

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**DENEYSEL KARACİĞER İSKEMİ/REPERFÜZYON MODELİNDE
TİYOREDOKSİN VE L-NAME'İN KARACİĞER HASARI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Kadir Okhan AKIN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nedret KILIÇ

ANKARA
KASIM 2008

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**DENEYSEL KARACİĞER İSKEMİ/REPERFÜZYON MODELİNDE
TİYOREDOKSİN VE L-NAME'İN KARACİĞER HASARI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Kadir Okhan AKIN

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Nedret KILIÇ

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBE-01-2005-68 proje numarasıyla desteklenmiştir.

ANKARA
KASIM 2008

İÇİNDEKİLER	
Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Tablolar, Şekiller, resimler, grafikler	IV
Kısaltmalar	VI
Önsöz	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Reaktif oksijen bileşikleri (ROS)	3
2.1.1. Moleküler oksijenin özellikleri	3
2.1.2. Başlıca ROS'lar	5
2.1.3. Hücrede reaktif oksijen bileşiklerinin (ROS) kaynağı	8
2.1.4. ROS'ların etkileri	14
2.2. Karaciğer iskemi-reperfüzyon (I/R)	
zedelenmesinin fizyopatolojisi	20
2.2.1. Karaciğer iskemi ve reperfüzyon	
zedelenmesinde ROS'ların rolü	22
2.2.2. Endotelin ve Nitrik Oksit (NO)	25
2.2.3. I/R'da nötrofiller ve adezyon molekülleri	27
2.2.4. Proinflamatuvar ve Anti-inflamatuvar mediatörler	30
2.2.5. Lipid Mediatörler	31
2.2.6. Hem Oksijenaz (HO) Sistemi	32
2.2.7. I/R'da hücre ölümü	33
2.3. Antioksidan sistemler ve Thiredoksin sistem	34
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	50
3.1. Deney hayvanları ve cerrahi yöntem	50
3.2. Deney grupları	51
3.3. Kullanılan aletler	52
3.3. Yöntemlerin uygulanması	53
3.3.1. Serum örneklerinin hazırlanması	53
3.3.2. Hepatik doku kan akımı	53
3.3.3. Biyokimyasal parametrelerin ölçülmesi	54
3.3.4. Nitrik Oksit (NO) ölçümü	54
3.3.5. P-Selektin ölçümü	55
3.3.6. Endotelin-1 ölçümü	57
3.3.7. Lowry doku protein ölçümü	58
3.3.8. Doku Süperoksid Dismutaz ölçümü	59
3.3.9. Doku Total Glutasyon ölçümü	61
3.3.10. Doku Glutasyon Peroksidaz ölçümü	63

3.3.11. Lipid Peroksidasyon ürünleri (MDA ve HAE) ölçümü	65
3.3.12. Apopitozis çalışması	67
3.3.13. İstatistiksel analiz	67
4. BULGULAR	68
4.1. Hepatik kan akımı	68
4.2. Biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi	69
4.3. Korelasyon sonuçları	77
5. TARTIŞMA	85
6. SONUÇ	97
7. ÖZET	98
8. SUMMARY	99
9. KAYNAKLAR	101
10. ÖZGEÇMİŞ	129

Tablo Dizini

Tablo1: Başlıca ROS'lar ve antioksidanları	4
Tablo 2. Lowry doku protein ölçümünün yapılışı	59
Tablo 3. SOD cihaz uygulaması	60
Tablo 4. tGSH cihaz uygulaması	62
Tablo 5. GPx cihaz uygulaması	64
Tablo 6: Deney gruplarında ölçülen parametrelere ait ortalama ve standart sapma değerleri	70
Tablo 7: Deney gruplarından çalışılan biyokimyasal parametreler ve patolojik değerlendirmelere ait korelasyon sonuçları	77
Tablo 8: Apoptoz değerlendirme sonuçları	82
Tablo 9: Seçilmiş P-selektin çalışmalarından örnekler	87

Şekil Dizini

Şekil 1: Oksijenin suya indirgenmesi sırasında ROS'ların oluşması	5
Şekil 2: Elektron transport zincirinin şematik gösterimi	9
Şekil 3: Fagositoz sonrası ROS üretimi	12
Şekil 4: ROS'ların hücrede oluşturdukları hasar	15
Şekil 5: ROS üretimi ve hücre hasarı	16
Şekil 6: Lipid peroksidasyonu	17
Şekil 7: I/R zedelenmesinin mekanizması	21
Şekil 8: Trx'in yapısı	42
Şekil 9: Trx sistemi ve görevleri	44
Şekil 10: Tioredoksin redüktazın substratları ve Tioredoksinin hücredeki fonksiyonları	46
Şekil 11: İnsan TrxR-1, TrxR-2 ve E.coli TrxR'nin yapısının karşılaştırılması.	47

Grafik Dizini

Grafik 1. tGSH standart eğrisi ve regresyon denklemi	63
Grafik 2. MDA+HAE ve MDA standart eğrileri ve regresyon denklemleri	66
Grafik 3: Ortalama arteriyel kan basıncı	68
Grafik 4. ALT ve AST değerlerine ait Box-Plot grafikleri	69
Grafik 5: GGT ve LDH değerlerine ait Box-Plot grafikleri	71
Grafik 6: Total ve direkt bilirubin değerlerine ait Box-Plot grafikleri	71
Grafik 7 : P-selektin değerlerine ait Box-Plot grafiği	72

Grafik 8 : Endotelin değerlerine ait Box-Plot grafiği	73
Grafik 9: SOD değerlerine ait Box-Plot grafiği	73
Grafik 10: GPx değerlerine ait Box-Plot grafiği	74
Grafik 11: tGSH değerlerine ait Box-Plot grafiği	74
Grafik 12: NO değerlerine ait Box-Plot grafiği	75
Grafik 13: HAE değerlerine ait Box-Plot grafiği	76
Grafik 14: MDA değerlerine ait Box-Plot grafiği	76
Grafik 15: ALT ve P-Selektin korelasyon grafiği	78
Grafik 16: ALT ve NO korelasyon grafiği	78
Grafik 17: P-Selektin ve NO korelasyon grafiği	79
Grafik 18: tGSH ve ET-1 korelasyon grafiği	79
Grafik 19: GPx ve NO korelasyon grafiği	80
Grafik 20: SOD ve NO korelasyon grafiği	80
Grafik 21: ALT ve MDA korelasyon grafiği	81
Grafik 22: ET-1 ve HAE korelasyon grafiği	81
Grafik 23. Apoptozis oranları	82

Resim Dizini

Resim 1 ve 2. Apoptotik hücre histomorfolojileri (100x HE)	83
Resim 3 ve 4. Apo-BrdU-IHC in situ DNA fragmentasyon kitle işaretlenmiş apoptotik hücreler (20x ve 100x, Apo-BrdU-IHC immünohistokimyasal boya)	84

ÖNSÖZ

Çalıştığım tez konusu, 2005 yılında Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Nedret Kılıç tarafından belirlenmiştir. Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBE-01-2005-58 nolu proje numarası ile desteklenmiştir. Çalışma için Gazi Üniversitesi Etik Kurulundan izin alınmıştır.

Doktora eğitimim süresince, bilgi, deneyim ve özellikle hoşgörüsüyle beni sürekli destekleyen, her yaptığım çalışmada yanımda olan, tez çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen sevgili hocam Prof. Dr. Nedret Kılıç'a sevgi ve saygılarımı sunarım. Biyokimya doktora eğitimim sırasında bana her türlü desteği sağlayan, başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Hatice Paşaoğlu olmak üzere, tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve tez izleme jürimde bulunan değerli hocalarımla Prof. Dr. Cemal Çevik, Prof. Dr. Deniz Erbaş'a teşekkür eder, saygılarımı sunarım. Deneysel grupların oluşturulmasında, özellikle deney hayvanları laboratuvarında yaptığımız çalışmalarda ve tezin hazırlanmasında önemli katkıları olan Genel Cerrahi Anabilimdalı öğretim üyesi Op. Dr. Bülent Salman'a sağladığı destekten ve emeğinden dolayı teşekkür ederim. Tezimi deneysel kısmının çalışılması, istatistiklerinin yapılması ve yazılmasında bana yol gösteren, emeğini ve bilgisini benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili hocam Doç. Dr. Muhittin A. Serdar'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bana her konuda sonsuz katkı sağlayan, destek ve güç veren ve doktora girmem, doktora tamamlamam ve tezimi yazıp bitirimemin en önemli uyarıcı sevgili eşim Beril Salman Akın'a, ayrıca doktora yaparken onlarla geçirmem gereken zamanları, onlardan izinsiz olarak çaldığım güzel kızlarım, Yağmur Naz ve Yelin Su'ya sonsuz teşekkür ederim.

Uzm. Dr. Kadir Okhan Akın

Ankara, 2008

1. GİRİŞ

İskemi, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan gereksiniminin dolaşım tarafından sağlanamaması ve oluşan artık ürünlerin uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır¹. Reperfüzyon ise bu iskemik dokudaki kan dolaşımının tekrar sağlanmasıdır. İskemik bir dokunun reperfüzyonu dokunun oksijen ve diğer metabolik gereksinimlerini karşılarken paradoksal olarak dokuda hasar oluşturmaktadır². Bir dokuda iske mi ve reperfüzyon sonucu oluşan hasar, dokunun aynı toplam sürede sadece iske miye maruz kalması sonucu oluşan hasardan daha fazladır³.

