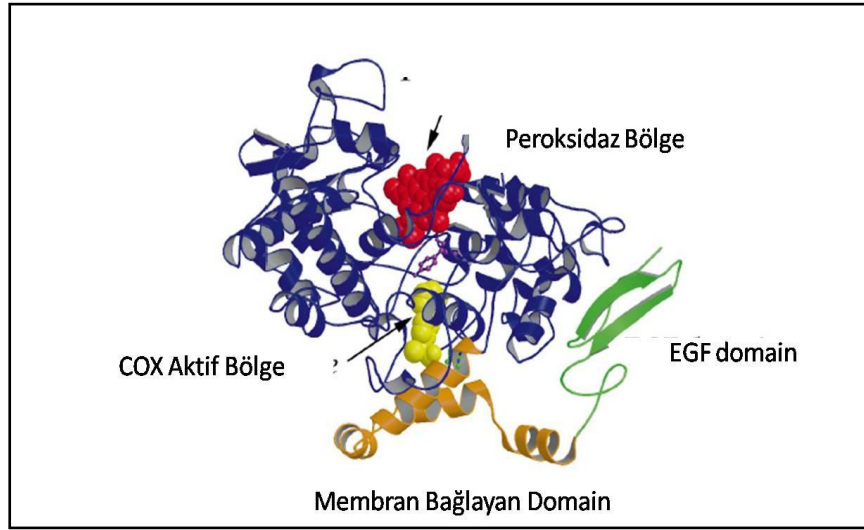
Sitozolik PLA2 (cPLA2): Sitozolik PLA2 (cPLA2), 85.2-kDa ağırlığında bir proteindir; sn-2 pozisyonunda arasidonik asit içeren fosfolipid substratlarına yüksek seçiciliği olan tek fosfolipaz olarak tanımlanmıştır (74). Normalde hücrelerde stoplazmada yerleşmiştir ve bir çok dokuda yapısal olarak ekspresse edilebilir (72). Sitozolik PLA2 amino terminalinde kalsiyum-fosfolipit bağlayan bir domain içerir. Bu domain cPLA2'nin membran fosfolipitlerine kalsiyum bağımlı olarak bağlanmasını sağlar. Hücre içi kalsiyum seviyesinin artmasıyla kalsiyum, cPLA2'nin N-terminal Ca^{++} bağımlı lipid bağlayan (CaLB) domainine bağlanarak enzimin nükleus, ER ya da golgi gibi intraselüler membranlara translokasyonunu uyarır. Eikozanoid üretimine neden olan COX ve 5-lipooksijenaz enzimleri bu bölgelerde lokalize olmuştur. Bununla birlikte cPLA'nin serin rezidüsünün mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) tarafından fosforilasyonu enzim aktivasyonuna katkıda bulunur. Hücre sel fosfolipaz A2 seviyeleri kalsiyum ve fosforilasyon ile posttranslasyonel olarak regüle edilebildiği gibi transkripsiyonel olarak da regüle edilebilir. Bir çok hücre tipinde sitokinler ve büyüme faktörleri cPLA2 mRNA ve protein seviyesini artırabilir (75).

Sonuç olarak; aktive olan PLA2 enzimleri fosfolipitlerin sn-2 pozisyonundaki ester bağlarını hidrolize eder. Lizofosfolipit ve serbest araşidonik asit oluşumuna neden olarak eikozonoid oluşumunu ve hücre hasarını destekler (76; 77).

B) Serbest Yağ Asitlerinin Siklooksijenazlarla Siklikendoperoksidlere Oksitlenmesi: Hücre membranındaki araşidonik asitin PLA2 aktivasyonu ile serbest bırakılmasının ardından serbest asit siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzim substratı gibi davranır (75). Siklooksijenaz, araşidonik asidin bütün prostaglandinlerin sentezinde aracı molekül olan PGH₂'ye çevrilmesi yoluyla prostaglandin biyosentezinin ilk aşamasını katalizleyen enzimdir. (78). 1991 yılına kadar yapılan çalışmalar sonucu siklooksijenaz enziminin tek tipinin olduğu düşünölmüştür. Daha sonraki yıllarda moleküler biyoloji tekniklerinin yaygın olarak kullanılmasıyla bu enzimin konstitütif (yapısal) ve indüklenebilir tip olmak üzere iki tipinin olduğu ortaya koyulmuştur. Konstitütif siklooksijenaza COX-1 ya da prostaglandin endoperoksidaz H sentaz-1 (PGHS-1), indüklenebilir siklooksijenaza ise COX-2 ya da prostaglandin endoperoksidaz H sentaz-2 (PGHS-2) adı verilmiştir. COX-1 ve COX-2 izoenzimleri aynı reaksiyonları katalizlesede farklı yapı ve fonksiyonlara sahiptir (79). Vücutta predominant olan ve fizyolojik uyarılarla aktive olan form COX-1 dir. Bu enzim hücre döngüsü boyunca aynı seviyede ekspresse edilir. Daha çok dokularda koruyucu etki gösterir; böbrek ve GİS'de platelet agregasyonu ve homeostazis gibi fizyolojik koruyucu fonksiyonların düzenlenmesinde etkilidir. COX-2 izoformu ise çoğu memeli hücrelerinde fizyolojik durumlarda tespit edilemez fakat sitokinler, büyüme faktörleri, tümör nekroz ajanlar, bakteriyel endotoksin gibi proinflamatuvar stimulanların inflamasyonlu hücrelerdeki yanıtlarıyla hızla ekspresse edilir. PUFA'ların PG ve TX türlerine dönüşümü ve PG regölasyonu siklooksijenaz enzimleri ile sağlanır. COX-2 ürünü PG'ler inflamatuvar reaksiyonlarda önemli rol oynar ve kızarıklık, ateş, şişlik, ağrı ve fonksiyon kaybı gibi karakteristik inflamatuvar semptomlardan sorumludur (80). Bununla birlikte iskemiye takiben kan akışının yeniden sağlanması

ile TNF- α , IL-6 ve endotelin gibi sitokinlerin aktive edilmesin yanı sıra COX-2 mRNA ekspresyonunun ve prostanooid sentezinin artırıldığı saptanmıştır (10). Bu iki izoenzim tarafından üretilen prostaglandinlerin tam olarak rolleri henüz aydınlatılamamış olmasına rağmen, enzimatik karakterleri, substrat seçiciliği ve ilaç duyarlılığı hakkında bilinenler yeni izoform selektif ilaç tasarlanmasına imkan tanımaktadır (78).

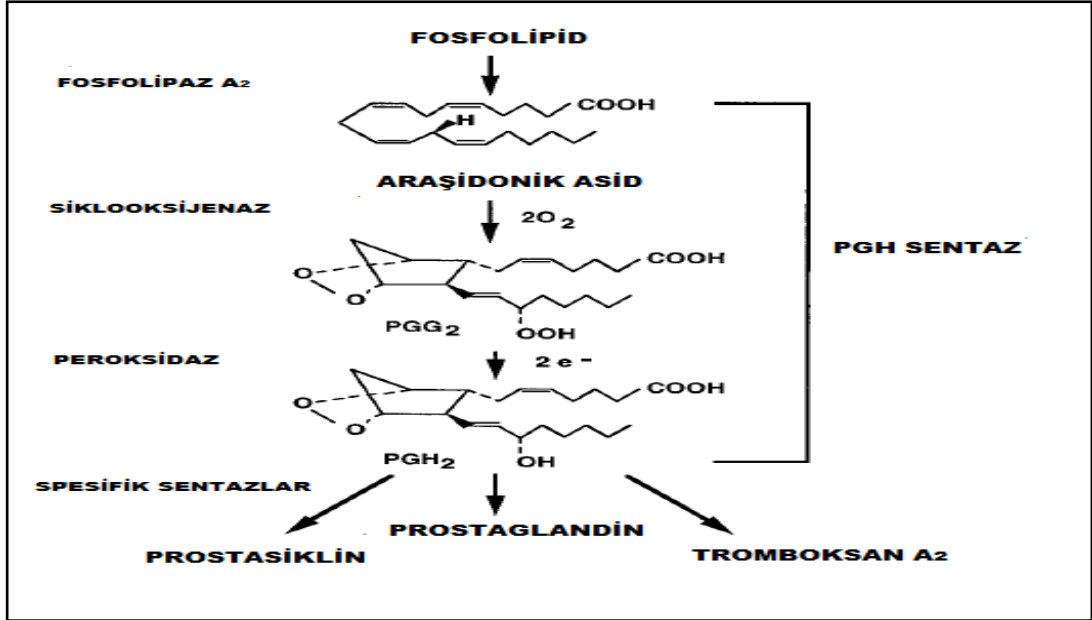
COX-1 ve COX-2 Enzimlerinin Genel Yapısı: COX enzimleri ER ve nukleus zarına lokalize olmuş ve glikozillenmiş integral proteinlerdir (78). Olgun memelilerde COX-1 576 amino asitten oluşur; COX-2 ise 587 amino asitten oluşur . Benzer enzimler olmalarına rağmen COX-2 enziminin aktif bölgesi COX-1'den %20 daha büyüktür ve biraz daha farklıdır. Bunlar, çoğunlukla amino asit dizilimindeki değişiminin neden olduğu yapı ve şekil farklılıklarıdır (80). ER'daki posttranslasyonel süreçten sonra olgun COX-1 ve COX-2 proteinleri 65-72 kDa moleküler ağırlığında ve homodimer yapısında bulunur. Bu homodimer yapı, mol monomer başına 1 mol ferrik hem taşır. Bir COX monomeri, N-terminal epidermal büyüme faktörü (EGF) benzer domain, membran bağlayan domain (MBD) ve globüler katalitik domain olmak üzere 3 farklı domain içerir. (Şekil 2.2). COX enzimleri lipid tabakasına MBD'nin penetre olmasıyla integral proteinler olarak bulunur (78).



Şekil 2. 2 COX-1 Monomer Yapısı (78)

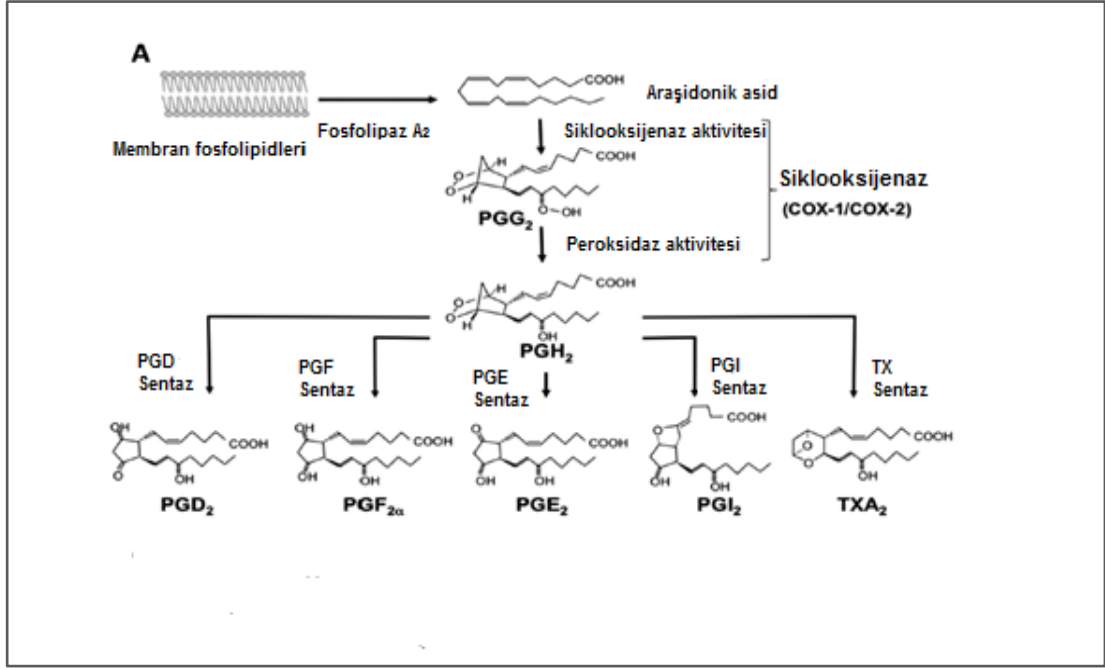
Sikooksijenaz enzimi hem siklooksijenaz hem de peroksidaz etkinliği gösteren iki aktif bölgeye sahiptir. Birinci basamakta enzimin siklooksijenaz aktivitesi araşidonik asitten hidroperoksi endoperoksit PGG₂ oluşmasını sağlarken peroksidaz aktivitesi ise PGG₂'nin redüksiyonu ve PGH₂ oluşmasını katalizler. Araşidonik asitin PGH₂'ye dönüştürülmesi sırasında ilk aşama COX aktif bölgesinde gerçekleşir. Araşidonik asite 2 molekül oksijen eklenerek bisiklik peroksit aracı PGG₂ oluşturulur. COX enzim yapısı substrat bağlama konusunda fonksiyonel bir öneme sahiptir. MBD domaini yalnızca enzimi çift katlı tabakaya bağlamaz aynı zamanda

COX aktif bölgesinin ağzını oluşturur. Bu yapısal yetenek AA'in çift katlı tabakanın hidrofobik kompartmanından direkt olarak COX aktif bölgesine girişini sağlar. Bu hidrofobik kanal MBD'den Tyr-385. amino asitine kadar uzanır. Bu kanal içinde bir kaç tane Arg-120 ve Ser-530 gibi polar rezidüler dikkat çekmektedir. Arg-120 amino asiti hidrofobik cebin ağız kısmına yakındır ve AA buradan içeri uzanarak 9 ve 11. karbon atomları arasında "saç tokası" şeklinde kıvrılarak pozisyon alır. Araşidonattan (13S)-hidrojen çıkarılarak araşidonil radikali oluşturulur ve Tyr-385 okside olur. Moleküler oksijen 9. ve 11. karbon atomları arasında endoperoksit köprü bağlantısı oluşturur. 15. karbon atomuna ikinci oksijen molekülü eklendiğinde PGG₂ oluşur ve PGG₂ enzimin lümenal bölgesindeki peroksidaz aktif bölgesine geçmek zorunda kalır (78). Sonunda peroksidaz aktivitesi PGG₂'nin 15-hidroperoksit grubunu alkole indirgeyerek PGH₂ oluşumuna sebep olur (80). (Şekil 2.3). İkinci basamakta ise kararsız olan PGH₂ spesifik dokularda spesifik enzimlerle prostanoidlere dönüşürken, trombositlerde tromboksan sentaz enzimi tarafından tromboksanlara(TXA₂) dönüşür (16).



Şekil 2. 3 Siklooksijenaz Yolağı Reaksiyonları (80).

C) Siklikendoperoksidlerden Prostanoid Türlerinin Oluşumu: Prostanoidler, prostaglandinleri (PG) ve tromboksanları (TXA) içeren bir eikozanoid grubudur. Prostanoid türleri yapısal bazı farklılıklar gösterir ve isimlendirilme bu yapısal farklılıklara göre yapılır. Prostaglandinler, prostasiklinler ve tromboksanlar tek doymamış bağlı (monoenoik), iki doymamış bağlı (dienoik) veya üç doymamış bağlı (trienoik) olurlar. Monoenoik, dienoik ve trienoik prostanoidlere sırasıyla I serisi, 2 serisi ve 3 serisi adı da verilir. Araşidonik asitten dienoik prostanoidler oluşur. Bunlar PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, PGİ₂ ve TxA₂'dir. (Şekil 2.4).



Şekil 2. 4 Siklooksijenaz Yoluğu ile Üretilen Prostanoidler (16)

Prostaglandinler (PG), iki karbon zincirinin ortasında bir siklopentan halkası bulunan eikozanoidlerdir. Siklopentan halkasındaki substituentlerin durumuna göre E, F, D, A, B ve C olarak gruplara ayrılırlar. Her bir grup içindeki üyeler, alifatik yan zincirler içindeki çift bağ sayısını gösteren ve grubu belirleyen harfin alt kısmına konulan 1, 2 veya 3 sayıları ile simgelenirler. Prostanoidler, yapıca prostaglandinlere benzerler. Prostaglandinlerden farkı, siklopentan halkasına ek olarak, C-6 ve C-9 atomları arasına yerleşen oksijen köprüsü nedeniyle ikinci bir halka daha içermeleri yani monosiklik değil bisiklik olmalarıdır. Prostaglandinlerin aksine bütün hücrelerde değil, esas olarak damar çeperindeki hücrelerde (endotelde ve az miktarda olmak üzere damar düz kas hücrelerinde) yapılırlar. Vücuttaki ana prostanoid olan PGI₂'nin (prostaglandin I₂) büyük kısmı damar endotel hücrelerinde PGSI (PGI₂ sentaz) ile yapılır. Prostanoidler damar içinde trombus oluşmasını engelleyen en önemli etkenlerdir. Tromboksanların yapıca prostaglandinlerden farkı, beşli siklopentan halkası yerine biri oksijen diğerleri karbon olan altı üyeli bir halka içermeleridir. Esas olarak trombositler tarafından sentez edilmeleriyle prostaglandinlerden ayrılırlar (16). Tromboksanlar belirli hücrelerde oluşmaları ve stabil olmaları bakımından prostanoidlere benzerler. Trombositlerde bulunan tromboksan sentaz enzimi PGH₂'yi tromboksan A₂'ye (TxA₂) dönüştürür. Tromboksanlar ve prostanoidler, trombositleri zıt yönde etkileyen ve onların agregasyon ve adezyonunu düzenleyen bir sistem oluştururlar (71).

Prostaglandin E₂ hücrelerde oldukça yaygın olarak bulunan PGE sentaz (PGES) enzimi ile PGH₂'den oluşturulan prostaglandin türüdür. PGE sentaz enziminin sیتozolik PGE sentaz (cPGES) ve membrana bağlı PGE sentaz (mPGES-1) olarak iki tipi vardır. cPGES yapısal olarak sentezlenen ve proinflatuar uyarılara nispeten daha

dirençli PGE2 sentaz enzimidir. mPGES ekspresyonu ise proinflamatuvar uyarılarla artırılır. Bir çok dokuda pro-inflamatuvar stimülasyon (IL-1 ve TNF gibi) cevabında PGE2 artışı ile COX-2 ve mPGES ekspresyonu upregülasyonu senkronize olarak artırılır (71).

Prostanoidler otokrin ve parakrin fonksiyonlarına sahip olmalarından dolayı lokal hormonlar gibi düşünülürler. Prostanoidlerin dokularda dağılımı hücrel enzimatik maddelere bağlı olmasına rağmen fizyolojik ve patolojik yanıtları çok geniş bir aralığı etkiler. Hücrede ilk olarak bir prostanoid biçimlenir, hücreden çıkar ve G-proteini reseptör kompleksiyle etkileşerek ya ana hücrede ya da yakınındaki komşu hücrelerde ikinci mesajcı düzeyini düzenler. (81). Prostanoid reseptörlerinin hepsi yedi transmembranal segmentli, G-proteini ile kenetli reseptörlerdir ve farmakolojik olarak DP, EP, FP, İP ve TP reseptörleri olarak sınıflandırmışlardır; bunların doğal kaynaklı en güçlü agonistleri sırasıyla prostaglandin D₂, prostaglandin E₂, prostaglandin F_{2α}, prostasiklin ve tromboksan A₂'dir (71). PGE2 dört farklı reseptörü (EP1-EP4) üzerine etki edebilir. Bu reseptörlerin her biri farklı sinyal transdüksiyonu yeteneğindedir ve farklı fizyolojik fonksiyonlar meydana getirirler (16).

Karaciğer, karaciğerde sentezlenen prostaglandinlerin hem hedefidir hem de bu medyatörlerin metabolizmasından ve degradasyonundan sorumludur. Eikozanoidlerin karaciğerde bir çok fizyolojik ve patojenik etkileri vardır (17). Karaciğer parankimal hücreler (hepatositler) ve çeşitli non-parankimal hücreler (endotel hücreleri, Kupffer hücreleri, lipositler, miyofibroblastlar) ve gezici anti-inflamatuvar hücreler içerir. Bu hücrelerin hepsi eikozanoid sentezleme yeteneğindedir fakat en önemlileri Kupffer hücreleri ve endotel hücreleridir. Kupffer hücreleri hem PG hem de LT üretme kabiliyetindedir. Kupffer hücrelerinde en fazla üretilen eikozanoidler PGD₂, PGE₂, TxA₂, LTB₄ ve LTC₄'dür. Kupffer hücrelerinin aktivasyonu hem fagositoz hem de inflamatuvar cevabın başlamasına neden olur ve beraberinde oksijen radikallerinin ve çeşitli hücre hasar mediyatörleri TNF-α, interferon-γ ve lökotrien salınımı gerçekleşerek endotel hücrelerinde ve hepatositlerde hasara yol açar ve sinosoidlerde intravasküler koagülasyonu başlatır. Bununla birlikte, Kupffer hücreleri PGE₂ salınımı eşliğinde komşu hepatositler üzerinde sitoprotektif koruma sağlar. Kupffer hücreleri inflamatuvar cevabı başlatma ve sitoprotektif koruma sağlama yeteneğindedir. Kupffer hücrelerinden devamlı salınan PGE₂ sitokinler üzerinde negatiffeedback sağlar. Böylece organizma kendini korur hale gelmiş olur (17). Bu bağlamda TNF-α'nın makrofajlardan PGE₂ üretimini artırdığı ve PGE₂'nin ise TNF-α sentezini inhibe ettiği ve bu yolla Kupffer hücrelerinden salınan PGE₂'nin protektif etki sağladığı gösterilmiştir (82).

Son zamanlarda karaciğer transplantasyonu sonrasında reperfüzyonun takip ettiği iskemi durumunda PGE₂ aktivasyonunun iskemi reperfüzyon hasarına karşı direnç sağladığı ayrıca sitokin kaskadının regülasyonu yoluyla karaciğer hasarını restore ettiği düşünülmektedir (20; 21).

Çalışmamızda karaciğerde iskemi reperfüzyonun neden olduğu hasarın bazı biyokimyasal ve histolojik parametreler üzerinden değerlendirilmesi ve karaciğer (KC) iskemi/reperfüzyon (I/R) modelinde araşidonik asit salınımı ve buna bağlı inflamatuvar yolağa etkisini incelemeyi amaçladık. Bu amaç doğrultusunda 3 temel hedefe erişmek istedik. 1) KC iskemi/reperfüzyonu oluşturmak. 2) Oluşturulan KC I/R modelinde araşidonik asit miktarını belirlemek. 3) KC I/R modelinde fosfolipaz A2 (PLA2) ve siklooksijenaz (COX) enzim aktiviteleri değerlendirilip, KC dokularında AA yolağının son ürünlerinden biri olan prostaglandin E2 (PGE2) düzeylerini ölçmek. Elde edilen verileri değerlendirerek KC IRH'da araşidonik asit salınımı ve buna bağlı inflamatuvar yolağa etkisini inceledik.

Bu anlamda çalışmamız KC IR hasarının AA kaynaklı inflamatuvar yolağa etkisini inceleyen ilk araştırmadır ve literatüre yoktur.

GEREÇ VE YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Patoloji Anabilim Dalları ve Deneysel Hayvanlar Ünitesinin ortak çalışmasıyla gerçekleştirilen bu çalışmada 15 adet 5-8 aylık, ortalama 350-450 gr ağırlığında erkek Wistar sıçanlar kullanılmıştır. Denekler üzerinde yapılan tüm işlemler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanı Bakım ve Kullanım Kurulu tarafından değerlendirilmiş ve onaylanmıştır.

3.1. Gruplandırma

Deneysel Hayvanlar Ünitesinden, planlanan operasyon gününden 15 gün önce rastgele alınan toplam 15 adet sıçan, KC/I/R grubunda 10 hayvan (n=10) ve sham grubunda 5 hayvan (n=5) olacak şekilde iki gruba ayrılmıştır. Hayvanların bakımı 12 saatlik karanlık/aydınlık siklusu uygulanmak suretiyle paslanmaz çelik kafeslerde ve 23 ± 1 °C'de sürdürülmüştür. Bu süre içinde hayvanlar 6.05% ham yağ içeren (linoleik asit, linolenik asit, doymuş yağ asitleri ve monoansatüre yağ asitleri) ticari sıçan yemi (Korkutelim Yem, Antalya, Türkiye) ve musluk suyu ile beslenmiştir.

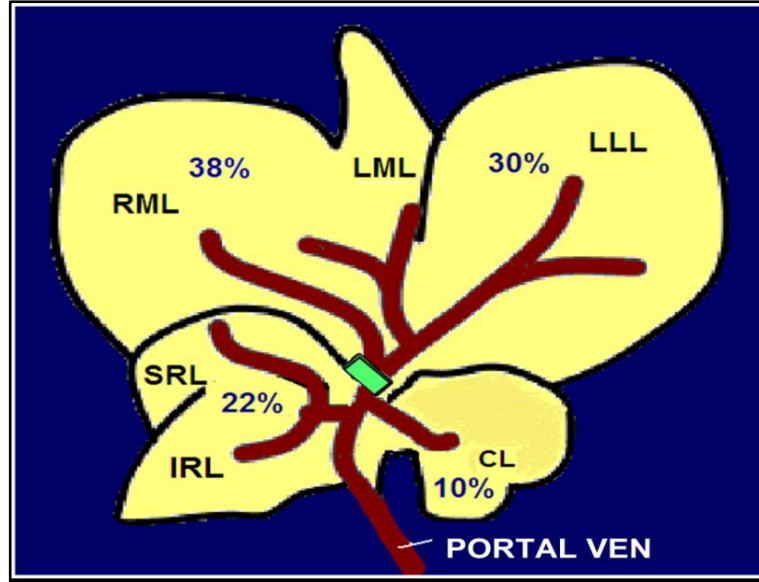
Kontrol ve I/R grubu: Sıçanlardan 10 tanesi ile KC I/R grubu ve kontrol grubu oluşturulmuştur. KC I/R grubunda iskemi oluşturulmayan KC lobları kontrol grubunu teşkil edeceği için 10 sıçanın her birinden hem kontrol hem de I/R grubu için doku alınmıştır.

Sham grubu: 5 adet sıçan ile Sham grubu oluşturulmuştur. Sham grubundaki hayvanlara anestezi eşliğinde sadece laparotomi uygulanmıştır. Sham grubunun amacı sıçanlara uygulanacak laparotomi ve anestezi işlemlerinin bakılacak parametreler üzerindeki etkinliğini değerlendirmektir.

3.2. Cerrahi Protokol

Uygulanan I/R modeli "ılık lobar iskemi" modelidir. Bu uygulamada hayvanlar ameliyattan önce 12 saat aç bırakılarak istediği zaman musluk suyu içmesine izin verilmiştir. Cerrahi öncesi sıçanlara 1.2 g/kg dozunda intraperitoneal olarak üretilen uygulanarak anestezi yapılmıştır. Kuyruk veninden serum Alanin amino transferaz (ALT) ölçümleri için kan alınmıştır. Anestezi sonrasında abdomenleri tıraş edilerek betadin ile dezenfeksiyon sağlanmıştır. Batın orta hat kesisi ile açılarak daha önceki çalışmalarda (83; 84) yapıldığı gibi KC lobları nazikçe kaldırılarak portal ven ve hepatik arterin dalları açığa çıkarılmıştır. Karaciğerin orta ve sol lateral hepatik loblarını besleyen portal dallar 60 dakika süreyle klempe edilerek KC dokusunun yaklaşık dörtte üçü iskemi yapılmıştır. (Şekil 3.1). Bu sürenin sonunda klempe açılarak

60 dakika boyunca da reperfüzyon sağlanmıştır. Tüm operasyon süresince sıçanların abdomenleri ısıtma lambaları ile ısıtılarak vücut ısıları korunmuştur. Hayvanlar sakrifiye edilmeden önce iskemi sonrası serum ALT ölçümleri için sağ ventrikülden kan alınmıştır. İskemi reperfüzyon periyodunun sonunda sol ventrikülden inferiyor vena kava içine injekte edilen %0.9'luk NaCl ile KC perfüze edilerek doku kandan arındırılmıştır. Yıkama sonrasında hayvanlar sakrifiye edilerek KC sağ ve sol loblar eksize edilmiştir. Uygulanan I/R modelinde KC'in kaudal ve sağ lateral lobu intakt kalmaktadır. Bu loblar iskemi oluşturulmayan kontrol KC grubu olarak, sol ve orta loblardan alınan dokular I/R oluşturulan KC grubu olarak değerlendirilmiştir. Alınan dokuların bir bölümü sıvı nitrojen içerisinde dondurulurken, histopatolojik inceleme yöntemleri için de doku örnekleri alınmıştır ve %4 paraformaldehid/tampon karışımı içerikli solüsyona koyulmuştur. İskemi öncesinde ve iskemi sonrasında sırasıyla kuyruk veninden ve sağ ventrikülden alınan kan örnekleri 4°C'de 2000 g'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra ayrılan plazma ve biyokimyasal analiz için ayrılan dokular çalışma gününe kadar derin dondurucuda -80 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.1 Sıçan Karaciğeri Şematik Portal Ven Anatomisi. RML: Sağ orta lob, LML: Sol orta lob, LLL: Sol lateral lob, SRL: Üst sağ lob, IRL: Alt sağ lob, CL: Kaudal lob (85) (Martins'den modifiye edilmiştir.)