Miyokard infarktüsü, stroke ve organ transplantasyonu gibi önemli sağlık problemlerinde, organ hasarına yol açan temel patofizyolojik süreç, iske mi-reperfüzyona (I/R) bağlı doku hasarıdır⁴. İskemik dokunun reperfüzyon sonrası gördüğü hasar akciğer, böbrek, karaciğer, kalp, beyin ve barsaklar gibi bir çok organda ayrıntılı olarak araştırılmıştır^{5,6,7,8}. Karaciğer I/R hasarı bir antijene bağlı olmayan yanıttır ve Kupffer hücre (KC) aktivasyonu, reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) üretimi, nötrofil infiltrasyonu, adezyon molekülleri artışı, sitokin salınımı, hepatosit hasarı ve sinüzoidal endotelial hücrelerin ayrılması gibi süreçlere bağlıdır. Bu çok basamaklı hasarın mekanizması tam olarak açıklanamamıştır ancak kanıtlar hasarda anahtar rolün ROS tarafından oynandığına işaret etmektedir⁹.

I/R hasarı tıbbın bir çok alanında karşımıza çıkmakta ve uygulanmaktadır. Şok, yanık, sepsis, pankreatit, miyokard infarktüsü, serebrovasküler olaylar, travma, travma cerrahisi, kardiovasküler cerrahi, genel cerrahi I/R hasarının olduğu ve oluşturulduğu bazı durumlara örnek olarak verilebilir. Pratikte tüm cerrahi uygulamalarda doku iskemisi ve bunu takiben reperfüzyonu vardır. Transplantasyon, rezeksiyon gibi karaciğer cerrahi uygulamaların da yapılan Pringle manevrası sırasında da I/R hasarı oluşturulmaktadır.

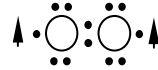
Bu çalışmada kısmi karaciğer iskemisi uygulanan ratlarda, I/R sonucu oluşan karaciğer hasarına karşı tiyoredoksin ve NOS inhibitörü olan L-Name'in koruyucu etkileri incelenmeye çalışıldı.

2. GENEL BİLGİLER

Karaciğer I/R süreci ROS, adezyon molekülleri, endotel hücreleri, kompleman sistemi gibi bir çok sistemin devreye girdiği karmaşık bir süreç olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle önce bu sistemlere genel bir bakış ve daha sonra I/R sürecinin fizyopatolojisini genel bilgilerde açıklamaya çalışacağız.

2.1. Reaktif oksijen bileşikleri (ROS)

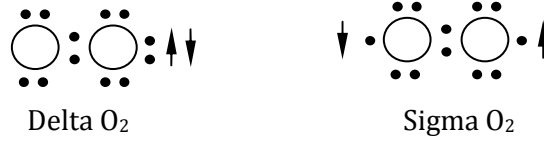
2.1.1. Moleküler oksijenin özellikleri: Moleküler oksijen (O_2), paralel spin durumlu iki ortaklanmamış elektrona sahiptir^{10,11,12,13,14}.



Ortaklanmamış elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller **serbest radikal** olarak tanımlanırlar. Ancak Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+2} ve Mo^{+5} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Bu tip maddeler serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler^{11,12,15}.

Serbest radikal tanımına göre O_2 , bir biradikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer.

Biradikal oksijenin elektronlarından birinin, enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle, **singlet oksijen** oluşur. Singlet oksijen, eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal



olmayan reaktif oksijen ürünüdür, delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır^{11,12}.

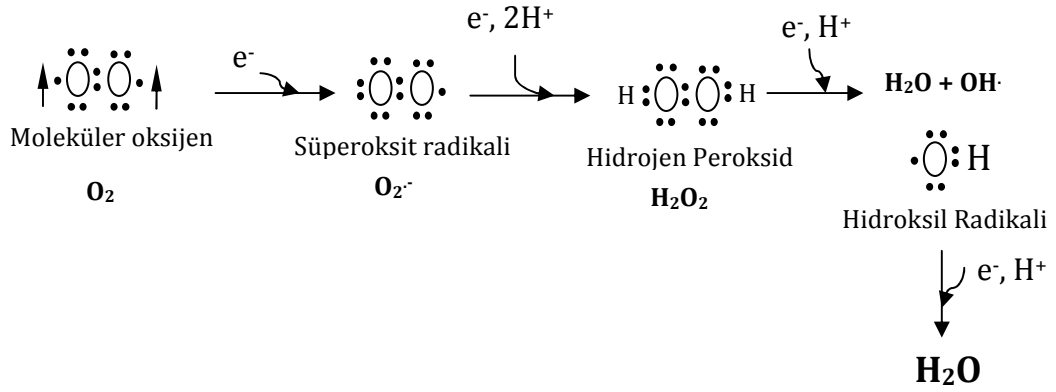
O₂, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede **reaktif oksijen türleri (ROS)** oluşturma eğilimindedir. ROS'ları 2 grupta incelemek olasıdır. Birinci grup serbest radikallerdir. 2. Grupta ise hidrojen peroksit (H₂O₂), nitrik oksit (NO), singlet oksijen gibi moleküller yer alır. Bu moleküller son yörüngelerinde eşleşmemiş elektron taşımadıkları için, serbest radikal değildir. Bu tip maddelere **nonradikal reaktif oksijen ürünleri** adı verilir, Tablo 1¹³.

Tablo1: Başlıca ROS'lar ve antioksidanları¹³

	ROS	Antioksidan
¹ O ₂	Singlet oksijen	Vitamin A, β-karoten, vitamin E
O ₂ ^{•-}	Süperoksit radikali	Süperoksit dismutaz (SOD), β-karoten
OH [•]	Hidroksil radikali	
RO [•]	Alkoksil radikali	
ROO [•]	Peroksil radikali	Vitamin E, vitamin C
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit	Katalaz, glutatyon peroksidaz
LOOH	Lipid peroksitleri	Glutatyon peroksidaz

Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin olduğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede peroksit radikalleri (ROO[•]), alkoksi radikalleri (RO[•]), tiyil radikalleri (RS[•]), sülfenil radikalleri (RSO[•]), tiyil peroksit radikalleri (RSO₂[•]), reaktif nitrojen bileşikleri

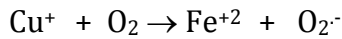
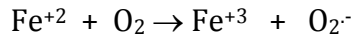
gibi çeşitli ROS'ların oluşumuna neden olurlar^{12,13} . Şekil 1'de genel ROS oluşum yolu izlenebilir..



Şekil 1: Oksijenin suya indirgenmesi sırasında ROS'ların oluşması.

2.1.2.Başlıca ROS'lar:

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$): $O_2^{\cdot-}$ tüm aerobik hücrelerde, O_2 'nin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallerinin oto-oksidasyonu, süperoksit radikali meydana getirebilir^{12-14,16,17} .

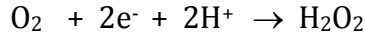


$O_2^{\cdot-}$ 'in kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikalın asıl önemi, H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının, indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir ve oksidan perhidroksi radikali ($HO_2^{\cdot}$) oluşturmak üzere protonlanır^{11-13,18} .

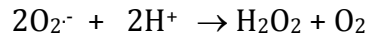
$O_2^{\cdot-}$ hem oksitleyici hem indirgeyici özelliğe sahiptir. $O_2^{\cdot-}$ 'nin fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) ile birleşmesi sonucu, bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$) meydana gelir. $ONOO^{\cdot}$, nitrit ($NO_2^{\cdot}$) ve nitrat ($NO_3^{\cdot}$) oluşturmak üzere metabolize edilir. $ONOO^{\cdot}$, azot dioksit ($NO_2^{\cdot}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik

ürünlere dönüşebilir ki, NO'nun zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur.

Hidrojen peroksit (H₂O₂): H₂O₂, süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya O₂'in çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin, iki proton (H⁺) ile birleşmesi sonucu meydana gelir. Ürat oksidaz, glukoz oksidaz ve D-aminoasit oksidaz gibi bir çok enzim, direkt oksijenden üretimi yapar^{11-13,14}.



Biyolojik sistemlerde H₂O₂'in asıl üretimi, O₂⁻'in dismutasyonu ile olur. İki O₂⁻ molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak H₂O₂ ve O₂'yi oluştururlar.

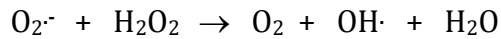


Bu reaksiyon, dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da **süperoksit dismutaz (SOD)** enzimi tarafından katalizlenir^{11,16,17,19}.

H₂O₂ bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri (ROS) kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe⁺² veya diğer geçiş metallerinin varlığında, **Fenton reaksiyonu**'yla veya süperoksit radikali varlığında **Haber-Weiss reaksiyonu**yla, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan, hidroksil radikalini (OH[•]) oluşturur^{13,14,18,20}.



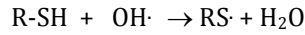
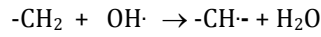
Fenton Reaksiyonu



Haber-Weiss Reaksiyonu

Süperoksit radikalının lipide çözünürlüğü sınırlı olduğu halde, H₂O₂ rahatlıkla çözünebilir. Bu nedenle H₂O₂, kendisinin olduğu yerden uzakta olan fakat Fe⁺² içeren membranlarda hasar oluşturabilir.

Hidroksil radikali (OH·): Hidroksil radikali (OH·), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu H₂O₂'den oluşmaktadır. Ayrıca suyun, yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da oluşur. OH·nin yarılanma ömrü çok kısadır. Hidroksil radikali olasılıkla ROS'ların en güçlüsüdür. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS·), karbon merkezli organik radikaller (R·), organik peroksitler (RCOO·) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur¹¹⁻¹⁴.

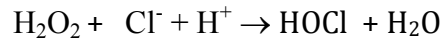


Ozon: Açık mavi renkli olan ozon (O₃), stratosferde solar radyasyona karşı koruyucu bir tabaka oluşturur (Global antioksidan). Ancak yer yüzünde toksiktir. Akciğerler için oldukça toksiktir ve proteinler, lipidler ve DNA'da ileri derecede hasar oluşturur^{11,14}.