3.3. Karaciğer Doku Örneklerinin Histopatolojik İncelenmesi

Her bir deney hayvanından elde edilen iskemik ve iskemik olmayan KC doku örnekleri %10'luk formalin (Sigma- Accustain) içerisinde 16 saat fikse edilmiştir. Fikse olan dokular %70'lik etanol içerisinde bir gece bekletildikten sonra % 0.2 glisin içeren fosfat/salin tamponu içerisinde yıkanarak parafin ile bloklanmıştır. Parafin bloklardan 4 µm'lik sagittal kesitler yapılarak (+) şarjlı lam üzerine alınmıştır. Parafin kesitlerde hemotoksilen eozin boyama yapılmıştır. Işık mikroskopunda x200 büyütmede 20 alan bakılarak konjesyon, hepatosellüler değişiklikler, hücresel şişme

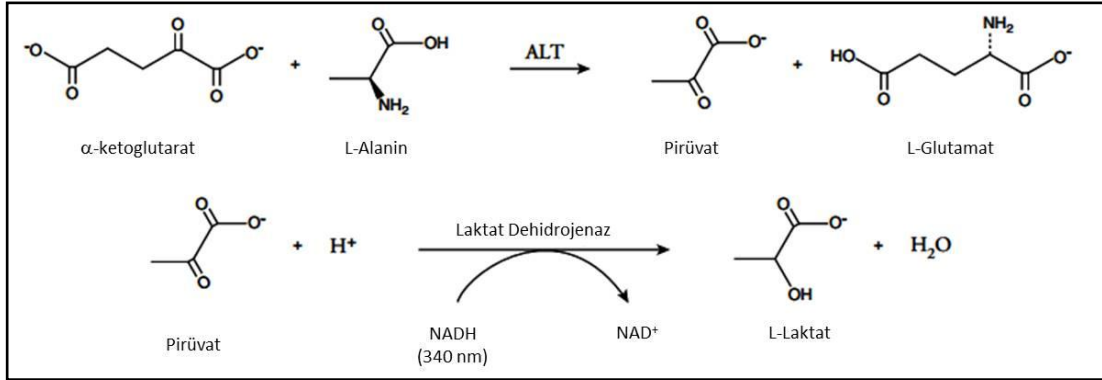
ve nekroz varlığı değerlendirilerek bulgular üzerinden daha önce tanımlandığı gibi skorlama yapılmıştır (86).

Konjesyon ve intrasellüler ödem (hiç olmaması = 0, Zon III'de olması = 1, Zon II-III'de olması = 2, Zon I-II-III panasiner = 3), nekrozis (Hiç olmaması = 0, Zon I'de tek ya da fokal nekroz = 1, submassif (köprüleşme) nekroz = 2, köprüleşme nekrozu + Masif nekroz + infakt = 3) derecelerine göre değerlendirilmiştir. Total histopatolojik skor her bir parametre için verilen skorların toplamından (ortalama \pm SD) hesaplanmıştır.

3.4. Serum Alanin Aminotransferaz (ALT) Enzim Aktivitesinin Ölçümü

KC I/R hasarının bir göstergesi olarak tüm gruplarda serum ALT düzeyleri ticari bir kit (Cayman Chemical, Cat No: 700260, Ann Arbor, MI, USA) ile ölçülmüştür.

Prinsip: ALT enzimi varlığında L-glutamat α -ketoglutarata, L-alanin ise piruvata dönüşür. Oluşan piruvat, laktat dehidrojenaz (LDH) enzim katalizi ile L-laktat'a dönüşürken NADH'da NAD'a okside olur. ALT aktivitesinin ölçülmesi LDH enziminin gerçekleştirdiği bir reaksiyon sisteminde NADH oksidasyonunun izlenmesiyle gerçekleştirilir. Enzim miktarı olarak tanımlanan 1 U/ml ALT enzimi 37°C'de 1 μ mol NADH oksidasyonuna sebep olur. (Şekil 3.2). Reaksiyon 1 μ mol NADH'ın 340nm'deki molar absoblama katsayısı (4.11 mM^{-1}) kullanılarak tanımlanır.



Şekil 3.2 ALT Enzim Aktivitesi

İşlemler: İskemi öncesinde ve iskemi sonrasında sırasıyla kuyruk veninden ve sağ ventrikülden alınan kan örnekleri 4°C'de 2000 g'de 15 dakika santrifüj edilerek serum tabakası ayrılmıştır. Analiz, kit prosedüründe tarif edildiği gibi yapılmıştır. Örneklerin 340 nm'de ki absorbans değişimi plate okuyucu ile (Biotek Marka MicroQuant) 1'er dakikalık aralıklarla 5 dakika boyunca takip edilmiştir.

ALT Enzim Aktivitesinin Hesaplanması: Her bir örnek için zamana göre azalan absorbans değerlerinin lineer grafiği çizilmiştir. Bir dakikada gerçekleşen absorbans değişimini (ΔA_{340}) hesaplamak için aşağıdaki denklem kullanılmıştır.

$$\Delta A_{340}/\text{dakika} = \frac{A_{340}(\text{zaman } 2) - A_{340}(\text{zaman } 1)}{\text{zaman } 2(\text{dakika}) - \text{zaman } 1(\text{dakika})}$$

ALT aktivitesi, 340 nm'deki absorbans değişimi (ΔA_{340}) ve NADH molar absorblama katsayısının (4.11 mM^{-1}) kullanıldığı bir denkleme göre hesaplanmıştır. Denklem aşığıda verilmiştir. Buna göre; 340 nm'deki absorbans değişimi (ΔA_{340}) NADH molar absorblama katsayısı (4.11 mM^{-1}) ile bölünmüştür. Bulunan değer dilüsyon faktörü (DF, ölçüm küvetindeki toplam hacim/numune hacmi) ve örnek dilüsyon faktörü (ÖDF) ile çarpılarak ALT aktivitesi U/ml olarak hesaplandı. Sonuç 1000 ile çarpılarak U/L olarak verilmiştir.

$$\text{ALT aktivitesi (U/ml)} = \frac{\Delta A_{340}(\text{dakika})}{4.11 \text{ mM}^{-1}} \times \text{DF} \times \text{ÖDF}$$

3.5. Elektrosprey İyonizasyon Kütle Spektrometri Ölçümleri

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Kütle Laboratuvarında, ultra-hızlı sıvı kromatografi (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japonya) sistemine bağımlı LC-MS/MS (LCMS-8040 Shimadzu Corporation, Japonya) cihazı vardır. Bu sistemde grubumuz tarafından AA (C20:4n6) ölçümleri yapılmış ve çeşitli çalışmalar kapsamında yayınlanmıştır. Bu çalışma kapsamında da KC I/R ve kontrol dokularında LC-MS/MS ile AA ölçümü daha önce tanımlandığı şekilde yapılmıştır (69; 87).

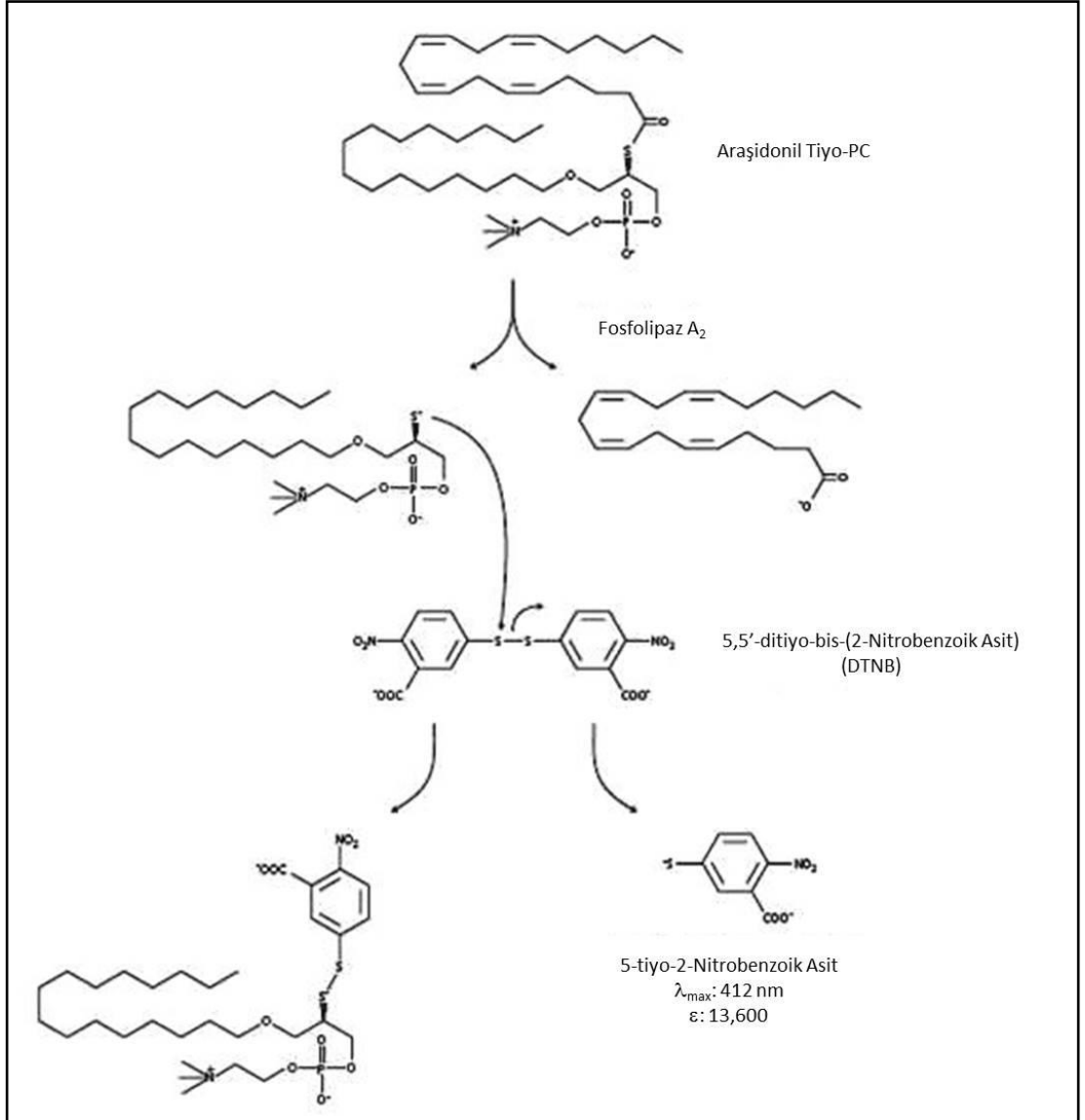
LC-MS/MS için örnek hazırlanması: Bütün dokular tartılarak 4°C 'deki homojenizasyon tamponu içerisinde (50 mM K_2HPO_4 , 80 μM leupeptin, 2.1 mM Pefabloc SC, 1mM fenilmetilsülfonil florid, 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, pH 7.4) içinde homojenize edilmiştir. Doku homojenatları 4°C ve 10,000 g'de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar analiz yapılana kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir. LC-MS/MS analizi için örnek hazırlamak üzere, 12 ml kapaklı cam tüplere 200 μl AA-d8 internal standart ve 200 μl doku süpernatantı ilave edilmiştir. Üzerine 1 ml Asetonitril/%37 HCl asit (Cayman, Ann Arbor, MI, USA) karışımından ilave edilerek şişeler kapatılmıştır. (Bu karışım 4:1 v/v oranında hazırlanmalıdır). Örnekler ısıtıcı blok (VLM, Bielefeld, Germany) üzerinde 90°C 'de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu şekilde hidroliz edilen örnekler oda sıcaklığında soğutulmuş ve 2 ml hekzan ilave edilerek yağ asitleri ekstakte edilmiştir. 20 sn vortekslemenin ardından oda ısında 5 dk bekletilmiştir. Daha sonra 3000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek üst fazın %75'i alınmış ve yağ asitleri cam tüplere transfer edilmiştir. Bu örnekler oda ısısında yüksekliği ayarlanabilen gaz dağıtım ünitesi (VLM, Bielefeld, Germany) ile sabit nitrojen akışı altında buharlaştırılmıştır. Kuruyan yağ asitleri 200 μl metanol/distile su karışımında (180:20, v/v) çözülmüştür. 0.2 μm politetrafloroetilen enjeksiyon filtreleri (Whatman, GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, USA) ile filtre edilmiştir. Hazırlanan örnekler HPLC örnek şişelerine (Vertical Chromatography, Nonthaburi, Thailand.) koyularak LC-MS/MS analizi yapılmıştır.

LC-MS/MS Analizi: Bu çalışma kapsamında AA (C20:4n-6), DGLA (C20:3n-6), EPA (C20:5n-3) ve DHA (C22:6n-3) için standartlar Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA) ve döteryum etiketli AA-d8 internal standart (5,6,8,9,11,12,14,15-AA-d8) Santa Cruz Biotechnology (SantaCruz, CA, USA) ürünlerinden temin edilmiştir. AA, DGLA, EPA, DHA ve AA-d8 standart solüsyonları analitik grade metanol (Merck, Darmstadt, Germany) içinde hazırlanmıştır. Optimize edilmiş çoklu reaksiyon izleme metodu (MRM), tandem kütle spektrometresi (MS/MS) ile kombine ultra hızlı sıvı kromatografisi (UFLC) kullanılarak geliştirilmiştir. UFLC sistem (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japan), LCMS-8040 üçlü kuadropol kütle spektrometresi (Shimadzu Corporation, Japan) ile kombine edilmiştir. İnertsil HPLC kolon (ODS-4, 2.1 x100 mm, 3µm; GL Sciences Inc. Tokyo, Japan) kullanılarak oluşturulan kromatografik ayrılma 40°C'de sürdürülmüştür. DHA, EPA, AA, DGLA gradient elüsyonu (akış hızı 0.45 ml/dakika) ile ayrılmaktadır. Mobil faz olarak kullanılan solvent A 10 mM amonyum asetat (Sigma-Aldrich.St. Louis MO, USA), solvent B asetonitril (Sigma-Aldrich. St. Louis MO, USA)'den oluşmaktadır. Gradient programı solvent B, 70% (0 dakika), 90% (3 dakika), 100% (3.01-4 dakika) ve 70 % (4.01-8 dakika) olarak uygulanmıştır. Negatif elektrosprey iyonizasyon (ESI) içindeki özgün bileşimler için MRM geçiş ve cevapları otomatik olarak optimize edilmiştir. AA, DHA, EPA, DGLA ve AA-d8 için negatif ESI-MS mod öncül ve ürün m/z değerleri bulgular bölümünde verilmiştir. AA, DHA, EPA, DGLA 100 ng/ml-30 µg/ml lineer kalibrasyon aralığında optimize edilmiştir ve örnek ölçüm süresi 8 dakika olarak uygulanmıştır.

3.6. Karaciğer Total Fosfolipaz A2 (PLA2) Düzeylerinin Ölçülmesi

Çalışmamızda karaciğer fosfolipaz A2 enzim aktivitesi ticari bir kit (Abcam, Cat No: ab133090, Cambridge, MA, USA) ile ölçülmüştür.