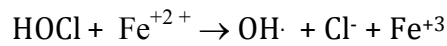
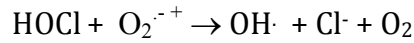
Nitrojenin oksidasyonu: Nitrik oksid (NO·) ve nitrojen dioksit (NO₂·) tek sayıda elektron taşıdıkları için radikal olarak tanımlanabilirler^{11,14,21}. Ancak nitroz oksid (N₂O) radikal değildir. NO· tüm fizyolojik ve patolojik süreçlerde, önemli bir mediator olarak karşımıza çıkar. NO· sentezini yapan NO sentaz (NOS) enziminin, farklı genler tarafından kodlanan 3 izoformu bulunmaktadır²¹⁻²⁴. Tüm izoformlar L-arjininin, sitrüllin ve NO'ya dönüşümünü katalizler. Reaksiyon O₂, NADPH ve arjininin, guanidin nitrojenine gereksinim gösterir. Nöronal NOS (tip I, nNOS) ve endotelial (tip III, eNOS) Ca⁺⁺-Kalmodulin bağımlı, yapısal NOS tipleridir. nNOS nörotransmitter olan NO'nun üretiminden sorumludur. eNOS tarafından üretilen NO·, endotel kökenli gevşetici faktör olarak bilinir ve vasküler düz kasın gevşemesini sağlayan temel uyarandır. eNOS ve nNOS fizyolojik durumlarda önemli fonksiyonlar yaparlar^{11,21}.

Uyarılabilen NOS (inducible NOS, iNOS, tip II) normal koşullarda aktif değildir. iNOS infeksiyöz ve inflamatuvar proseslerde sitokinler ve/veya endotoksinlere bağlı olarak aktiflenir ve çok bol miktarda NO[•] üretimi gerçekleştirir. iNOS hepatositler, makrofajlar, nötrofiller, düz kas hücreleri ve kondrositler gibi bir çok hücrede bulunur. iNOS'un artmış ekspresyonu sepsis, astım, romatoid artrit, aterosklerotik lezyonlar, tüberküloz, inflamatuvar barsak hastalığı ve iskemi-reperfüzyon zedelenmesi gibi bir çok hastalıkta ve patolojik süreçte gösterilmiştir. Bu hastalıklarda fazla miktarda ve sürekli NO üretiminin hastalık semptomlarının oluşumundan da sorumlu olduğu sanılmaktadır^{11,21}.

Hipokloröz asit (HOCl): Aktive nötrofiller tarafından üretilen güçlü bir oksidan maddedir. Hem taşıyan enzim olan myeloperoksidaz enzimi, fagositin sitoplazmasında H₂O₂ ve klorid iyonu (Cl⁻) varlığında HOCl oluşumunu katalizler^{11,14}.



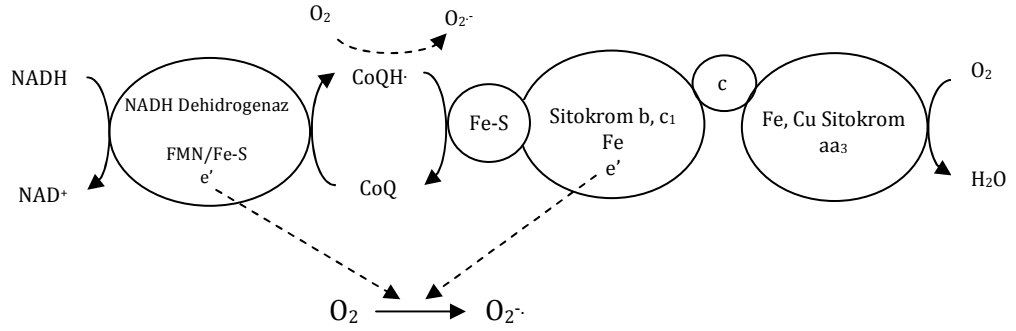
HOCl demir bağımlı ve bağımlı olmayan reaksiyonla, OH[•] radikaline dönüşür.²⁴ Hidroksil radikali de unsature yağ asitlerine saldırarak, lipid peroksidasyonunu başlatır.^{11,14}



2.1.3. Hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROS) kaynağı:

Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda, ara ürünler olarak devamlı şekilde ROS'lar oluşabilir.

a. Normalde hücrelerde en büyük ROS kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirinden (ETZ) sızıntıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş ETZ bileşenleri, büyük oranda indirgendiği zaman mitokondriyal süperoksit radikal üretimi artar^{13,25} Şekil 2'de ETZ'nin şematizasyonu izlenmektedir. .



Şekil 2: Elektron transport zincirinin şematik gösterimi

b. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır^{13,25,26}

c. Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında da, serbest radikaller ortaya çıkar. Bu enzimlerden biri ksantin oksidazdır. **Ksantin oksidaz** hasarlanmamış dokularda, bir dehidrogenaz olarak görev yapmaktadır. Pürinlerin yıkılım yolunda hipoksantinden, ksantin ve ksantinden, ürik asit oluşum basamaklarını katalizler ve elektron akseptörü olarak O_2 'den daha çok NAD^+ kullanır. İskemi gibi oksijensizliğe bağlı olarak, ATP üretiminin bozulduğu durumlarda, ADP yıkımı artar ve pürin bazları, ksantin oksidazın etkisiyle hipoksantine dönüştürülür. Ksantin oksidaz reaksiyonu sırasında, O_2 kullanılmakta ve O_2 hidrojen peroksit olarak indirgenmektedir. İskemide oksijen seviyesi düşük olduğundan ksantin oksidaz reaksiyonu sırasında H_2O_2 oluşumu azdır. Ancak oksijen seviyesi reperfüzyon sırasında normale dönünce, iskemik dokuda ksantin oksidaz etkisiyle fazla miktarda H_2O_2 ve

süperoksit radikali oluşur, bu da I/R zedelenmesinde oluşan hasarın nedenlerinden biridir. Ksantin oksidazın özellikle intestinal mukoza hücrelerinde görülen I/R hasarında önemli faktör olduğu düşünülmektedir^{13,25-27}.

d. Aldehit oksidaz yapı itibarıyla ksantin oksidaza benzer, substratlarının çoğu aynıdır ve süperoksit radikali üretir. Dihidroorotat dehidrojenaz, flavoprotein dehidrojenaz, aminoasit oksidaz ve triptofan dioksijenaz gibi enzimler de serbest radikal oluşmasına neden olurlar^{13,25}.

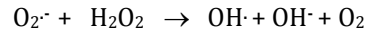
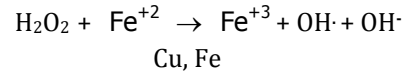
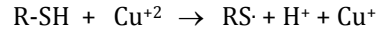
e. H_2O_2 'nin hücredeki önemli kaynaklarından biri peroksizomlardır. Peroksizomlardaki D-amino asit oksidaz, ürat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asidi açıl-KoA oksidaz gibi oksidazlar, süperoksit üretmeden, bol miktarda H_2O_2 üretimine neden olurlar. Ancak peroksizomlarda, hidrojen peroksidin suya ayrışmasını katalizleyen katalaz (CAT) enziminin aktivitesi de çok yüksek olduğundan, peroksizomlardan sitozole ne kadar H_2O_2 geçtiği bilinmemektedir.^{13,25,27}

f. Hayvan hücrelerinde askorbik asit, tiyoller, adrenalin ve flavin koenzimleri gibi bazı bileşiklerin oto-oksidasyonu, süperoksit radikalinin bir başka kaynağıdır^{13,25,27}.

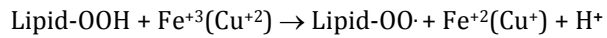
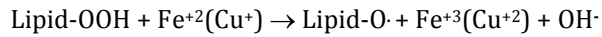
g. Araşidonik asit metabolizması, reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranından araşidonik asidin serbestleşmesine yol açar. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu, çeşitli serbest radikal ara ürünleri meydana gelirler. Araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine

"Enzimatik Lipid Peroksidasyonu" denir. Serbest radikallerle prostaglandin metabolizması birbiriyle yakından ilişkilidir^{13,25,27}.

h. Özellikle demir ve bakır olmak üzere geçiş metalleri, fizyolojik şartlarda oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında görev alırlar. Geçiş metalleri bu özellikleri nedeniyle, serbest radikal reaksiyonlarını hızlandıran katalizör görevi görürler. Demir ve bakır, tiyollerden tiyil sentezini, H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ den $OH^{\cdot}$ sentezini katalizlerler.^{13,25,27}