Prensip: Sitoplazmik fosfolipaz A2, araşidonik asite spesifik bir aktivite gösterir. Bu enzimin fosfolipaz aktivitesini ölçmek için ortama sentetik bir substratı olan Araşidonoil tiyo-PC ilave edilir. PLA2 enzim aktivitesi ile bu sentetik substratın sn-2 pozisyonundaki araşidonoil tiyolester bağının hidrolizi ile açığa çıkacak serbest tiyol grubu DTNB (5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit)) reaktifi ile reaksiyona sokularak enzim aktivitesi ölçülür. Enzim miktarı olarak tanımlanan bir ünite enzim aktivitesi 25°C'de 1 dakikada 1 µmol araşidonoil tiyo-PC hidroliz eder. (Şekil 3.3)



Şekil 3.3 PLA2 Enzim Aktivitesi

İşlemler: KC doku örnekleri tartılarak 1 mM EDTA içeren 50 mmol/L sodyum fosfat tamponu (pH 7.4) ile buz üzerinde homojenize edilmiştir (PRO 200 Homogenizater, PRO Scientific Inc.,Connecticut, USA). Homojenize edilen örnekler 4 C⁰de 10.000 g'de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatantı ayrılmış ve çalışma yapılana kadar -80 C⁰de muhafaza edilmiştir. Ölçüm yapılmadan önce örneklerdeki interferansa sebep olabilecek düşük moleküler ağırlıklı kontaminantlar 10-kDa moleküler ağırlığa geçiren ultrafiltreler (Amicon, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) aracılığıyla temizlenmiştir. Bu işlem için 400 µl süpernatant 10-kDa moleküler ağırlığa geçiren filtre içeren ependorflara koyularak 25°C ve 10.000 g'de 30 dakika ultrasantrifügasyon yapılmıştır. Bu işlem sonrası eksilen örnek hacmi 1 mM EDTA içeren 50 mmol/L sodyum fosfat tamponu (pH 7.4) ile tamamlanmıştır ve analiz için bu örnekler kullanılmıştır. Analiz, kit prosedüründe tarif edildiği gibi yapılmış ve örneklerin 414 nm'de ki absorbans değerleri okutulmuştur.

cPLA2 Enzim Aktivitesinin Hesaplanması: PLA2 enzim aktivitesi aşağıda verilen denklem ile hesaplanmıştır. Örnek koyulmayan non-enzimatik kontrol (kör) kuyucuğunun ortalama absorbands değeri örnek kuyucuklarının absorbands değerinden çıkarılarak elde edilen değer inkübasyon süresine (60 dakika) bölünmüş ve her örneğin absorbands değeri elde edilmiştir. Bu değerler DTNB için 414 nm'de molar absorblama katsayısı (10.66 mM^{-1}) ile bölünmüştür. Elde edilen değer DF (ölçüm küvetindeki toplam hacim/numune hacmi) ve örnek dilüsyon faktörü (ÖDF) ile çarpılmıştır. cPLA2 aktivitesi $\mu\text{mol/dakika/ml}$ olarak ifade edilmiştir.

$$\text{cPLA2 Aktivitesi} = \frac{\Delta A_{414}/\text{dakika}}{10.66 \text{ mM}^{-1}} \times \text{DF} \times \text{ÖDF} = \mu\text{mol/dakika/ml}$$

Elde edilen değerler protein miktarına bölünerek cPLA2 enzim miktarı mU/mg olarak ifade edilmiştir.

3.7. Karaciğer Siklooksijenaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Çalışmamızda COX enzim aktivitesini belirlemek için ticari bit kit (Cayman Chemical, Cat No: 760151 Ann Arbor, MI, USA) kullanılmıştır.

Prensip: COX enzimi siklooksijenaz ve peroksidaz aktivitesi gösteren bifonksiyonel bir enzimdir. Siklooksijenaz komponenti araşidonik asidi hidroksi endoperoksida (Prostaglandin G₂; PGG₂) çevirirken peroksidaz komponenti hidroksi endoperoksidleri okside ederek karşılık gelen alkole (prostaglandin H₂; PGH₂) çevirir. COX enzim aktivitesinin ölçümü, enzimin peroksidaz aktivitesinden yararlanılarak 590 nm'de okside N,N,N',N' tetrametil-p-fenilendiamin (TMPD)'nin görünümünün kolorimetrik olarak izlenmesiyle sağlanır. Enzim miktarı olarak tanımlanan bir ünite enzim aktivitesi bir dakikada 25 °C'de 1 nmol TMPD oksidasyonuna sebep olur.

İşlemler: KC doku örnekleri tartılarak 1 mM EDTA içeren 0.1 M Tris-HCl, tamponu (pH 7.8) ile buz üzerinde homojenize edilmiştir (PRO 200 Homogenizater, PRO Scientific Inc., Connecticut, USA). Homojenize edilen örnekler 4 C⁰'de 10.000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar ayrılarak -80 C⁰'de muhafaza edilmiştir. COX aktivite tayini için bu süpernatantlar kullanılmıştır. Örneklerin COX enzim aktivitesi dışındaki arka plan absorbands değerini elde etmek için her bir örnekten 150 μl alınarak 500 μl mikrofüj tüpe transfer edilmiş ve 5 dakika kaynayan suya yerleştirilmiştir. Daha sonra bu tüpler 8000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşturulan inaktif örnek süpernatantı arka plan absorbands değeri oluşturmak için kullanılmıştır. Analiz, kit prosedüründe tarif edildiği gibi yapılmıştır. Örneklerin 590 nm'de ki absorbands değerleri plate okuyucu ile (Biotek Marka MicroQuant) okutulmuştur.

Siklooksijenaz Enzim Aktivitesinin Hesaplanması: Her bir örnek için kuyucukların ortalama absorbands değerleri hesaplanmıştır. İnaktif örnek bulunan kuyucuklarının absorbands değeri örnek absorbands değerinden çıkarılarak doğrulanan absorbands

hesaplanmıştır. Elde edilen doğrulanmış absorpsiyon değerleri inkübasyon süresine (5 dakika) bölünmüştür. Bu değerler 590 nm’de TMPD molar absorpsiyon katsayısı (0.00826 μM^{-1})’na bölünerek dilüsyon faktörü ile çarpılmıştır.

$$\text{Cox Aktivitesi: } \frac{\Delta A_{590}/5\text{dakika}}{0.00826 \mu\text{M}^{-1}} \times \text{DF} \div 2 \text{ *nmol/dakika/ml (U/ml)}$$

*2 molekül TMPD PGG2’yi PGH2’ye dönüştürür.

Elde edilen değerler protein miktarına bölünerek COX enzim miktarı U/mg olarak ifade edilmiştir.

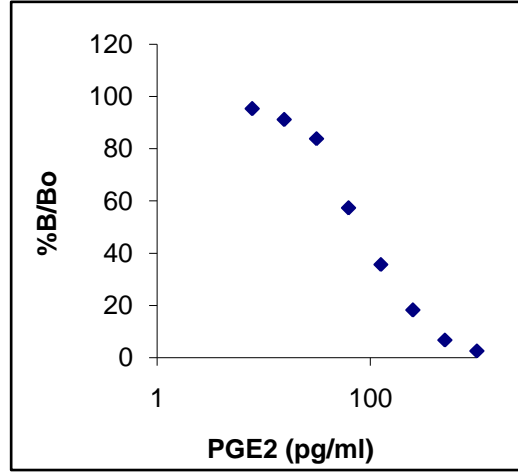
3.8. Karaciğer Prostaglandin E2 Düzeylerinin Ölçülmesi

Çalışmamızda karaciğer doku örneklerindeki PGE2 düzeyi üretici talimatlarına göre ticari bir enzim immünassay kit (Cayman Chemical, Cat No: 514010 Ann Arbor, MI, USA) ile tayin edilmiştir.

Prensip: Bu deney sınırlı miktarda var olan PGE2 monoklonal antikoruna bağlanmak için PGE2 ve asetilkolinesteraz (AChE) bağlı PGE2 arasındaki yarışa dayanır. Çünkü, örnekte değişen konsantrasyonda PGE2 varken AChE bağlı PGE2 konsantrasyonu sabit tutulur; AChE bağlı PGE2, PGE2 konsantrasyonuna ters orantılı olarak monoklonal PGE2 antikoruna bağlanır. Oluşan antikor-PGE2 kompleksi önceden kuyucuğa bağlanmış olan keçi poliklonal anti-fare IgG antikoruna bağlanma yeteneğindedir. Bağlanma gerçekleştiğinde kuyucuklar yıkanarak bağlanmamış reaktanlar uzaklaştırılır. Daha sonra kuyucuğa AChE substratı eklenir. Bu substrat asetilkolin ve 5,5’-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit) içerir. AChE bağlı PGE2 miktarının ölçülmesi, substrat ile AChE aktivitesinin ölçülmesi esasına dayanır. AChE tarafından asetilkolin hidroliziyle tiokolin oluşur. Tiokolinin 5,5’-dithio-bis-(2-nitrobenzoik asit) ile non-enzimatik reaksiyonu sonucu 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşur. Bu enzimatik reaksiyonun ürünleri belirgin sarı renge ve 412 nm’de güçlü absorpsiyonla sahiptir. Bu rengin yoğunluğunun tanımlanması PGE2 miktarının belirlenmesini sağlar. Rengin yoğunluğu numune içindeki PGE2 miktarı ile ters orantılıdır. Örnekteki PGE2 konsantrasyonları absorpsiyon değerleri ile standart eğri aracılığıyla hesaplanır.

Standartların ölçülmesi: 8 adet ependorf 1’den 8’e kadar numaralandırılmıştır. S1 tüpüne 900 μl EIA tampon ve üzerine 100 μl standart tampon (10 ng/ml) koyulmuştur. S2,S3,S4,S5,S6,S7,S8 tüplerine ise 500 μl EIA tampon koyulmuştur. S1 tüpündeki karışımdan 500 μl S2 tüpüne aktarılmıştır. Bu işlem 500’er μl olarak S8 tüpüne kadar tekrarlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan PGE2 standartları aynı numune gibi çalışılmıştır. Bilinen PGE2 standartlarının absorpsiyon değerlerinin standart eğrisi PGE2 standart konsantrasyonlarının (pg/ml) logaritmasının fonksiyonu olarak çizilmiştir. (Şeki 3.4). Standart eğrinin çizilmesinde

windows version 5,03. için GraphPad Prism Software programı (GraphPad Software Inc) kullanılmıştır.



Şekil 3. 4 Prostaglandin E2 (pg/ml) Standart Grafiği B: Standart Bağlanma, B0: Maksimum bağlanma

İşlemler: KC doku örnekleri tartılarak 1 mM EDTA ve 10 µl indometazin içeren 0.1 M soğuk fosfat tamponu (pH 7.4) ile buz üzerinde homojenize edilmiştir (PRO 200 Homogenizater, PRO Scientific Inc.,Connecticut, USA). Homojenize edilen örnekler 4 C⁰de 10.000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar ayrılarak -80 C⁰de muhafaza edilmiştir. Ölçümler için bu süpernatantlar kullanılmıştır. Karaciğer doku örneklerindeki PGE2 düzeylerinin ölçümü üretici talimatlarına göre yapılmıştır.

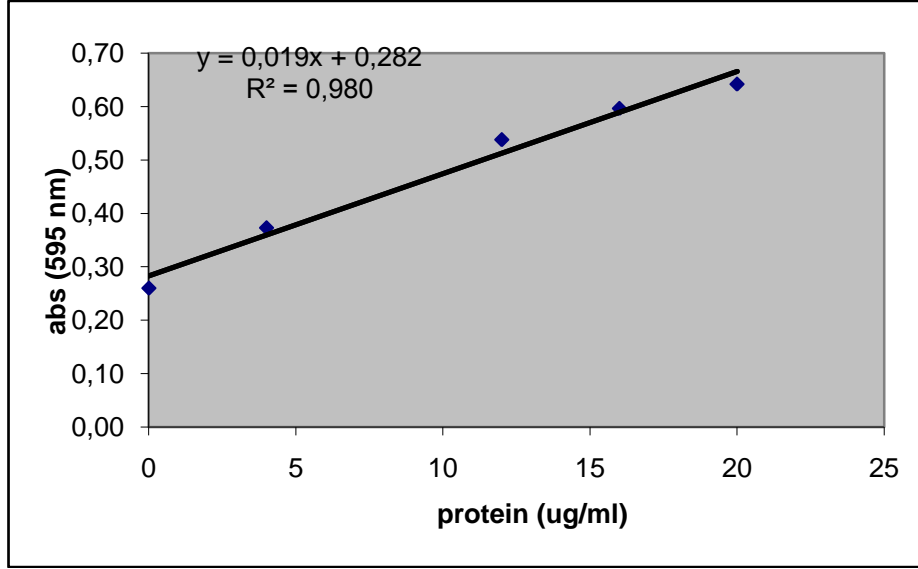
Prostaglandin E2 Düzeylerinin Hesaplanması: Her örnek için absorbans değerleri hesaplandıktan sonra PGE2 miktarları standart eğri grafiği yardımıyla pg/ml olarak hesaplanmıştır. Elde edilen değerler protein miktarına bölünerek PGE2 miktarı pg /mg olarak ifade edilmiştir.

3.9. Protein Tayini

KC dokusunda protein tayini modifiye Bredford yöntemine dayanan ticari bir kit (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, Pierce-1856210) ile yapılmıştır (88).

İşlemler: 1 µl doku süpernatantı 999 µl distile su ile sulandırıldıktan (1:1000) sonra üzerine 1 ml CPPA (Coomassie Plus Protein Assay) reaktifi eklenmiş ve 595 nm'de absorbans değerleri spektrofotometrik olarak okutulmuştur. Standart çalışması ise, numune yerine artan konsantrasyonlarda 1:1000 sulandırmaya sahip 2 µg/µl bovin serum albümin (BSA; Albümin Bovina, Pierce-23209) kullanılarak yapılmıştır.

Protein Miktarının Hesaplanması: Dokulardaki protein miktarı standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. (Şekil 3. 5).



Şekil 3. 5 KC Dokusu Protein Miktarı Standart Grafiği

3.10. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Sigma Stat 2.03 Windows XP paket programı ile yapılmıştır. P değeri < 0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Elde edilen verilerin karşılaştırılmasında uygulanan istatistiksel metodlar bulgular kısmında ayrıntılı olarak yazılmıştır.

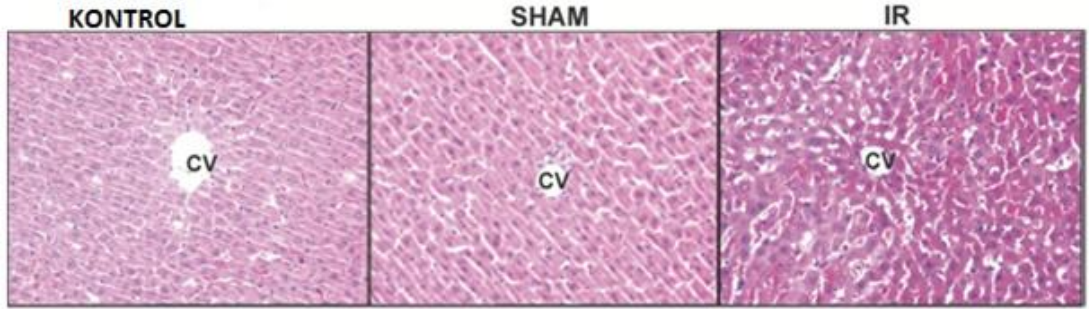
BULGULAR

4.1. Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarının Analizi

Karaciğer dokusunun iskemi reperfüzyon hasarını belirlemek üzere her bir deney grubundan alınan temsili KC dokularının histopatolojik incelenmesi yapılarak deney grupları arasında farklı mikroskopik görünümeler belirlenmiştir. (Şekil 4.1). Ayrıca KC hasar belirteci olarak her örneğin KC serum ALT düzeyleri ölçülmüştü. (Tablo 4.2).