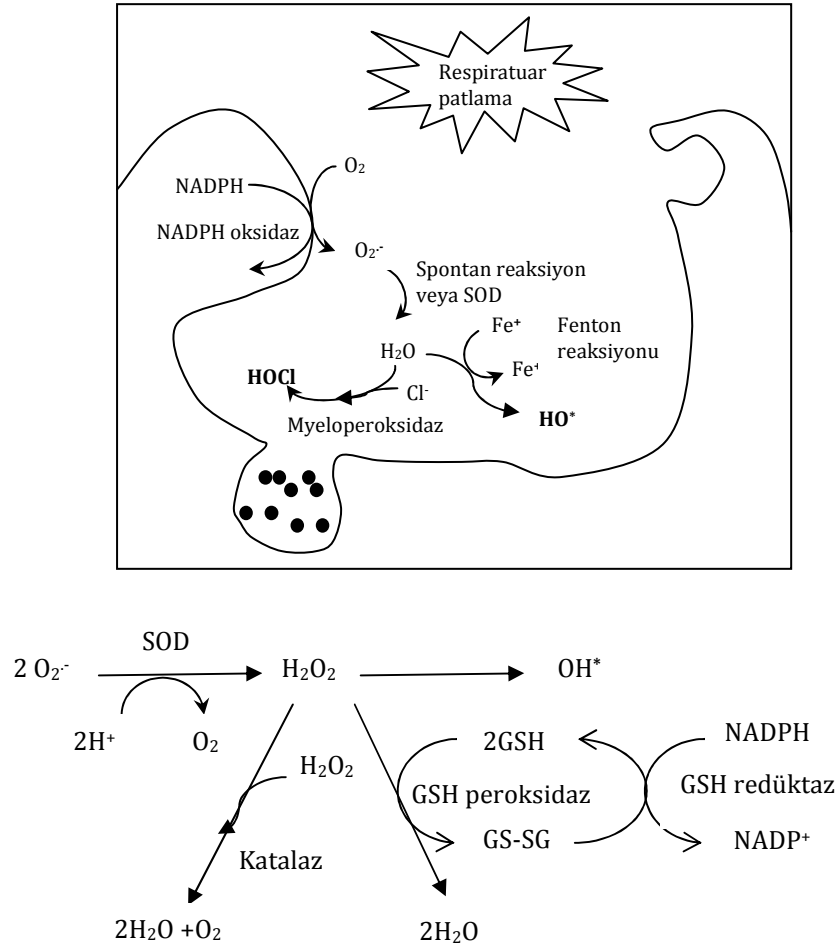


Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki asıl önemi, lipid peroksidasyonundaki etkileriyle ilgilidir. Geçiş metalleri lipid peroksidasyonunu başlatmaktan çok, sentezlenmiş olan lipid hidroperoksitlerinin (LOOH) parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize ederler. Böylece daha az zararlı olan radikalleri daha zararlı hale getirirler^{13,25,27}.



i. Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositoz sonrasında, bakterisidal etki göstermek için çeşitli serbest radikalleri üretilir. Fagositik lökositlerin opsonize mikroorganizmalar, C5a kompleman faragmanı, lökotrien B_4 , bakteriyel orijinli N-formil oligopeptitler gibi partiküllerle uyarımını takiben, lizozomal komponentler dışarıya verilmeye başlanır ve reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumuyla birlikte, mitokondri dışında oksijen

tüketiminde hızlı bir artış (solunumsal patlama) görülür^{13,25,27,28}. Şekil 3'de nötrofilde fagositoz sonrası ROS üretimi izlenebilir.



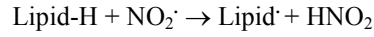
Şekil 3: Fagositoz sonrası ROS üretimi

Nötrofiller ve monositlerin primer lizozomal granüllerinde, Fe-hem içeren mieloperoksidaz enzimi bulunur. Mieloperoksidaz, H₂O₂ varlığında klorür, iyodür ve bromürün oksidasyonunu katalizleyerek hipokloröz asit (HOCl), hipoiyodik asit (HOI) ve hipobromik asit (HOBr) oluşturur. Bu bileşikler ve bunların tuzları güçlü oksidanlardır, biyolojik olarak önemli moleküllerle reaksiyona girerek mikroorganizmayı etkileyen toksik ajanlar meydana getirirler^{13,25,27}.

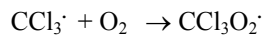
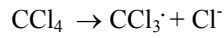
Nötrofillerden toksik ajanların sızıntısı veya sekresyonu, yakın hücrelere ve solubl sistemlere zarar verir. Fagosit kaynaklı oksidanlar ototoksik, immünosupresif ve mutajenik etkiler gösterirler. Örneğin romatoid artritli hastaların diz eklemlerinde fazla miktarda nötrofil birikir ve bu nötrofillerden ortama salınan serbest radikaller eklem hasarını hızlandırırlar.

j. Bazı yabancı toksik maddeler hücrede serbest radikal üretimini artırır. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler ya da serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını sağlayan antioksidan aktiviteyi düşürürler. Bu tip maddeler dört grupta toplanabilirler^{13,25,27}.

1) Toksinin kendisi bir serbest radikaldir. Örneğin kirli havanın koyu rengini veren azot dioksit gazı ($\text{NO}_2\cdot$) böyle bir maddedir. $\text{NO}_2\cdot$ etkili bir lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır^{13,25,27}.



2) Toksin bir serbest radikale metabolize olur. Örneğin kuru temizlemede kullanılan toksik bir madde olan karbon tetraklorür (CCl_4), karaciğerde sitokrom p450 tarafından triklorometil radikale ($\text{CCl}_3\cdot$) dönüştürülür. Triklorometil radikali de O_2 'le etkileşerek peroksil serbest radikali ($\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$) oluşturur^{13,25,27}.



$\text{CCl}_3\cdot$ ve $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ kuvvetli lipid peroksidasyon başlatıcılarıdır. Böylece ROS üretimi karaciğerde antioksidan savunmaları aşar, sellüler membranlarda oksidatif yıkım ve ciddi doku hasarı meydana gelir.

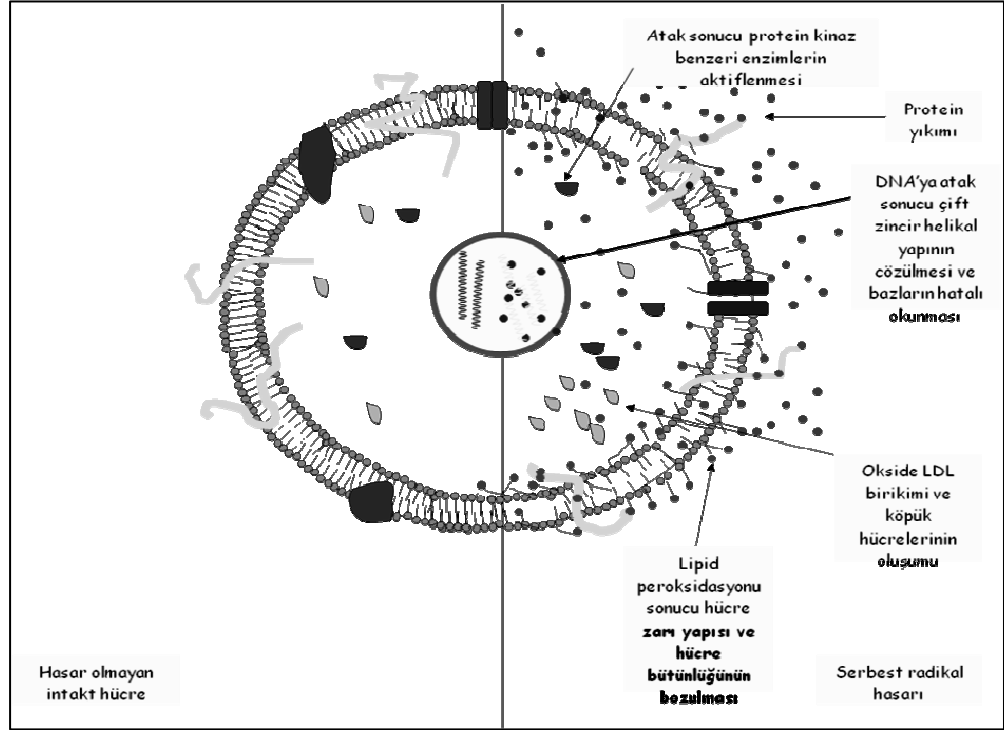
3) Toksinin metabolizması sonucu, serbest oksijen radikali meydana gelir. Örneğin özellikle karaciğerde biriken paraquat, bir serbest radikale indirgendikten sonra tekrar yükseltgenerek rejenere edilirken,

oksijen indirgenir ve böylece bol miktarda süperoksit radikali üretilmiş olur^{25,27}. Diyabetik bir ajan olan alloksan da paraquat gibi etki eder. Antikanserojen bir madde olan doxorubicin, DNA replikasyonunu inhibe ederken olasılıkla önemli miktarda süperoksit radikali ve hidroksil radikali üretimine neden olur^{13,25,27}.

Birçok endojen bileşiğin ve ksenobiyotiğin hidroksilasyonunu, endoplazmik retikulum membranında yerleşmiş, iki üniteden oluşmuş bir hem proteini olan sitokrom P450 katalize eder. Bu reaksiyonlarda oksijen kaynağı olarak O_2 kullanıldığı gibi, peroksitler (ROOH) de kullanılabilir. Ancak, alkol ve asetonla indüksiyonunda olduğu gibi, bazı hallerde sitokrom P450 aşırı miktarda süperoksit radikali üreten bir izoenzime dönüşür.

4) Toksin antioksidan aktiviteyi düşürür. Örneğin, parasetamolün karaciğerde sitokrom P450 tarafından metabolizması, antioksidan aktivitede önemli yeri olan glutatyonla reaksiyona giren bir ürün oluşturarak, glutatyonun miktarını azaltır^{13,25,26}.

2.1.4. ROS'ların etkileri ROS oluşumu hücrede inflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı (pO_2), ozon (O_3) ve NO_2 kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar^{13,25}.

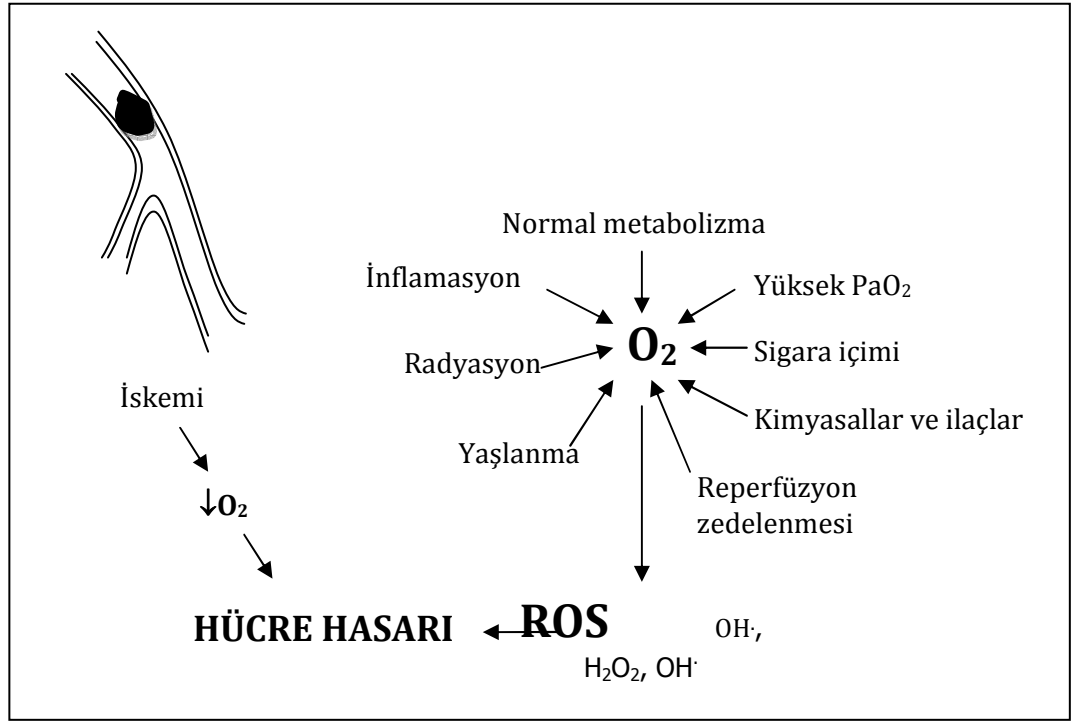


Şekil 4: ROS'ların hücrede oluşturdukları hasar.

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Süperoksit radikali ve hidroksil radikali sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran geçirgenliği artar^{13,25}. Şekil 4'de ROS'ların hücrede oluşturdukları hasarlar şematize edilmeye çalışılmıştır.

Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfidril grupları ve diğer amino asit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur.

Hücrede ROS'ların artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir. Reperfüzyon ROS'ların artışına bağlı olarak iskeminin oluşturduğu hücre hasarını artırır^{13,25,29,30}. Şekil 5'de iskemi ve ROS oluşumu şematize edilmiştir.



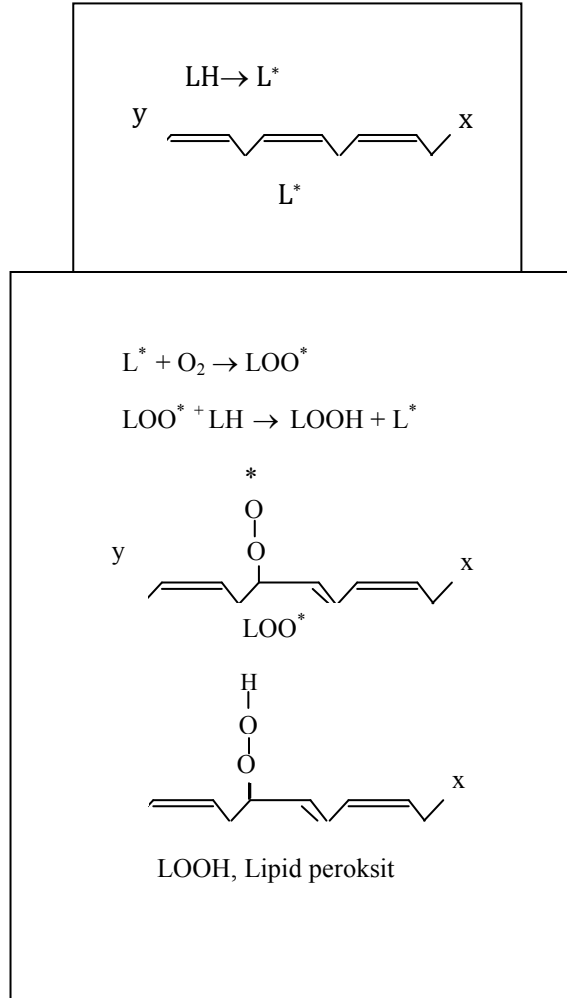
Şekil 5: ROS üretimi ve hücre hasarı

ROS'ların lipidlere etkileri: Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı, en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar^{11,13,25}.

Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren, zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında, lipid radikalleri ($L\cdot$) ve lipid peroksit radikallerinin ($LOO\cdot$) oluşması, ROS'ların neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid

peroksidasyonuna, "**nonenzimatik lipid peroksidasyonu**" denir ^{11,13,25}.

Şekil 6'da lipid peroksidasyonu gösterilmiştir.



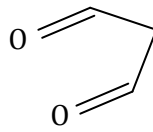
Şekil 6: Lipid peroksidasyonu

Hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri, poliansatüre yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu, genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar.

$L^{\cdot}$ dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. $L^{\cdot}$ O_2 'le etkileşmesi sonucu, $LOO^{\cdot}$ oluşur. $LOO^{\cdot}$ membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek, yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine ($LOOH$) dönüşür ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder^{11,13,25}.

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerinin yıkılımı, geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Plazma membranı ve subsellüler organellerde, lipid peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallerinin varlığında artar. Lokal olarak H_2O_2 'den, Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir^{11,13,25,31,32}. $LOOH$ yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar.

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyon sonucunda, malondialdehit (MDA) meydana gelir.



MDA

MDA kanda ve idrarda ortaya çıkar. Yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber, lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik örneklerde MDA ölçülmesi, lipid peroksit seviyelerinin göstergesi olarak kullanılır^{13,25,26}.

Nonenzimatik lipid peroksidasyonu, çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Membran yapısına direkt olarak ve ürettiği reaktif aldehitlerle, diğer hücre bileşenlerine indirekt olarak zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur.

ROS'ların proteinlere etkileri: Proteinler, serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi, amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler, serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur^{11,25,27,31}.

Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan immünoglobülin G ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Prolin ve lizin ROS üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında, nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobin gibi hem proteinleri de, serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali veya H_2O_2 'le reaksiyonu, methemoglobin oluşumuna neden olur^{13,25,27,31}.

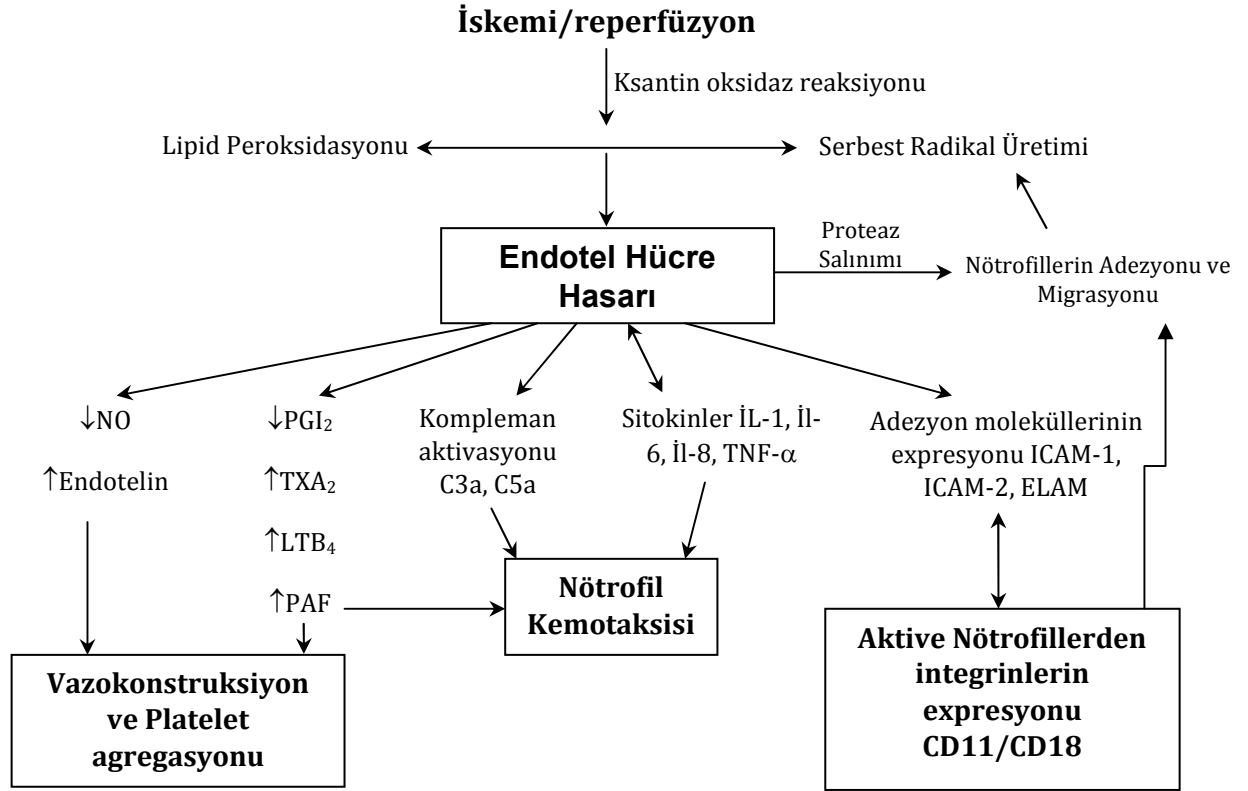
ROS'ların nükleik asitler ve DNA'ya etkileri: İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H_2O_2 , membranlardan kolayca geçer ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Süperokside maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde, daha fazla antijenik özellik gösterirler ki

bu oldukça önemli bir etkidir. Çünkü otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozusta (SLE) ve romatoit artritte (RA) dolaşımda anti-DNA antikorlar bulunur.^{13,25,27,31}

ROS'ların karbonhidratlara etkileri: Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir. Bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimiyle beraber ROS üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Ancak bu hallerde serbest radikal artışının, sebep mi yoksa sonuç mu olduğu tam olarak bilinmemektedir.