Karaciğer Hematoksilen Eozin Boyaması

Karaciğer hemotoksilen eozin boyaması sonucu, kontrol ve sham grubunda hepatositler ve portal alanların yapıları normal görünümde idi. Hepatositler, vena sentralis çevresinde ışınal tarzda yerleşmiş hücre kordonları şeklinde bulunuyordu. Aralarında bulunan sinuzoidler normal genişlikte ve yapıda gözlenirken, herhangi bir hücre infiltrasyonu gözlenmedi. I/R grubunda, hepatosit hücre kordonlarının bütünlüğü bozulmuş, KC parankimi içinde rastgele dağılmış, multipl ve yaygın hepatosit nekroz alanları vardı. Parankimal alanlarda nötrofil infiltrasyonu, sinuzoidlerde genişleme ve konjesyon izlendi. (Şekil 4.1).



Şekil 4. 1 Rat Karaciğerinin Hematoksilen Eozin Boyaması IR:iskemi Reperfüzyon, CV:Santral ven, Büyütme:20X

Karaciğer dokusunun histopatolojik skorlaması tablo 4.1’de verilmiştir. Buna göre KC kesitlerinin histopatolojik olarak değerlendirilmesinde karaciğer I/R yapılan grubun intraselüler ödem, konjesyon ve nekroz değerleri kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik saptanmıştır ($p<0.05$). Bu sonuçların karaciğer I/R grubunun total skronuna yansıdığı ve IR grubunun total skor değerlerinin kontrol ve sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$).

Tablo 4.1 KC Kesitlerinin Histopatolojik Skorlaması. n: Denek sayısı, IR: iskemi reperfüzyon

Grup	Konjesyon	Hücre İçi Ödem	Nekroz	Total Skor
Sham (n=4)	0.50 ±0.58	0.50 ±0.58	0.75 ±0.50	1.75 ± 0.50
Kontrol (n=8)	1.25± 0.89	0.63 ± 0.52	0.25±0.46	2.13 ± 1.46
IR (n=8)	2.00±1.07 ^a	1.88±0.64 ^b	1.88 ± 0.84 ^b	5.75 ± 2.12 ^b

a: p<0.05 IR grubu ile sham grubunun karşılaştırılması;

b: p<0.05 IR grubu ile sham ve kontrol grubunun karşılaştırılması.

Total histopatolojik skor her bir parametre için verilen skorların toplamından (ortalama ± standard deviasyon [SD]) hesaplanmıştır. Konjesyon, nekroz ve total skor için istatistiksel analiz tek yönlü ANAOVA analizi ile yapılmıştır. Gruplar arası farklılıklar Tukey testi ile değerlendirilmiştir. İntraselüler ödem için istatistiksel analiz Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi ile yapılmıştır. Gruplar arası farklılıklar Dunn's methodu ile değerlendirilmiştir.

Serum ALT Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Çalışmamıza alınan tüm deney gruplarının serum ALT enzim aktivitesi ve gruplar arasındaki ilişki tablo 4.2'de gösterilmiştir. Buna göre karaciğer I/R yapılan grubun ALT aktivite değerleri, kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik görülmüştür (p<0.05).

Tablo 4.2 Serum Alanin Aminotransferaz Aktivitesi. n: Denek sayısı, IR: iskemi reperfüzyon

Grup	n	Serum ALT (U/L)
Kontrol	10	27.56±4.41
Sham	5	24.61±2.40
IR	10	198.25±44.56*

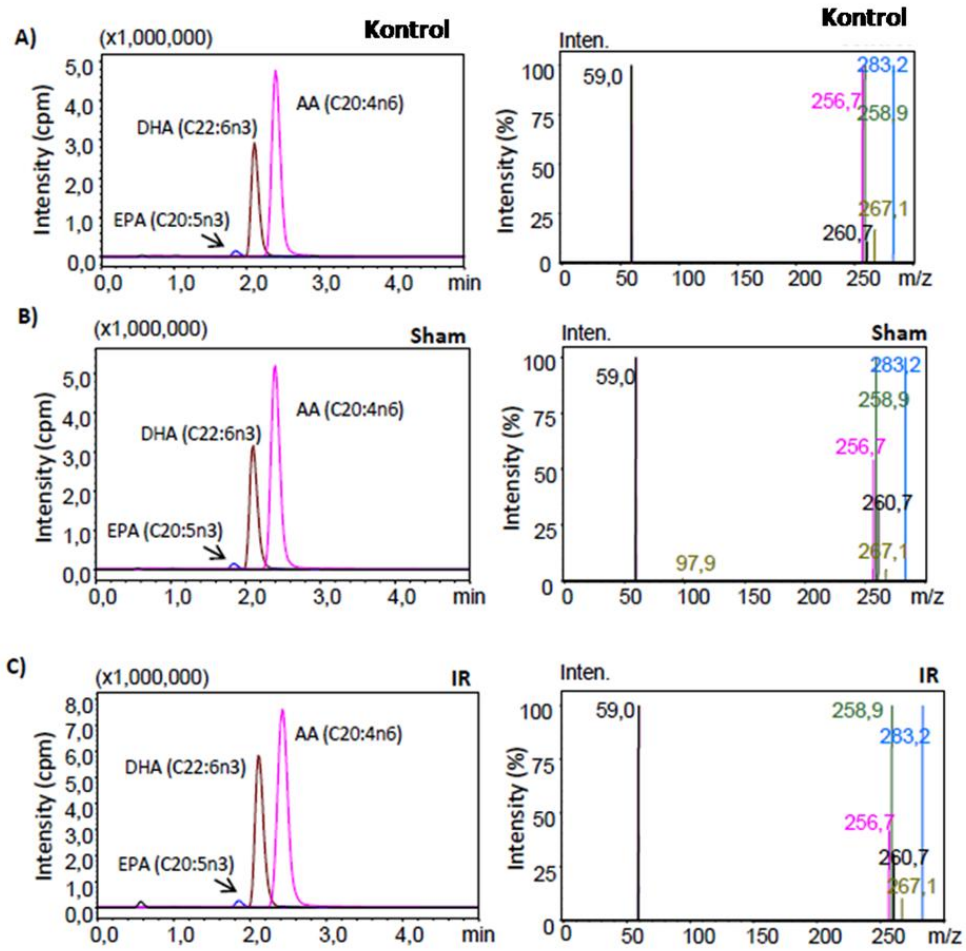
*: p<0.05, IR grubu ile kontrol ve sham grubunun karşılaştırılması

Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz Kruskal-Wallis tek yönlü ANOVA analizi ile yapılmış ve gruplar arası farklılıklar Dunn's metod ile değerlendirilmiştir.

4.2. ESI-MS Spektra

Analiz edilen yağ asitlerinin öncül ve ürün m/z değerleri şu şekildedir: DGLA (C20:3n6), öncül m/z: 304.80, ürün m/z: 59.00, 260.70; AA (C20:4n6), öncül m/z:

303.10, ürün m/z: 59.00, 258.90; EPA (C20:5n3), öncül m/z: 301.10, ürün m/z: 59.10, 256.70; DHA (C22:6n3): öncül m/z: 327.10, ürün m/z: 59.10, 283.20; AA-d8, öncül m/z: 311.10, ürün m/z: 59.10, 97.90, 267.10. Şekil 2A, 2B ve 2C’de kontrol, sham ve I/R gruplarından sırasıyla alınmış negatif iyon modunda temsili iyon spektralleri gösterilmiştir. Şekilde gösterildiği gibi EPA (C20:5n-3), DHA (C22:6n-3) ve AA (C20:4n-6)’nın retansiyon zamanları sırasıyla 1.869, 2.131 ve 2.391 dakikadır. Şekil 2’de ayrıca öncül iyonların çarpışmasıyla elde edilen tandem kütle spektralleri gösterilmiştir. Ürün iyonların m/z değerleri endojen C20:5n3, C20:4n6, C20:3n6 ve C22:6n3 ile uyumlu bulunmuştur. Döteryum etiketli internal standart için alınan piklerin m/z değerleri 97.9 ve 267.1 ‘dir.



Şekil 4.2 Negatif İyon Modunda Çalışılmış ESI-MS Ve Tandem Kütle Spektra Örnek Görüntüsü A) Kontrol B) Sham C) IR. IR, iskemi-reperfüzyon; AA, Araşidonik asit; EPA, Eikosapentaenoik asit;DHA, Dokozaheksaenoik asit

Poliansatüre Yağ Asidi Düzeyleri: Gruplara göre karaciğer dokusu PUFA düzeyleri ve istatistiksel değerlendirme tablo 4.3’de verilmiştir. Veriler ortalama \pm SD olarak rapor edilmiştir. DGLA, AA, EPA ve DHA düzeyleri I/R hasarında kontrol ve sham grubu ile

karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Deneysel gruplar arasında AA/DHA ve AA/EPA oranlarında ise istatistiksel fark saptanmamıştır ($p > 0.05$). Değerler mg yağ asit/g doku protein olarak ifade edilmiştir.

Tablo 4.3 Karaciğer Dokusunda Ölçülen PUFA Düzeyleri (mg yağ asit/g doku protein). n : Denek sayısı IR, iskemi–reperfüzyon; DGLA, Dihomo-gamma-linolenik asit; AA, Araşidonik asit; EPA, Eikosapentaenoik asit; DHA, Dokosaheksaenoik asit

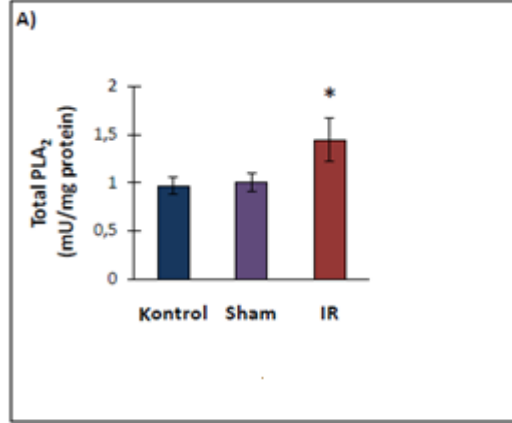
Parametre	Kontrol (n=10)	Sham (n=5)	IR (n=10)
DGLA (C20:3n6)	2.95 ± 1.56	4.98 ± 1.94	7.86 ± 2.41*
AA (C20:4n6)	29.36 ± 12.73	38.26 ± 17.72	62.16 ± 17.68*
EPA (C20:5n3)	0.86 ± 0.53	0.80 ± 0.13	2.27 ± 0.87*
DHA (C22:6n3)	10.02 ± 4.82	10.67 ± 2.39	20.43 ± 7.63*
AA/DHA	3.01 ± 0.76	3.53 ± 1.14	3.26 ± 1.06
AA/EPA	39.07 ± 12.83	29.36 ± 7.86	26.32 ± 2.57

* $p < 0.05$ IR grubu ile kontrol ve sham gruplarının karşılaştırılması.

İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA analizi ile yapılmış ve gruplar arası farklılıklar Tukey testi ile değerlendirilmiştir.

4.3. Karaciğer Total Fosfolipaz A2 aktivitesi

Çalışmamıza alınan tüm deney gruplarının karaciğer total fosfolipaz A2 aktivitesi düzeyleri ve gruplar arasındaki istatistiksel ilişki şekil 4.3’de gösterilmiştir. Tüm değerler ortalama ± SD olarak rapor edilmiştir. Elde edilen verilere göre total fosfolipaz A2 enzim aktivitesi I/R grubunda $1.44 ± 0.22$ mU/mg protein, kontrol grubunda $0.97 ± 0.09$ mU/ mg protein ve sham grubunda $1.00 ± 0.10$ mU/ mg protein olarak ölçülmüştür. Karaciğer total PLA2 aktivitesi (Ort ± SD), IR (n=10) grubu doku homojenatlarında, kontrol (n=10) ve sham (n=5) grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). Kontrol ve sham grubu arasında ise istatistiksel bir fark saptanmamıştır.

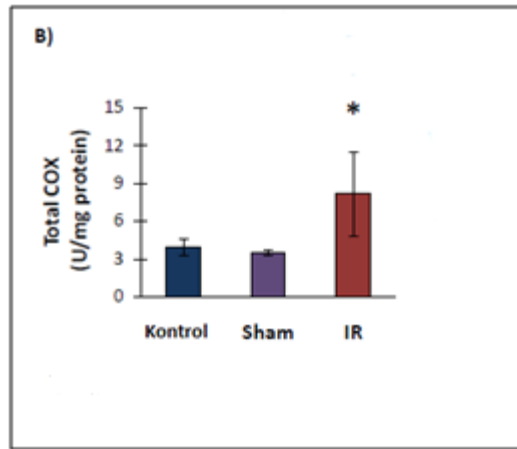


Şekil 4. 3.Karaciğer Total Fosfolipaz A2 Aktivitesi

İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA analizi ile yapılmış ve gruplar arası farklılıklar Tukey testi ile değerlendirilmiştir.

4.4. Karaciğer Siklooksijenaz Aktivitesi

Çalışmamıza alınan tüm deney gruplarının karaciğer total COX enzim aktivitesi düzeyleri ve gruplar arasındaki istatistiksel ilişki şekil 4.4’de gösterilmiştir. Tüm değerler ortalama \pm SD olarak rapor edilmiştir. Total COX enzim aktivitesi düzeyleri I/R grubunda 8.16 ± 3.36 U/mg protein, kontrol grubunda 3.90 ± 0.63 U/mg protein ve sham grubunda 3.49 ± 0.23 U/mg protein olarak ölçülmüştür. Total COX aktivitesi (Ort \pm Std.) IR (n=10) grubu doku homojenatlarında, kontrol (n=10) ve sham (n=5) grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Kontrol ve sham grubu arasında ise istatistiksel bir fark saptanmamıştır.

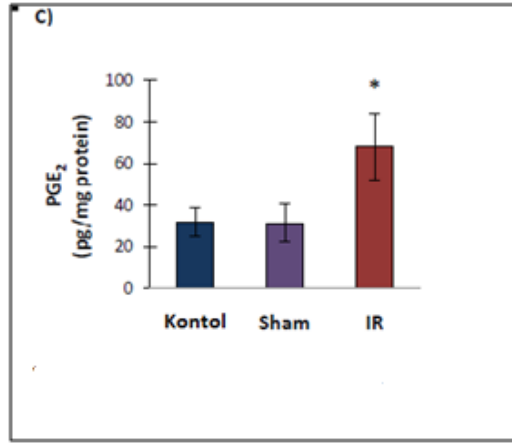


Şekil 4.4 Karaciğer Total COX Aktivitesi

İstastitksel analiz Kruskal-Wallis tek yönlü ANOVA analizi ile yapılmış ve gruplar arası farklılıklar Dunn's metod ile değerlendirilmiştir.

4.5. Karaciğer Prostaglandin E2 Düzeyleri

Çalışmamıza alınan tüm deney gruplarının karaciğer PGE2 düzeyleri ve gruplar arasındaki istatistiksel ilişki şekil 4.5'de gösterilmiştir. Tüm değerler ortalama \pm SD olarak rapor edilmiştir. Karaciğer doku homejenatlarında PGE2 düzeyleri I/R grubunda 67.91 ± 15.81 pg/mg, kontrol grubunda 32.12 ± 6.96 pg/mg ve sham grubunda 31.47 ± 9.28 pg/mg olarak ölçülmüştür. Karaciğer PGE2 düzeyi (Ort \pm Std.) IR (n=10) grubu doku homejenatlarında, kontrol (n=10) ve sham (n=5) grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). Kontrol ve sham grubu arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır.