2.2. Karaciğer iskemi reperfüzyon zedelenmesinin fizyopatolojisi

İskemi sonucunda dokuda gelişecek hasarın şiddetini, tıkanan arterin büyüklüğü, tıkanma süresi ve dokunun karakteristik özellikleri gibi bir çok faktör etkilemektedir. I/R zedelenmesi, hücre ve doku hasarına yol açan kompleks bir seri olaylar dizisidir³². Şekil 7'de I/R zedelenmesinin fizyopatolojisi özetlenmeye çalışılmıştır. Bazı dokular, iskemiye karşı daha dayanıklı olabilmektedir³³. İskemi sırasında hücreler iyonik gradiyentini ve homeostazını korumak için gerekli olan enerjiyi sağlayamamaktadır. İskemi sonrası dokunun yaşamını devam ettirmesi için, reperfüzyon mutlaka gereklidir. Fakat I/R döngüsünün hasarı sadece iskemiye göre daha fazla arttırdığı da gösterilmiştir^{28,29}. Bu hasar sadece lokal değil zaman zaman sistemik sonuçlarda doğurmakta ve multiple organ yetmezliklerine de ilerleyebilmektedir³⁴⁻³⁶. Parks and Granger 4 saatlik iskemiye göre, 3 saatlik iskemi ve takip eden 1 saatlik reperfüzyonun daha fazla ve ağır hasar oluşturduğunu göstermişlerdir³⁷.



Şekil 7: I/R zedelenmesinin mekanizması.

(NO, nitrik oksid; PGI₂, prostasiklin; TXA₂, tromboksan A₂; LTB₄, lökotrien B₄; PAF, platelet aktive edici faktör; IL, interlökin; TNF, tümör nekroze edici faktör; ICAM, intersellüler adezyon molekülü; ELAM, endotelial lökosit adezyon molekülü).

Organ kan akımının ve buna bağlı olarak da organa sağlanan oksijen ve besin desteğinin kesilmesi, bir çok cerrahi prosedürde karşımıza çıkmaktadır. Karaciğer cerrahisinde, özellikle büyük hepatik tümörlerin çıkartılması, hepatik travmanın cerrahisi, vasküler yapıların düzeltilmesi, transplantasyon ve rezeksiyon cerrahilerinde (pringle manevrası) bu iskemi periyotları oldukça uzundur³⁸⁻⁴⁰.

I/R zedelenmesinin fizyopatolojisi tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Her geçen gün yeni moleküllerin, yeni genlerin ve çeşitli faktörlerin keşfiyle daha da karmaşık hale gelmektedir. Ancak genel olarak I/R zedelenmesi ele alındığında bu sürecin ROS, kompleman sistemi, hem

oksijenaz sistemi (HO), endotel hücreleri ve nötrofiller arasındaki tam anlaşılammış ve karmaşık bir ilişkiyle ortaya çıktığı görülmektedir³².

2.2.1. Karaciğer iskemi ve reperfüzyon zedelenmesinde ROS'ların rolü:

ROS'lar I/R zedelenmesinde, hücre ve doku hasarına yol açan faktörler içinde en önemli olanlarındandır. I/R sürecinde KC (karaciğer makrofajları), polimorf nüveli lökositler (PMNs), endotel hücreleri (EC), hepatositler v.b hücrelerde sürekli ROS üretilmektedir.

Fizyolojik koşullarda aerobik metabolizma sırasında, düşük düzeyde ROS'lar ve reaktif nitrojen bileşikleri (RNS) normal hücre fonksiyonunun bileşeni olarak salınmaktadır. Bu düşük konsantrasyondaki ROS ve RNS'ler immün cevap, hücre adezyonu, hücre proliferasyonu, inflamasyon, metabolizma, yaşlanma ve hücre ölümü gibi süreçlerde kilit moleküller olarak karşımıza çıkmaktadır. Örneğin hücrelerde gen ifadesinin oksidasyon-redüksiyon (redoks) bazlı regülasyonu, temel regülasyon mekanizması olarak ortaya çıkmaktadır. Ancak fazla miktarda metal (Fe/Cu) bulunması, ilaç metabolizması veya I/R durumlarında ise ROS/antioksidan dengesi ROS'lar yönüne kaymakta ve sonuçta oksidatif stres ve sitotoksiste oluşmaktadır^{28,40,41-45}.

I/R zedelenmesi genel olarak ele alındığı zaman, süreç iskemik periyotla başlamaktadır. Karaciğer iskemisinde önce KC'ler, hepatositler ve EC'ler etkilenmektedir. Zaten I/R süreçlerinde üretilen ROS'ların ana kaynağını da bu hücreler oluşturmaktadır.

KC ve EC'de enerji substratlarında azalma sonucu membran transport bozulmakta ve ödem oluşmaktadır⁴¹. Hücrelere gelen oksijen kesilince oksidatif fosforilasyonun bozulmasıyla ATP miktarı azalmakta,

Ca^{++} homeostazı bozulmakta ve hücre içine su, Na^+ ve Ca^{++} girişı artmaktadır. Adenozin trifosfat (ATP) üretimindeki problemlere bağlı olarak hücreler enerji molekülü olarak ATP'nin yanında, adenozin difosfat (ADP) ve hatta adenozin monofosfatları da (AMP) kullanmaya başlamaktadır. AMP yıkımlarının artışı sonucu hücrede ksantin türevleri, ürik asit düzeyleri artmaktadır. Ksantin oksidaz reaksiyonunun sürekli çalışmasına bağlı olarak da normalden çok fazla miktarlarda $\cdot\text{OH}$ ve H_2O_2 üretilmektedir. ATP katabolizmasındaki bu değişikliklerle ROS'ların, sitokinlerin, adezyon moleküllerinin ve endotelin ve tromboksan gibi vazoaktif ajanların üretimleri artmaktadır. Bu tip değişikliklere NO, Pg l'ler gibi hücre koruyucu maddelerin azalması da eşlik etmektedir⁴⁶. Böylece iskemi, reperfüzyon döneminde doku zedelenmesini artıran proinflamatuar bir durum yaratmaktadır.

Ksantin oksidaz reaksiyonu yanında, hepatositlerde ve EC'lerde üretilen süperoksitlerin ana kaynağı olarak, fagosit tip NADPH oksidaz reaksiyonu gösterilmektedir⁴⁰. Bu enzimi yöneten, Rho ailesine ait küçük bir GTPaz olan, Ras-related C3 botulinum toksin substrat-1'dir (Rac1). Erken reperfüzyon fazında Rac1 inhibisyonunun, hücre içi oksidatif stresi azalttığı ve karaciğeri koruduğu gösterilmiştir⁴⁰. Üretilen ROS'lar arasında başlıca olarak H_2O_2 , O_2^- ve OH^- sayılabilir.

Aktive KC'ler ROS'lar kadar bol miktarda, proinflamatuar (TNF- α , IL-6, IL-1 ve prostaglandinler) ve antiinflamatuar (IL-10, IL-13) mediatörlerin salınımını gerçekleştirir^{47,48}.

Hasarlanmış vasküler endotelial hücrelerde, özellikle geğ reperfüzyon fazında ROS, araşıdonik asit metabolitleri, NO, endotelinler (ET), sitokinler, adezyon molekülleri gibi maddelerin salınımı artmakta ve kompleman aktivasyonu ortaya çıkmaktadır. Proinflamatuar sitokinler, kemokinler ve aktive kompleman faktörleri geğ reperfüzyon fazında

nötrofillerin biraraya toplanmasından ve nötrofil aracılı oksidatif stresden sorumludur. KC ve nötrofil aracılı oksidatif stres, reperfüzyon fazında oluşan vasküler ve parankimal hasarın önemli bir faktörüdür⁴⁰. Bu postiskemik vasküler oksidan stresin, H_2O_2 , HOCl ve $ONOO^-$ 'leri yok eden, ekstrasellüler glutatyonun (GSH) koruyucu etkileriyle azaltıldığı gösterilmiştir⁴⁰.

I/R sürecinde üretimleri artan araşidonik asit metabolitleri, NO, ET, katekolaminler, sitokinler, adezyon molekülleri gibi maddeler ve kompleman sistemi, ksantin oksidaz reaksiyonunun aktivasyonu da bu hücrelerde ROS üretimini artırmaktadır³².

ROS'lar I/R zedelenmesinin patogenezinde, hücresel bileşenlerin ve lipidlerin direk oksidasyonu, inflamatuvar gene transkripsiyonunun aktive edilmesi, immün sistemin aktivasyonu, protein oksidasyonu, ısı şok proteinlerinin aktivasyonu gibi bir çok yerde rol oynamaktadır^{45,49}. ROS'lar ayrıca peroksinitritler gibi hücre ölümünü direk uyaran maddelerin oluşumunu da uyarmaktadır⁴⁹. Lipid peroksidasyonu, I/R zedelenmelerinde hücre ölümüne yol açan faktörler arasında sayılmaktadır.

Ayrıca ROS'lar NF- κ B ve aktivatör protein-1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörlerini uyarak reperfüzyon hasarını artırmaktadır^{50,51}. Postiskemik oksidatif stress TNF- α , iNOS, hem oksijenaz-1, kemokinlerin ve adezyon moleküllerinin gen ekspresyonlarını artırır. Diğer yandan antioksidanlar NF- κ B ve AP-1 aktivasyonunu baskılayarak proinflamatuvar gen ekspresyonunu azaltmaktadır^{52,53-56}.

Oksidan strese bağlı hücre ölümünde piridin nükleotidlerin oksidasyonu, mitokondrilerde Ca^{++} birikimi, mitokondride O_2 üretimi azalması, O_2 azlığına bağlı olarak da mitokondrial membran

geçirgenliğinde artış ve membran potansiyelinde bozulma gibi süreçler karşımıza çıkar⁵⁷⁻⁵⁸. Bunu destekler şekilde, karaciğer I/R zedelenmesinde mitokondrial membranda permeablite artışı olur ve mitokondrial membran permeablite artışının farmakolojik olarak inhibisyonunun reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğuda gösterilmiştir⁵⁹⁻⁶². Akut atakta KC ve nötrofiller tarafından gerçekleştirilen hepatosellüler nekroza, proteaz katkısı zorunlu değildir. Bununla beraber günler sonra, uzun süreli nötrofil cevabının olaya eklenmesiyle, hasardan sorumlu olanlar ROS ve proteazlar olarak sayılabilir.

İnflamatuar hücreler ROS'ların yanında, nötrofiller için sitotoksik mediatörler olan proteazların salınımını gerçekleştirmektedir⁶³. Proteaz inhibitörlerinin yararlı etkisi, deneysel çalışmalarda ve insan çalışmalarında gösterilmiştir⁶⁴⁻⁶⁶. Bir hipotezde ROS'ların inflammatuar süreçte tek başına çok fazla hasar oluşturmadığı, ancak nötrofillerin çevresinde plazmada, antiproteazları okside ederek inaktive ettiği söylenmektedir⁶⁷. Buda nötrofil kökenli proteazların, antiproteazlarla inaktive edilmeden lokal olarak etki göstermesine izin verir. Ancak son yıllarda elde edilen kanıtlar net bir şekilde KC ve nötrofiller tarafından üretilen ROS'ların, hepatositlerin ölümünden sorumlu olduğunu göstermektedir^{52,68}.

2.2.2.Endotelin ve Nitrik Oksit (NO):

NO karaciğerde yapısal enzimler olan eNOS ve iNOS tarafından sentezlenir. eNOS sadece sinüzoidal endotelial hücrelerde üretilmektedir⁶⁹. iNOS ise transkripsiyonel olarak, endotelial hücreler, hepatositler ve diğer karaciğer hücreleri tarafından düzenlenmektedir. NO hücre membranından serbestce difüze olur ve sitoplazmik guanilat siklazı aktive ederek vazodilatasyon oluşturur. Vazokonstriktörlerin etkin olduğu dönemde, NO presinüzoidal ve sinusoidal alanda vazodilatasyonu uyarır⁷⁰⁻

⁷². Vazodilatasyon etkisine ek olarak NO, O_2^- ile reaksiyona girer ve potansiyel bir oksidan olan ONOO⁻ 'i meydana getirir⁷³. Aslında O_2^- 'de NO ile SOD'dan daha hızlı reaksiyona girmektedir⁷³. Genel olarak eNOS'un ürettiği NO karaciğer kan akımının devamlılığı açısından önemlidir. Bunun yanında iNOS'un ürettiği fazla miktardaki NO'da hipotansiyon oluşumu, şok yanında peroksinitrit aracılı hücre hasarından da sorumludur⁷⁴.

Mikrodolaşım bozuklukları ve nonperfüze sinüzoidler, hepatik iskemi sonrası reperfüzyon hasarına katkıda bulunan iyi tanımlanmış fenomenlerdir⁷⁵⁻⁷⁷. Bunun yanında reperfüzyon fazında oluşan vazokonstriksiyon, vasküler hücrelerin hasarı ve intravasküler koagülasyon sinüzoidlere olan kan akımını azaltır veya durdurur ve karaciğer hasarına yol açar^{72,78}. Reperfüzyon fazında vazokonstriksiyona yol açan en potent ajan endotelinlerdir⁷⁹.

I/R zedelenmesinde vasküler tonus, NO ve ET-1 arasındaki dengeye bağlıdır. NO ile ET-1 arasındaki bu kolayca kırılabilen dengenin bozulması, vazokonstriksiyonu uyarmaktadır^{43,47}. Reperfüzyonun başlangıcında NO seviyeleri azalmakta, ET seviyeleri artmaktadır ve sonuçta mikrosirkülasyonda vazokonstriksiyon oluşmaktadır. İskemi, hücre içi NO sentezi için gerekli olan NADPH ve oksijen konsantrasyonunu azaltmakta ve arjinin salınımını ve yıkımını artırmaktadır. Endojen ve eksojen tüm NO'lar, vazodilatasyon yaparak ve selektinler gibi adezyon moleküllerinin ifadesini azaltarak, I/R zedelenmesine karşı hepatosit ve EC'leri korumaktadır^{44,48}. Bunun yanında spesifik uyarıların (sitokinler ve kemotaktik faktörler gibi) etkisiyle uyarılabilir iNOS uyarılmakta ve sentezlenmektedir^{45,49}. Klinik pratikte NO konsantrasyon artışının ve ET konsantrasyonunun azalmasının I/R zedelenmesini azalttığı gösterilmiştir⁶³. Ayrıca NOS inhibitörlerinin kullanımının eNOS'u azaltarak I/R'da mikrovasküler

perfüzyonu daha da düşürdüğü ve karaciğer hasarını artırdığı net bir şekilde ortaya konmuştur^{80,81}.

Ancak ilginç olarak NO, I/R zedelenmesinde ki koruyucu etkisine ters olarak peroksinitrit üretimini artırmaktadır⁸⁰. iNOS gen ifadesinin endotoksinlerle uyarılması, iNOS enzim aktivitesinin artışına ve fazla miktarda NO üretilmesine yol açar. Artan NO'da sistemik vazodilatasyon ve hipotansiyona bağlı karaciğer kan akımını azaltarak ve peroksinitrit sentezini artırarak hasarı artırmaktadır⁷⁴.

NO ve ET arasındaki dengenin bozulması sonucu oluşan vazokonstrüksiyonun diğer bir sonucu, EC ile lökositler arasındaki teması artırması ve lökotaksisin uyarılmasıdır. Her ne kadar kapiller lümen tam olarak tıkanmasada, toplanmış lökositler sinüzoidal kapillerlere kan geçişini azaltmaktadır^{82,83}. Bu tabloya platelet agregasyonunun eklenmesiyle kan akımı daha da bozulmaktadır. Ayrıca mikrosirkülasyonda oluşan yetmezlik tablosu, EC'lerinin yanında, KC ve nötrofillerden de iskemik hasarın şiddetini artıran sitokinlerin salınımına yol açmaktadır. I/R zedelenmesinin oluşumunda en çok dikkati çeken sitokinler tümör nekrosis faktör alfa (TNF- α), interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), prostaglandinler (PG), özellikle süperoksid (O_2^-) ve H_2O_2 olmak üzere ROS'lardır⁸⁴⁻⁸⁹ (Şekil-7).

2.2.3.I/R'da nötrofiller ve adezyon molekülleri:

I/R zedelenmesinin erken reperfüzyon fazında, nötrofiller karaciğer vasküler kompartımanında toplanır, aktive olur ve reperfüzyon hasarını şiddetlendirirler⁹⁰. I/R'da lökosit aracılı hasarın oluşumu; mikrovasküler tıkanıklık, ROS salınımı, sitotoksik enzim salınımı, vasküler permeablite artışı ve artmış sitokin salınımı gibi bir çok mekanizmaya dayanmaktadır⁹¹⁻⁹⁴.

Nötrofillerin vasküler kompartımda toplanmasında ve dokuya geçişinde bir çok lökosit adezyon molekülüleri (LAMs) görev yapmaktadır⁹⁵. Nötrofillerin postkapiller venüller bölgesinde toplanması için, endotelial hücrelerden selektinlerin salınması ve nötrofillerde bulunan reseptörlerle selektinlere bağlanması gereklidir.

Selektinlerin L-, P- ve E-selektinler olmak üzere 3 tipi bulunmaktadır. Bu moleküller doku hasarında, lökositlerin aktive endotele tutunmasında önemli olan partiküllerdir⁹⁶⁻¹⁰¹. L-selektin, bir çok lökosit tipinde bulunan bir hücre yüzey glikoproteinidir⁹⁷. L-selektin lenfositlerin periferik lenf nodlarına ve kronik inflamasyon sahasına, nötrofillerin akut inflamasyon alanına göçüne aracılık eder. P-selektin, lökositlerin dokuya göçünde kritik rol oynayan hücre yüzey glikoproteinidir⁹⁹. P-selektin temel olarak endotelial hücrelerin Weibel-Palade body'lerinde ve plateletlerin alfa granüllerinde depolanmaktadır. Trombin gibi çeşitli uyaranlarla bu hücrelerin uyarımına bağlı olarak, hızla hücre yüzeyine geçmektedir. E-selektin ekspresyonu endotelial hücreden, endotoksinler ve IL-1 ve TNF gibi pre-inflamatuvar sitokinlerin uyarımına bağlı olarak artmaktadır. E-selektin uyarımdan 4-8 saat sonra pik değerlerine ulaşmakta ve 24 saat içinde bazal seviyelerine geri dönmektedir¹⁰²⁻¹⁰⁴.

Doku hasarının oluşumundan sonra, 10-20 dakika içinde temelde P-selektine bağlı olarak (E-selektinin de etkisi vardır ama daha azdır), lökositlerin endotelial hücrelere yapışması gerçekleşmektedir. Bu da P-selektinin depolardan hızla mobilize olduğunu göstermektedir. Yaklaşık 20 dakika sonra degradasyona bağlı olarak, P-selektinin görevi tamamlanmakta ve temelde görevi bundan sonra L-selektin devam ettirmektedir¹⁰⁵.