Şekil 4. 5 Karaciğer PGE2 Düzeyleri

İstastitksel analiz tek yönlü ANOVA analizi ile yapılmış ve gruplar arası farklılıklar Tukey testi ile değerlendirilmiştir.

TARTIŞMA

İskemi reperfüzyon hasarı hücrel ve dokusal hasar ile sonuçlanan karmaşık bir olaylar dizisidir. Kan akımının ve oksijenin geçici olarak azalması ile oluşan iskemi dönemi ve kan akımının tekrar sağlanması ile beraber serbest oksijen radikallerinin, sitokinlerin salınması, adhezyon moleküllerinin up-regülasyonu ve organ disfonksiyonu ile sonuçlanan reperfüzyon dönemini içerir. Bir dokuda iskemi ve reperfüzyon sonucu oluşan hasar, dokunun sadece iskemiye maruz kalması sonucu oluşan hasardan çok daha fazladır. Karaciğerde bu şekilde meydana gelen bir hasarlanma Toledo-Pereyra ve arkadaşları tarafından 1975 yılında deneysel KC transplantasyonu çalışması sırasında klinik olarak önemli bir bozukluk olarak tanımlanmıştır (89). İskemi reperfüzyon hasarı, travma, organ transplantasyonu, miyokard infarktüsü, inme, şok, yanık, sepsis ve daha bir çok klinik durumda görülmesine rağmen gelişim mekanizması hala tartışmalıdır. İskemi reperfüzyon hasarı karaciğer cerrahisinin muhtemelen morbiditesini etkileyen en önemli faktördür. I/R'nun sebep olduğu doku hasarını engellemek için çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen bu problem güncelliğini korumaktadır (3).

Hepatik I/R hasarını önlemek amacıyla n-3 PUFA besin takviyesinin yapıldığı çalışmalarda, n-3 PUFA-zengin diyetin etkili bir şekilde hepatik steatozu ve dolayısıyla sıçanlarda hepatik IR hasarını azalttığı gösterilmiştir (18; 19). İnsan vücudu n-3 ve n-6 seri PUFA'ları sentezlemek için gerekli olan n-6 seri yağ asitlerinin öncülü linoleik asit (LA, C18:2n-6) ve n-3 seri yağ asitlerinin öncülü α -linolenik asit (ALA, C18:3n-3)'i sentezleyemez. Bu yüzden bu yağ asitleri insan diyetinde gereklidir. Bu yağ asitlerinin tavsiye edilen ve fizyolojik olarak optimal oranı (n-6):(n-3) 4:1'dir. Fakat, batı ülkelerinde LA-zengin bitkisel yağların tüketiminin artmasından dolayı bu yağ asitlerinin diyetle alınımı 15-16:1 oranından fazladır. Örneğin, Avrupa'da LA tüketimi son iki yüzyılda % 50 civarında artmıştır. LA alınımının artmasıyla paralel olarak, özellikle kardiyovasküler hastalıklar, inflamatuvar hastalıklar, obezite, kanser ve inflamatuvar süreçler içeren bir çok hastalığın ortaya çıkma oranı da artmıştır. İnflamatuvar hastalıkların oranının bu artışı n-6 yağ asidi araşidonik asit (C20:4n-6) 'den üretilen pro-inflamatuvar eikozoidlerin aşırı üretilmesi ile ilişkilidir. Modern Western diyetin düşük n-3 ve yüksek n-6 PUFA içeriği araşidonik asitin hücre membranında yüksek konsantrasyonda bulunmasına sebep olur. Fakat, bu dengesizlik EPA (C20:5n-3) ve DHA (C22:6n-3) gibi n-3 yağ asitlerinin diyetle eklenmesi ile düzeltilebilir. Diyetteki EPA ve DHA kısmen eikozanoid substratı olarak hücre membranındaki araşidonik asitin yerini alır. Böylece pro-inflamatuvar eikozanoidlerin üretimi baskılanır. EPA ve DHA'nın immun cevabın farklı basamaklarında direk ya da indirek yolla inflamatuvar hastalıkların gelişmesini önlediği kabul edilir. Ek olarak, EPA ve DHA oluşmuş olan inflamatuvar süreci

hafifleterek bu yağ asitlerinin terapötik önemini vurgular (11). Zhu X.H et al. karaciğer transplantasyon hastaları üzerinde yaptıkları bir çalışmada, transplantasyon sonrası n-3 yağ asidi ile kombine parenteral besin desteğinin karaciğer hasarını önemli derecede iyileştirdiğini ve transplantasyondan sonra hastanede kalma süresini azalttığını rapor etmişlerdir (90). Benzer bir çalışmada Zuniga J. et al, karaciğer I/R hasarına karşı n-3 PUFA besin takviyesinin koruyucu etkisinin, peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör alfa (PPAR-alfa) ile proinflamatuvar mediyatörlerin ekspresyonunu kontrol eden NF-kB arasındaki antagonist etkiye bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir (91).

Bu şekilde n-3 PUFA besinsel desteğinin karaciğer I/R hasarı üzerine etkisi çok fazla çalışılmış olmasına rağmen, n-3 ya da n-6 besin takviyesi olmaksızın karaciğer I/R hasarını takiben endojen PUFA düzeyleri ve değişimi araştırılmamıştır. Bu doğrultuda bu çalışmada, karaciğer I/R hasarını takiben karaciğer PUFA düzeylerinin değişimi araştırılmıştır. Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, yüksek performanslı sıvı kromatografi kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) ile karaciğer I/R hasarını takiben endojen DGLA (C20:3n-6), AA (C20:4n-6), DHA (C22:6n-3) ve EPA (C20:5n-3) düzeylerini ölçen ilk çalışmadır.

Karaciğer transplantasyonunda, rezeksiyonunda veya travmada kanamanın engellenmesi için hepatik pedikül klempleme (Pringle manevrası) yöntemi sıkça kullanılmaktadır (3). Çalışmamızda orta ve sol lateral hepatik lobları besleyen damarlar 60 dakika süreyle klempe edildikten sonra mikrovasküler klemp uzaklaştırılarak 60 dakika reperfüzyon sağlanmıştır. Oluşturulan karaciğer I/R sonucu karaciğer dokusunda meydana gelen patolojik değişiklikler histopatolojik ve biokimyasal olarak değerlendirilmiştir. I/R hasarı sonrasında karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmek için değişik yöntemler kullanılabilirse de en çok kabul gören ve en çok kullanılan ALT enzim aktivitesi tayinidir. Karaciğer hasarında bu enzim aktivitesinin arttığı bilinmektedir. Karaciğerdeki ALT aktivitesi dikkate alınırsa serum aktivitesinden çok daha büyüktür ve bu sebeple dokudan salınan az bir miktarı enzimin dolaşımdaki plazma seviyelerini önemli derecede artırır. Karaciğer hasarında ALT düzeyinin arttığını gösteren çalışmalardan birinde Yabe Y et. al., karaciğerde I/R sonucunda ALT ve AST düzeylerinin arttığını ve bu artışın iskemi reperfüzyon sonucu oluşan serbest radikallerin dokuda meydana getirdiği hasara bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (92). Karaciğer I/R modeli oluşturulan bir başka çalışmada ise Crockett ET et. al. KC I/R uyguladıkları deney grubunda ALT düzeylerinin arttığını buna ilaveten histopatolojik değerlendirmede sinuzoidal konjesyon, sitoplazmik vakuolizasyon, hepatosellüler nekroz ve nötrofil infiltrasyonu gözlediklerini rapor etmişlerdir (93). Yine benzer şekilde Serracino-Inglott F. et al. I/R uygulanan KC dokusunda polimorfonükleer hücre infiltrasyonu, hepatosit nekrozu, sinuzoidal genişleme, ALT ve AST düzeylerinde artış saptamışlardır (94).

Çalışmamızda oluşturulan sıcak karaciğer I/R modelinde de önceki çalışmalarla uyumlu olarak serum ALT aktivitesinin önemli derecede artırıldığı gözlenmiştir. Karaciğer hasarının spesifik belirteci olan serum ALT aktivitesinin

artması kullanılan hayvan modelinde hepatik hasarın varlığını doğrulamıştır. Benzer şekilde karaciğer kesitlerinin histopatolojik değerlendirilmesi karaciğer I/R hasarının varlığını doğrulamıştır ve artan serum ALT aktivitesinin biyokimyasal bulguları ile uyumlu bulunmuştur. Daha önce belirtildiği gibi, karaciğer I/R hasarının total histopatolojik skorları intraselüler ödem, konjesyon ve nekroz için verilen bütün skorların toplanmasıyla elde edilmiştir. Histopatolojik değerlendirmeye göre intraselüler ödem, konjesyon ve nekroz, I/R grubunda kontrol ve sham grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç total skora yansımıştır ve I/R altındaki karaciğerde total skor daha yüksek bulunmuştur.

Ayrıca çalışmamızda tüm deney gruplarında karaciğer endojen PUFA düzeyleri ölçülmüştür. PUFA, tüm hücre membranlarının önemli komponentini oluşturur ve eikozanoid olarak adlandırılan inflamatuvar mediyatörlerin üretimi yoluyla inflamatuvar cevap regülasyonunda önemli rol oynar (11). Stereospesifik lipid okside eden COX ve LOX enzimleri tarafından eikozanoid üretimi sırasında n-6 ve n-3 yağ asitleri arasında bir yarış meydana gelir (95). Ağırlıklı olarak araşidonik asitten köken alan eikozanoidler (PG, Tx, LT) inflamasyonun ana mediyatör ve düzenleyicisidirler (68). Yapılan çalışmalar doğrultusunda artan karaciğer AA (C20:4n-6) seviyelerinin karaciğer I/R hasarında pro-agregatör maddelerin kaynağı olabileceği düşünülmektedir (96). Bununla ilişkili olarak, karaciğer I/R hasarında azalan prostasiklin (PGI₂), artan Tx ve LT düzeylerinin anormal vazodilatör-vazokonstrüktif mediyatör oranları ile ilişkili olduğuna dikkat etmek önemlidir (97). Eikosapentaenoik asit (EPA, C20:5n3) inflamatuvar etkisi daha az belirgin olan eikozanoidlerin öncülüdür. EPA (C20:5n3) ve DHA (C22:6n3) üzerinden oluşturulan lipoksinler, resolvinler ve protektinler kuvvetli anti-inflamatuvar etki gösterirler ve inflamasyonun ayrışmasında tanımlanırlar (12). Dolayısıyla, EPA ve DHA düzeylerinin artması anti-inflamatuvar eikozanoidlerin sentezi için daha fazla öncül olduğunu gösterir.

Yapılan deneysel analizler sonucu I/R hasarını takiben karaciğer AA (C20:4n-6), DGLA (C20:3n-6), EPA (C20:5n-3) ve DHA (C22:6n-3) düzeylerinin kontrol ve sham gruplarına göre önemli derecede arttığı gösterilmiştir. Gruplar arasında AA/DHA ve AA/EPA oranlarında ise önemli bir fark gözlenmemiştir. I/R hasarını takiben ölçülen artmış PUFA düzeyleri iskemi sonrası sentezlenecek olan prostanoidler için substrat artışını düşündürmüştür.

Daha önce yapılan çalışmalarda karaciğer transplantasyonu sonrası hepatik dokudan belirgin bir prostanoid salınımı olduğuna dikkat çekilmiş ve artan eikozanoid sentezinin anahtar enzimler düzeyinde regüle edildiği gösterilmiştir. (13). Bizim çalışmamızda da ılık karaciğer I/R sonrası bu enzimlerin lokal değişimi ele alınmıştır.

Biriken deliller doğrultusunda fosfolipaz A2 (PLA₂) enzim aktivitesinin I/R hasarında önemli rol oynadığı gösterilmektedir. PLA₂ enzimleri I/R hasarı boyunca membran fosfolipitlerini sn-2 pozisyonundan hidroliz ederek serbest yağ asidi,

lizofosfolipit ve sitokinler gibi pro-inflamatuar lipid mediyatörlerin sentezinde önemli rol oynar. Fosfolipaz A2 enzim ailesi, serketuvar PLA2 (sPLA2), sitozolik PLA2 (cPLA2) ve kalsiyum bağımsız PLA2 (iPLA2)'nin dahil olduğu büyük bir enzim ailesidir (98). cPLA2 ve iPLA2 hücre içinde lokalize olmuştur. Bu enzimler, intraselüler membran yıkımından sorumludur (99). Genel olarak iPLA2 enzimin ana fonksiyonunun membran fosfolipidlerinin yeniden yapılandırılması yoluyla homeostazisi sağlamak olduğu kabul edilir (73). Ancak, Williams S.D. et. al. miyokardial iskemi boyunca iPLA2'nin aktive olduğunu ve iPLA2 inhibisyonunun nükleer fosfolipid hidrolizini azalttığını göstermişlerdir (100). cPLA2 ve iPLA2 hücre içinde lokalize olmuştur. Bu enzimler, intraselüler membran yıkımından sorumludur (99). cPLA2 aktivasyon için kalsiyuma ihtiyaç duyar. İskemi ve belirli toksinler erken dönemde sitozolik kalsiyum konsantrasyonunda artmaya neden olur. Hücrede Ca^{2+} yükselişi daha sonra membran permeabilitesinde nonspesifik artışla desteklenir. Artan Ca^{2+} konsantrasyonu sitozolik PLA2'yi aktive eder (76; 77). cPLA2, arasonik asit içeren fosfolipit substratlarına yüksek seçiciliği olan tek fosfolipaz olarak tanımlanmıştır (74). Hücre içi kalsiyum seviyesinin artmasıyla kalsiyum cPLA2'nin N-terminal Ca^{++} bağımlı lipid bağlayan (CaLB) domainine bağlanarak fosfolipid salınımını gerçekleştirmek üzere enzimin nükleus, ER ya da golgi gibi intraselüler membranlara translokasyonunu uyarır (75). sPLA2 enzim ailesinin üyeleri ekstraselüler sıvıda bulunur ve hasarlı doku ya da aktive edilen inflammatuar hücrelerden salınırlar. (72). Bu bağlamda, Ogata K. et. al. yaptıkları çalışmada, köpekler üzerinde 2 saat hepatik vasküler klempleme uygulamış ve uygulamanın sebep olduğu hepatik I/R hasarının tip II PLA2 inhibitörü LY329722 ile azaltıldığını göstermişlerdir. Bu çalışma sonunda PLA2 inhibitörü kullanılan gruptaki hayvanların yaşama oranının inhibitör uygulanmayanlardan fazla olduğu ve TNF- α mRNA ekspresyonunun, histopatolojik hasarın, hepatik fosfolipid degradasyonunun ise azaldığı bildirilmiştir (101). Son zamanlarda yapılan çalışmalar sPLA2'nin yağ asidi spesifitesi göstermemesine rağmen AA salınımını diğer yağ asitlerine tercih ettiği gösterilmiştir. Ayrıca bazı sPLA2 enzimleri lipolitik aktivitesinin yanı sıra reseptör ligandı olarak hareket eder ve hücre sinyalizasyonunu ve ardından cPLA2 aktivasyonunu uyarır. Böylece sPLA2 enzimleri lipolitik enzim olarak direkt ve intraselüler PLA2 aktivatörü olarak indirekt şekilde inflammatuar lipid mediyatörlerinin üretilmesine katkı sağlar. cPLA'nin AA taşıyan fosfolipidlere spesifite göstermesine rağmen sPLA'nin inflammatuar rolüne dikkat etmek gerekir. sPLA2 aktive edildiği durumlarda yağ asidi spesifitesi göstermediği için fosfolipitleri geniş çapta hidroliz etme kapasitesine sahiptir ve cPLA2'den daha fazla proinflammatuar lizofosfolipid üretimine katkıda bulunur (73).

Çalışmamızda ölçülen total PLA2 aktivitesinin kontrol ve sham gruplarına göre I/R doku homejenatlarında daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Böylece, çalışmamızda gözlenen artmış total PLA2 aktivitesi, karaciğer dokularında ölçülen artmış PUFA düzeylerini açıklamaktadır. PLA2 aktivitesi ile salınan serbest yağ asitleri daha sonra PG, TX, LT ve platelet aktive edici faktöre metabolize edilir. Bu lipid deriveleri pro-inflamatuar ve vazokonstriktif fonksiyona sahiptir ve iskemi sonrası organ disfonksiyonuna katkı sağlar (77).

Bizim çalışmamızda da aktivitesi ölçülen siklooksijenaz enzimi, I/R hasarını takiben karaciğer dokusunda belirlenen başlıca enzim olmakla birlikte, araziidonik asitten prostanoid üretiminde hız kısıtlayıcı enzimdir. Yapılan araştırmalar sonucu COX/prostanoid yolağının, alkolik karaciğer hastalıkları, karaciğer fibrogenezisi (102), viral hepatit C gibi hepatik hastalıklarda ve karaciğer stres reaksiyonlarında ayrıca inflamasyon, nekroz, karaciğer yağlanması olarak ortaya çıkan ve karaciğer hasarlarına yol açan karaciğer iskemii/reperfüzyon hasarında (103) aktive edildiği gösterilmiştir. Iwasaki W. et al. bu doğrultuda yaptıkları çalışmalarında erkek Wistar sıçanlardan oluşan deney grubuna I/R oluşturmadan önce 7 gün boyunca n-3 ve n-6 yağ asiti yönünden zengin diyet uygulamıştır. Çalışmalarında n-3 yağ asiti zengin diyet uygulanan deney grubunda serum DHA ve ALA düzeyi n-6 yağ asitince zengin diyet uygulanan gruptan yüksek aksine, AA ve LA düzeyleri ise daha düşük bulunmuştur. Bu sonuç karaciğer dokusunda ölçülen n-3 yağ asidi düzeyleriyle uyumlu bulunmuştur. Ayrıca I/R sonrası n-3 deney grubunda serum ALT, TNF- α , IL-6 düzeyleri n-6 deney grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Plazma PGE2 düzeyleri I/R boyunca n-3 grubunda düşük tutulmuş, n-6 grubunda ise iskemii ilk saati artış göstermiştir. KC doku PGE2 düzeyleride, n-6 grubunda iskemii ilk saati artmıştır. Ayrıca çalışmada iskemii öncesi ve sonrası COX-1 ve COX-2 enzim düzeyleri ölçülmüştür. Bunun neticesinde COX-1 ekspresyonunun iskemii öncesi ve sonrasında değişmemesine rağmen COX-2 enziminin iskemiden önce ekspresse edilmediği, iskemiden 2 saat sonra ise ekspresyonunun hızla arttığı ancak gruplar arasında fark olmadığı rapor edilmiştir (10). Tolba RH. et.al KC I/R hasarında COX-2 inhibisyonunun etkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada, erkek Wistar sıçanlara 30 dakika iskemii ve 60 dakika reperfüzyon uygulamışlar ve oluşturulan deney gruplarından bir tanesine operasyondan önce COX-2 inhibitörü vermişlerdir. Bu çalışmanın sonunda çalışma grubu, COX-2 inhibitörü uygulanan deney grubunun ALT ve plazma TNF- α düzeylerinin I/R grubuna göre oldukça düşük olduğu rapor edilmiş ve buradan yola çıkarak COX-2 inhibisyonunun, inflamatuvar yolağı başlatan TNF- α salınımını azaltacağından KC I/R hasarında bir tedavi yaklaşımı olabileceğini belirtmişlerdir (104). Son zamanlarda yapılan bir başka çalışmada ise serebral iskemide COX-2 enzimatik yolağının, majör ürünü PGE2 yoluyla hem toksik hem protektif etkisinin aktive olabileceği ve PGE2'nin EP-4 reseptörü aracılığıyla protektif etki sağladığı bu sebeple kronik nörolojik rahatsızlıklarda COX-2 inhibitörü alan hastalarda kronik siklooksijenaz blokajından kaynaklı kardiyovasküler komplikasyonlar görüldüğü belirtilmiştir (105). Edinilen bu bilgiler COX enzimatik yolağının I/R sonrası, hem toksik hem protektif etkiler yönünden önemini açıkça ortaya koymaktadır.

Bu doğrultuda bizim çalışmamızda da, karaciğer IR hasarı sonrası COX aktivitesi ölçülmüştür. Yapılan analizler sonucu, daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak COX enzim aktivitesinin I/R grubunda kontrol ve sham gruplarına göre önemli derecede arttığı gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda I/R hasarında gözlenen artmış COX aktivitesi COX/prostanoid yolağı ile prostanoid oluşumunu düşürmüştür. PGE2 düzeylerinin COX düzeyleriyle paralel olarak I/R grubunda artmış olması I/R modelimizde aktive edilen COX/PGE2 yolağını göstermiştir.

Prostaglandinler ilk olarak 1970 yılında karaciğerden izole edilmiştir (17). Karaciğerde hepatik hasar sırasında endojen PGE2 sentezleme yeteneğindeki hücrelerin en önemlileri Kupffer hücreleri ve endotel hücreleridir. Kupffer hücrelerinin aktivasyonu hem fagositoz hem de inflamatuvar cevabın başlamasına neden olur. Beraberinde oksijen radikallerinin ve TNF- α , interferon- γ gibi çeşitli hücre hasar mediyatörlerinin salınımını gerçekleştirerek endotel hücrelerinde ve hepatositlerde hasara yol açar. Bununla birlikte, Kupffer hücreleri PGE2 salınımı eşliğinde komşu hepatositler üzerinde sitoprotektif koruma sağlar. Kupffer hücreleri inflamatuvar cevabı başlatma ve sitoprotektif koruma sağlama yeteneğindedir. Kupffer hücrelerinden devamlı salınan PGE2, sitokinler üzerinde negatiffeedback sağlar. Böylece organizma kendini korur hale gelmiş olur (17). Bu bağlamda TNF- α 'nın makrofajlardan PGE2 üretimini artırdığı ve PGE2'nin ise TNF- α sentezini inhibe ettiği ve bu yolla Kupffer hücrelerinden salınan PGE2'nin protektif etki sağladığı gösterilmiştir (82). Son zamanlarda karaciğer transplantasyonu sonrasında reperfüzyonun takip ettiği iskemi durumunda PGE2 aktivasyonunun iskemi reperfüzyon hasarına karşı direnç sağladığı (20) ayrıca sitokin kaskadının regülasyonu yoluyla karaciğer hasarını restore ettiği düşünülmektedir (21). Daha önceki çalışmalarda gösterildiği gibi hem endojen hem de ekzojen PGE2, I/R ile oluşan karaciğer hasarına karşı koruyucu etki gösterir (106). Bu bağlamda Masaki N. et. al. çalışmalarında, sıçan hepatosit hücre kültür mediyumuna PGE2 eklediğinde, lipid peroksidasyonuna bağlı hücre ölümünün azaldığını göstermiş ve PGE2'nin karaciğer hasarını önlemeye yönelik bir sürece katkı sağlayabileceğini ileri sürmüşlerdir (107). Araşidonik asit üzerinden üretilen PGE2, inflamatuvar cevap boyunca üretilir ve dört reseptör alt tipi aracılığıyla hem doğal hem de adaptif immun cevaba aracılık eder. Her bir reseptör fonksiyonu farklı bir sinyal kaskadı ile fonksiyon gösterir ve çeşitli hastalık koşullarında farklı bir rol oynar (108). Bu bağlamda Kuzumoto Y. et. al., hepatik I/R hasarında EP reseptörlerinin patofizyolojik rollerini araştırdığı çalışmalarında, hepatik I/R hasarından sonra en fazla EP-4 reseptörünün ekspresse edildiğini, serolojik ve histolojik analizler sonucu EP-4 agonistlerinin I/R hasarını inhibe ettiğini göstermişlerdir. İlaveten bazı EP-4 agonistlerinin reperfüzyonun erken fazında proinflamatuvar sitokinleri, kemokinleri ve adezyon moleküllerini lokal olarak azalttığını aksine anti-inflamatuvar sitokinleri ise artırarak KC hasarını önleyebildiğini ileri sürmüşlerdir (11; 109).

Sonuç olarak, çalışmamızda karaciğer IR hasarının, karaciğer doku numunelerinde AA (C20:4n-6), DGLA (C20:3n-6), EPA (C20:5n-3) ve DHA (C22:6n-3) konsantrasyonlarını önemli derecede arttığı ve hepatik AA/DHA ve AA/EPA oranları üzerine etkisi olmadığı gösterilmiştir. IR hasarını takiben artan endojen PUFA seviyelerine prostanooid üretiminde anahtar enzim olan PLA2 ve COX enzimlerinin yanısıra karaciğer PGE2 düzeylerinin artışının eşlik ettiği gözlenmiştir.

SONUÇLAR

Bulduğumuz deneysel verilere göre sonuçlarımızı şu şekilde özetleyebiliriz:

1. Karaciğer hemotoksilen eozin boyaması sonucu, kontrol ve sham grubunda hepatositler ve portal alanların yapıları normal görünümde idi. I/R grubunda, hepatosit hücre kordonlarının bütünlüğü bozulmuş, KC parankimi içinde rastgele dağılmış, multipl ve yaygın hepatosit nekroz alanları vardı. Parankimal alanlarda nötrofil infiltrasyonu, sinuzoidlerde genişleme ve konjesyon izlendi.
2. Karaciğer I/R yapılan grubun ALT aktivite değerleri kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik görüldü.
3. DGLA, AA, EPA ve DHA düzeyleri I/R hasarında kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Deneysel gruplar arasında AA/DHA ve AA/EPA oranlarında ise istatistiksel fark saptanmadı.
4. Karaciğer total PLA2 aktivitesi I/R grubu doku homojenatlarında, kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Kontrol ve sham grubu arasında ise istatistiksel bir fark saptanmadı.
5. Total COX aktivitesi I/R grubu doku homojenatlarında, kontrol ve grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Kontrol ve sham grubu arasında ise istatistiksel bir fark saptanmadı.
6. Karaciğer PGE2 düzeyi I/R grubu doku homojenatlarında, kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu.

Sonuç olarak, çalışmamızda karaciğer I/R hasarının, karaciğer doku numunelerinde AA (C20:4n-6), DGLA (C20:3n-6), EPA (C20:5n-3) ve DHA (C22:6n-3) konsantrasyonlarını önemli derecede arttırdığını ve hepatik AA/DHA ve AA/EPA oranları üzerine etkisi olmadığı gösterilmiştir. I/R hasarını takiben artan endojen PUFA seviyelerine prostanoid üretiminde anahtar enzim olan PLA2 ve COX enzimlerinin yanısıra karaciğer PGE2 düzeylerinin artışının eşlik ettiği gözlenmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Ebru KIRAÇ, 15.06.1986'da Kayseri'de doğdu. İlkokulu 1997 yılında Antalya Sütçüler İlkokulu'nda, ortaokulu 2000 yılında Antalya Yenimahalle İlköğretim Okulu'nda, liseyi 2003 yılında Antalya Atatürk Lisesi'nde ve lisans öğrenimini de 2007 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladı. 2011 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimi bitirdi. 2013 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Yabancı dili İngilizcedir.

KAYNAKLAR

1. Dogan S, Unal M, Ozturk N, Yargicoglu P, Cort A, et al. 2011. Manganese porphyrin reduces retinal injury induced by ocular hypertension in rats. *Experimental eye research* 93:387-96
2. Zimmerman BJ, Granger DN. 1992. Reperfusion injury. *The Surgical clinics of North America* 72:65-83
3. Dogan S, Aslan M. 2011. Hepatic ischemia-reperfusion injury and therapeutic strategies to alleviate cellular damage. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 41:103-17
4. Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. 2001. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fundamental & clinical pharmacology* 15:293-306
5. Rose S, Floyd RA, Eneff K, Buhren V, Massion W. 1994. Intestinal ischemia: reperfusion-mediated increase in hydroxyl free radical formation as reported by salicylate hydroxylation. *Shock* 1:452-6
6. Carden DL GD. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. . *The Journal of pathology* 190:255-266,
7. Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, et al. 2002. Ischemia alone is sufficient to induce TNF-alpha mRNA and peptide in the myocardium. *Shock* 17:114-9
8. Riedemann NC, Ward PA. 2003. Complement in ischemia reperfusion injury. *The American journal of pathology* 162:363-7
9. Myers SI, Hernandez R, Turnage RH, Bartula L, Taylor-Kalley B. 1995. Resuscitation of ischemia/reperfusion with hyperalimentation increases intestinal PGI2 synthase (PS) content and PGI2 release. *Shock* 3:422-9
10. Iwasaki W, Kume M, Kudo K, Uchinami H, Kikuchi I, et al. 2010. Changes in the fatty acid composition of the liver with the administration of N-3 polyunsaturated fatty acids and the effects on warm ischemia/reperfusion injury in the rat liver. *Shock* 33:306-14

11. Wall R, Ross, R.P, Fitzgerald, GF., Stanton, C. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids *Nutrition Reviews* Vol.2010;68(5):280–289
12. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature reviews. Immunology* 8:349-61
13. Post S GM, Otto G, Manner M, Foltis C, Hofmann W, Herfarth C. 1991. Rapid increase in the activity of enzymes of eicosanoid synthesis in hepatic and extrahepatic tissues after experimental liver transplantation. *Transplantation* 51:1058-65
14. Dennis EA. 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *The Journal of biological chemistry* 269:13057-60
15. Hamada T, Tsuchihashi S, Avanesyan A, Duarte S, Moore C, et al. 2008. Cyclooxygenase-2 deficiency enhances Th2 immune responses and impairs neutrophil recruitment in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Journal of immunology* 180:1843-53
16. Kawahara K, Hohjoh H, Inazumi T, Tsuchiya S, Sugimoto Y. 2014. Prostaglandin E-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochimica et biophysica acta*
17. Tolman K. 2000. Eicosanoids and the liver. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* May;61(3-4):163-74
18. Marsman HA, Heger M, Kloek JJ, Nienhuis SL, ten Kate FJ, van Gulik TM. 2011. Omega-3 fatty acids reduce hepatic steatosis and consequently attenuate ischemia-reperfusion injury following partial hepatectomy in rats. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 43:984-90
19. Coelho AM, Machado MC, Takahashi HK, Sampietre SN, Stefano JT, et al. 2011. Ischemic preconditioning-like effect of polyunsaturated fatty acid-rich diet on hepatic ischemia/reperfusion injury. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 15:1679-88
20. Saleem S, Kim YT, Maruyama T, Narumiya S, Dore S. 2009. Reduced acute brain injury in PGE2 EP3 receptor-deficient mice after cerebral ischemia. *Journal of neuroimmunology* 208:87-93

21. Wanner GA, Muller P, Ertel W, Busch CJ, Menger MD, Messmer K. 1998. Differential effect of cyclooxygenase metabolites on proinflammatory cytokine release by Kupffer cells after liver ischemia and reperfusion. *American journal of surgery* 175:146-51
22. Yamaoka Y, Ozawa K, Kumada K, Shimahara Y, Tanaka K, et al. 1992. Total vascular exclusion for hepatic resection in cirrhotic patients. Application of venovenous bypass. *Archives of surgery* 127:276-80
23. Mortensen A, Skibsted LH, Truscott TG. 2001. The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Archives of biochemistry and biophysics* 385:13-9
24. Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, Davidson BR, Seifalian AM. 2005. The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: a review. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 11:1031-47
25. Hines IN, Harada H, Wolf R, Grisham MB. 2003. Superoxide and post-ischemic liver injury: potential therapeutic target for liver transplantation. *Current medicinal chemistry* 10:2661-7
26. Delva E, Camus Y, Nordlinger B, Hannoun L, Parc R, et al. 1989. Vascular occlusions for liver resections. Operative management and tolerance to hepatic ischemia: 142 cases. *Annals of surgery* 209:211-8
27. Uysal M. 2012. *Karbonhidrat metabolizması*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri
28. Grace PA. 1994. Ischaemia-reperfusion injury. *The British journal of surgery* 81:637-47
29. Currin RT, Gores GJ, Thurman RG, Lemasters JJ. 1991. Protection by acidotic pH against anoxic cell killing in perfused rat liver: evidence for a pH paradox. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5:207-10
30. Bond JM, Chacon E, Herman B, Lemasters JJ. 1993. Intracellular pH and Ca²⁺ homeostasis in the pH paradox of reperfusion injury to neonatal rat cardiac myocytes. *The American journal of physiology* 265:C129-37
31. Berry CE, Hare JM. 2004. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *The Journal of physiology* 555:589-606

32. Harrison R. 2002. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free radical biology & medicine* 33:774-97
33. Parks DA, Williams TK, Beckman JS. 1988. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *The American journal of physiology* 254:G768-74
34. Reiter RJ. 1995. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9:526-33
35. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. 1991. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *American journal of surgery* 161:488-503
36. Akkuş İ. 1995. *Serbest radikaller ve Fizyopatolojik etkileri*. Mimoza yayınları
37. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39:44-84
38. Stahl W, Ale-Agha, N., Polidori, M.C. 2002. Non-antioxidant properties of carotenoids. *Biological chemistry* 383:553-8
39. Memişoğulları R. 2005. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3:33-9
40. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany* 91 Spec No:179-94
41. Schiller HJ, Andreoni KA, Bulkley GB. 1991. Free radical ablation for the prevention of post-ischemic renal failure following renal transplantation. *Klinische Wochenschrift* 69:1083-94
42. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. 2001. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological reviews* 53:135-59
43. Kanner J, German JB, Kinsella JE. 1987. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Critical reviews in food science and nutrition* 25:317-64
44. Lefer AM, Lefer DJ. 1996. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovascular research* 32:743-51

45. Guo JP, Murohara T, Buerke M, Scalia R, Lefer AM. 1996. Direct measurement of nitric oxide release from vascular endothelial cells. *Journal of applied physiology* 81:774-9
46. Garcia-Villalon AL, Amezcua YM, Monge L, Fernandez N, Salcedo A, Dieguez G. 2008. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascular pharmacology* 48:109-14
47. Senturk H. 2004. Serbest Radikal Hasarının Hepato-Biliyer Sistem Hastalıklarındaki Rolü. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5:1-8
48. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. 2001. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *American journal of surgery* 181:160-6
49. Clemens MG. 1999. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology* 30:1-5
50. Ignarro LJ. 1996. Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int Suppl* 55:2-5.
51. Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. 1994. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *The American journal of physiology* 267:G786-93
52. Chamoun F, Burne, M., O'Donnell, M., Rabb, H. 2000. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front Biosci* Nov 1;5:E103-9.
53. Richard N. Mitchell RS, Cotran. *Kumar Cotran Robbins Temel Patoloji*
54. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. 2007. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27:2514-23
55. Korthuis RJ, Granger DN. 1993. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clinical cardiology* 16:119-26
56. Chen X, Kidder LS, Schmidt AH, Lew WD. 2004. Osteogenic protein-1 induces bone formation in the presence of bacterial infection in a rat intramuscular osteoinduction model. *Journal of orthopaedic trauma* 18:436-42
57. Sehirli O, Ozel Y, Dulundu E, Topaloglu U, Ercan F, Sener G. 2008. Grape seed extract treatment reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Phytotherapy research : PTR* 22:43-8

58. Berber I, Yiğit, B., Işitmangil, G., Telliöğlu, G., Ozgezer, T., Gülle, S., Türkmen, F., Titiz, I. 2008. Evaluation of pretransplant serum cytokine levels in renal transplant recipients. *Transplantation proceedings* Jan-Feb;40(1):92-3.
59. Schifferli JA, Peters, D.K. 1986. The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *The New England journal of medicine* 315:488-95
60. Bitter-Suermann D. 1982. Contribution of complement factors and reaction pathways to inflammation. *Agents Action Suppl* 11:159-178
61. Sim RB, Tsiftoglou, SA. . 2004. Proteases of the complement system *Biochem Soc Trans* 32:21-7
62. Morgan BP. 1995. Complement regulatory molecules: application to therapy and transplantation. *Immunology today* 16:257-9
63. Serracino Inglott F, Habib, NA., Mathie, RT. 2001. Hepatic ischemia reperfusion injury. *Am J Surg*, 181:160-166
64. Tedesco F, Fischetti F, Pausa M, Dobrina A, Sim RB, Daha MR. 1999. Complement-endothelial cell interactions: pathophysiological implications. *Molecular immunology* 36:261-8
65. Kirschfink M. 2001. Targeting complement in therapy. *Immunological reviews* 180:177-89
66. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. 1990. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 4:3355-9
67. Comba A, Lin YH, Eynard AR, Valentich MA, Fernandez-Zapico ME, Pasqualini ME. 2011. Basic aspects of tumor cell fatty acid-regulated signaling and transcription factors. *Cancer metastasis reviews* 30:325-42
68. Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. 2010. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition reviews* 68:280-9
69. Aslan M, Aslan I, Ozcan F, Eryilmaz R, Ensari CO, Bilecik T. 2014. A pilot study investigating early postoperative changes of plasma polyunsaturated fatty acids after laparoscopic sleeve gastrectomy. *Lipids in health and disease* 13:62

70. Massey KA, Nicolaou, A. 2013. Lipidomicsofoxidize dpolyunsaturated fatty acids. *Methods inFreeRadicalBiologyandMedicine* 59: 45–55
71. Helliwell RJ, Adams LF, Mitchell MD. 2004. Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 70:101-13
72. Samad TA, Sapirstein A, Woolf CJ. 2002. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. *Trends in molecular medicine* 8:390-6
73. Yedgar S, Cohen, Y., Shoseyov, D. 2006. Control of phospholipase A2 activities for the treatment of inflammatory conditions. *Biochimica et Biophysica Acta 1761* 1373–1382
74. Liu L, Zou P, Xu Z, Hu Z, Chen Y, Song S. 2002. [Selected elimination of mouse alloreactive T cells by Fas-FasL passway]. *Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi* 23:187-90
75. Gijón M, Leslie, CC. . 1999. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. . *J Leukoc Biol.* Mar;65(3):330-6
76. Liu Y, Chen, LY., Sokolowska, M., Eberlein, M., Alsaaty, S., Martinez-Anton, A., Logun, C., Qi, HY.,Shelhamer, JH. 2014. The fish oil ingredient, docosahexaenoic acid, activates cytosolic phospholipase A2 via GPR120 receptor toproduce prostaglandin E2 and plays an anti inflammatory role in macrophages. . *Immunology Sep*;143(1):81-95
77. Ren G, Takano T, Papillon J, Cybulsky AV. 2010. Cytosolic phospholipase A(2)-alpha enhances induction of endoplasmic reticulum stress. *Biochimica et biophysica acta* 1803:468-81
78. Garavito RM. DD. 1999. The cyclooxygenase isoforms: structural insight into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochimica et biophysica acta* 1441: 278-287
79. Fu JY, Masferrer, J.L., Seibert, K., Raz, A., Needleman, P. 1990. The Induction and Suppression of Prostaglandin H-2 Synthase (Cyclooxygenase) in Human Monocytes, . *Journal of Biological Chemistry* 265 (28), 16737
80. Smith W, Garavito, RM., DeWitt, DL. 1996 Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem.* Dec 27;271(52):33157-60

81. Gökşen U, Kelekçi, NG 2010. Antiinflamatuvar Tedavide Yeni Bir Yaklaşım: Siklooksijenaz ve 5-Lipooksijenazın Dual İnhibitörleri *Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 30:1:81-118
82. Investigators A. 2011. Management of acute coronary syndromes in developing countries: acute coronary events-a multinational survey of current management strategies. *American heart journal* 162:852-9 e22
83. Curek GD, Cort A, Yucel G, Demir N, Ozturk S, et al. 2010. Effect of astaxanthin on hepatocellular injury following ischemia/reperfusion. *Toxicology* 267:147-53
84. Dogan S, Ozlem Elpek G, Kirimlioglu Konuk E, Demir N, Aslan M. 2012. Measurement of intracellular biomolecular oxidation in liver ischemia-reperfusion injury via immuno-spin trapping. *Free radical biology & medicine* 53:406-14
85. Martins PN, Neuhaus P. 2007. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 27:384-92
86. Yilmaz S, Ates E, Tokyol C, Pehlivan T, Erkasap S, Koken T. 2004. The protective effect of erythropoietin on ischaemia/reperfusion injury of liver. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 6:169-73
87. Aslan M, Celmeli G, Ozcan F, Kupesiz A. 2014. LC-MS/MS analysis of plasma polyunsaturated fatty acids in patients with homozygous sickle cell disease. *Clinical and experimental medicine*
88. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248-54
89. Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Najarian JS. 1975. Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation. *American journal of surgery* 129:513-7
90. Zhu XH, Wu YF, Qiu YD, Jiang CP, Ding YT. 2012. Liver-protecting effects of omega-3 fish oil lipid emulsion in liver transplantation. *World journal of gastroenterology : WJG* 18:6141-7
91. Zuniga J, Cancino M, Medina F, Varela P, Vargas R, et al. 2011. N-3 PUFA supplementation triggers PPAR-alpha activation and PPAR-alpha/NF-kappaB

interaction: anti-inflammatory implications in liver ischemia-reperfusion injury. *PLoS one* 6:e28502

92. Yabe Y. KN, Nishihashi T., Takahashi R., Nishikawa M., Takakura Y., Hashida M. 2001. Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia-reperfusion injury by Superoxide dismutase and Catalase derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 298: 894-899
93. Crockett ET, Galligan JJ, Uhal BD, Harkema J, Roth R, Pandya K. 2006. Protection of early phase hepatic ischemia-reperfusion injury by cholinergic agonists. *BMC clinical pathology* 6:3
94. Serracino-Inglott F, Virlos IT, Habib NA, Williamson RC, Mathie RT. 2002. Adenosine preconditioning attenuates hepatic reperfusion injury in the rat by preventing the down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *BMC gastroenterology* 2:22
95. Calder PC. 2001. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids* 36:1007-24.
96. Setty BN, Dampier CD, Stuart MJ. 1995. Arachidonic acid metabolites are involved in mediating red blood cell adherence to endothelium. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 125:608-17
97. Besse T, Gustin, T., Claeys, N., Schroeyers, P., Lambotte, L. 1989. Effect of PGI₂ and thromboxane antagonist on liver ischemic injury. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes* 21:213-7
98. Murakami M, Kudo, I. 2002. Phospholipase A₂. *Journal of biochemistry* 131:285-92.
99. Menschikowski M, Hagelgans, A., Siegert, G. 2006. Secretory phospholipase A₂ of group IIA: is it an offensive or a defensive player during atherosclerosis and other inflammatory diseases? *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 79:1-33
100. Williams SD, Hsu, F.F., Ford, D.A. 2000. Ford, Electrospray ionization mass spectrometry analyses of nuclear membrane phospholipid loss after reperfusion of ischemic myocardium. *J. Lipid Res* 41 1585–95
101. Ogata K, Jin M.B., Taniguchi, M., Suzuki, T., Shimamura, T., Kitagawa, N., Magata, S., Fukai, M., Ishikawa, H., Ono, T., Furukawa, H., Fujita, M., Todo, S 2001;. Attenuation of ischemia and reperfusion injury of canine livers by inhibition of type II phospholipase A₂ with LY329722. . *Transplantation* 71:1040-6

102. Planaguma A, Claria J, Miquel R, Lopez-Parra M, Titos E, et al. 2005. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 reduces liver fibrosis by mechanisms involving non-parenchymal cell apoptosis and PPARgamma activation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19:1120-2
103. Kim SH, Lee SM. 2004. Expression of hepatic vascular stress genes following ischemia/reperfusion and subsequent endotoxemia. *Archives of pharmacal research* 27:769-75
104. Tolba R, Fet, N., Yonezawa, K., Taura, K., Nakajima, A., Hata, K., Okamura, Y., Uchinami, H., Klinge, U., Minor, T., Yamaoka, Y., Yamamoto, Y. 2014. Role of preferential cyclooxygenase-2 inhibition by meloxicam in ischemia/reperfusion injury of the rat liver. *Eur Surg Res.* 53(1-4):11-24
105. Liang X, Lin, L., Woodling, NS., Wang, Q., Anacker, C., Pan, T., Merchant, M., Andreasson, K. 2011. Signaling via the prostaglandin E₂ receptor EP4 exerts neuronal and vascular protection in a mouse model of cerebral ischemia. *J Clin Invest.* 121(11):4362-71
106. Arai M, Peng, XX., Currin, RT., Thurman, RG., Lemasters, JJ. 1999;. Protection of sinusoidal endothelial cells against storage/reperfusion injury by prostaglandin E₂ derived from Kupffer cells. *Transplantation* 68:440-5
107. Masaki N OY, Shirataki H, Ogata I, Hayashi S, Yamada S, Hirata K, Nagoshi S, Mochida S, Tomiya T. . 1992;. Hepatocyte membrane stabilization by prostaglandins E₁ and E₂: favorable effects on rat liver injury. *Gastroenterology* 102:572-6
108. Breyer RM, Bagdassarian, C.K., Myers, S.A., Breyer, M.D. 2001;. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41:661-90
109. Kuzumoto Y S, M., Ikeda N, Hamada K, Mizuno T, Akashi S, Tsurui Y, Kashizuka H, Nomi T, Kubo A, Kanehiro H, Nakajima Y. 2005;. Significance and therapeutic potential of prostaglandin E₂ receptor in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Hepatology* Sep;42(3):608-17