Nötrofillerdeki β_2 -integrinlerin (LFA-1), kemotaktik faktörlerle kısmi olarak aktivasyonu ve endotelial hücrelerdeki hücreler arası adezyon

molekül-1'in (inter-cellular adhesion molecule-1/ICAM-1) fazla miktarda salınımı nötrofillerin ekstrasvazasyonuna ve inflamatuvar alana göçüne yol açmaktadır. Nötrofiller EC'lere ICAM-1/LFA-1 ile bağlanmaktadır. Fakat bu genel şema postiskemik karaciğere kısmi olarak uyarlanabilir. Karaciğerde sinüzoidler ve postsinüzoidal venüller olmak üzere, reperfüzyonda nötrofillerin toplanacağı iki temel vasküler yatak bulunmaktadır¹⁰⁶. Venüller endotelial hücreler, Weibel Palade body'ler tarafından salınan moleküller sayesinde P-selektin ekspresyonunu artırabilirler¹⁰⁷. P-selektinle beraber E-selektinler, ICAM-1 ve VCAM-1 transkripsiyonel olarak aktive edilebilir¹⁰⁸. Sinusoidal EC'ler ise, Weibel Palade body'leri içermedikleri için P-selektin salınımını uyaramazlar ancak bu hücrelerde, diğer CAM'ların salınımını artırmaktadırlar¹⁰⁸.

Selektinler ve β_2 -integrinler-ICAM-1 etkileşimleri postsinüzoidal venüllerde, nötrofillerin rolling ve adezyonu süreçlerine katılır^{109,110}. Bununla beraber post-sinüzoidal kapillerlerden lökositlerin göçüne ait kanıtlar sınırlıdır ve bu bölgenin, parankime nötrofil göçüne katılıp katılmadığı soru işaretidir^{106,109,111}. Sinusoidal alan ise nötrofil ekstrasvazasyonu için esas alandır¹⁰⁹⁻¹¹⁶. Sinüzoidlere nötrofil sekestrasyonu kan akımına karşı rezistansı artırır, ancak perfüzyonda oluşan yetmezliğin ve hasarın temel nedeni değildir^{75,117}. Nötrofil aracılı hasarın oluşabilmesi için önce nötrofiller damar dışına çıkmalıdır. Bu işlem için β_2 -integrinler-ICAM-1 ve β_1 -integrinler-VCAM-1 etkileşimleri gereklidir^{111,112}. Bu adezyon molekülleri ve E-selektinlerin ilişkisi transmigrate olan lökositlerin ileri aktivasyonu sağlanır¹¹⁸. Nötrofiller damar dışına çıktıktan sonra, β_2 integrin lenfosit function-associated antigen-1'leri (LFA-1; CD11a/CD18) kullanarak, hepatositte eksprese edilen ICAM-1'e bağlanır. Daha da önemli olarak bu süreç sonunda, lökositlerde degranülasyon (proteaz salınımı) ve uzun sürelerde adezyona bağlı oksidan stres ortaya çıkar¹¹⁹⁻¹²¹. Hepatik I/R sürecinde ICAM-1 üretimi,

hepatosit ve endotelial hücrelerde transkripsiyonel olarak uyarılmaktadır^{113,122}. Bununla beraber reperfüzyonda oluşan yaygın vasküler hasar, endotelial hücre bariyerini ortadan kaldırmakta ve nötrofiller direkt olarak hepatositlere bağlanmaktadır. Bu bağlanma temelde LFA-1-ICAM-1 bağlantısına bağlıdır¹¹⁹.

Selektinlerin, özellikle de P-selektinin karaciğer inflamasyonundaki rolü karmaşıktır. Sinusoidal endotelial hücreler ne Weibel Palade body'leri içerirler nede P-selektinin transkripsiyonel olarak aktivasyonunu gerçekleştirirler^{123,124}. Sinüzoidlerde, selektine bağlı olarak nötrofillerin damar dışına çıkışı izlenmez¹¹⁶. Fakat bir çok nötrofil sinüzoidlerden damar dışına çıkmaktadır¹¹¹. Rat çalışmalarında, endotelial hücrelere lökosit adezyonundan temelde sorumlu olanın, P-selektin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca hepatik I/R zedelenmesinde, P-selektin antikorlarla yapılan tedavinin hasarı azalttığı ve yaşam süresini uzattığı da gösterilmiştir^{125,126}.

2.2.4.Proinflamatuvar ve Anti-inflamatuvar mediatörler:

Kompleman Sistemi: I/R sürecinde, özelliklede reperfüzyon fazında kompleman sisteminin aktive olduğu, hem deney hayvanı çalışmalarında hem de insan araştırmalarında gösterilmiştir^{127,128}. Reperfüzyon fazında, hücrede proteinlerin salınımına bağlı olarak kompleman sistemi hızla aktive olmaktadır. C_{5a} gibi kompleman faktörleri nötrofillerdeki Mac-1 reseptörlerine bağlanarak, nötrofillerin sinüzoidlerde toplanmasına yol açmaktadır^{129,130}. C_{5a}, nötrofilleri ve KC'leri ROS üretmek üzere uyarmaktadır¹²⁷. Ancak kompleman aktivasyonu, NF-κB aktivasyonunu ve hepatosit ve EC'den adezyon moleküllerin salınımını uyarmamaktadır¹²⁹. Aktive komplemanlar ayrıca bir araya toplanarak, membran atak kompleksi ve direk olarak hücre hasarı oluştururlar. Rat ve insan çalışmalarında reperfüzyon fazında karaciğerde kompleman

depolanması gösterilmiştir^{131,132}. I/R'da kompleman sistemi baskılandığında inflamatuvar yanıt, mikrodolaşım bozuklukları ve hücre hasarı azalmaktadır^{127,131,133}.

Sitokinler: Sitokinler I/R hasarının başlamasında, sürdürülmesinde ve şiddetinin belirlenmesinde kritik ve önemli roller oynamaktadırlar^{134,135}. Bu maddelerden en çok çalışılan ve bilinenler TNF- α , İL-1 ve İL-6'dır. Bu sitokinlerin belirgin pro-inflamatuvar aktiviteleri vardır, İL-6 ve İL-8 sentezini artırır ve anti-inflamatuvar özellikleri olan İL-10 salınımını da azaltır¹³⁶⁻¹³⁸. İL-8 potent bir nötrofil kemotaktik ve aktive edici faktördür ve I/R sürecinde nötrofil infiltrasyonuna paralel olarak ortamda bulunur¹⁴⁴. Adezyon moleküllerinin salınımı (β_2 -integrinler ve selektinler) lökosit-EC bağlanmasını uyarmaktadır. Bu faktörler, kemokin ve kompleman faktörleriyle beraber, PMNs'lerin toplanmasında ve ROS, TNF- α ve proteazların salınımıyla, iskemik hasarın sürdürülmesinde ve artırılmasında rol oynarlar¹³⁹. TNF- α lökosit kemotaksisini, aktivasyonunu ve KC'lerden ROS salınımını uyarmaktadır^{140,141}. İL-1 KC'lerden TNF- α sentezini, nötrofillerin toplanmasını ve ROS üretimini uyarmaktadır. I/R zedelenmesinde hem TNF- α hem de IL-1 seviyeleri artmaktadır. Bunların nötralizasyonunun I/R hasarının şiddetini azalttığı gösterilmiştir¹⁴²⁻¹⁴⁵.

2.2.5. Lipid Mediatörler:

Platelet aktive edici faktör (PAF), I/R endotel hücreleri tarafından oluşturulduğu rat çalışmalarında ve insanda gösterilmiştir. PAF nötrofilleri süperoksit üretmek için uyarmaktadır. Ayrıca PAF, β_2 integrinler MAC-1'in potent aktivatörüdür^{121,146-147}. Lökotrien B₄ (LTB₄), nötrofiller için potent kemotaktik faktördür. LTB₄ reperfüzyon fazında nötrofil aracılı hasarı uyarmaktadır. Ayrıca lipid peroksidasyon ürünleri de nötrofiller için kemotaktik faktördür¹⁴⁸⁻¹⁵⁰.

2.2.6. Hem Oksijenaz (HO) Sistemi

HO, hem molekülünü serbest demir, karbon monoksit (CO) ve biliverdin oluşturmak üzere parçalayan reaksiyonu katalizler ve hız kısıtlayıcı enzimdir. HO'nun oksidatif stress uyarılabilir HO-1 (Hsp 32 olarak da bilinir), yapısal HO-2 ve tam karakterize edilmemiş olan HO-3 olmak üzere üç izoenzimi vardır^{151,152}. Fizyolojik koşullarda başta beyin ve testisler olmak üzere dokularda bulunan temel izoform HO-2'dir. HO-1 ise dalak hariç fizyolojik koşullarda çok az aktiftir. HO-1 aktivasyonu inflamasyon, iskemi, hipoksi, hiperoksi, hipertermi ve radyasyon gibi hücresel stress durumlarında devreye giren en önemli koruyucu mekanizmalardan birisidir ve hücresel hasarda antioksidan/oksidan dengesini sağlamada kilit roller oynar. HO-1 over-ekspresyonu, oluşturduğu biliverdin, bilirubin, ferritin ve CO gibi ürünlerin gösterdiği anti-inflamatuar ve anti-apoptotik etkileriyle I/R zedelenmesinde güçlü bir hücre koruyucu olarak karşımıza çıkar¹⁵².

Hem hücrede, direk olarak lipid bariyeri, sitoskeletonu, ara metabolizmadaki enzimleri ve DNA'yı hasara uğratan bir maddedir. Ayrıca ROS sentezini de artırarak hasarı artırmaktadır. I/R zedelenmelerinde, reperfüzyon sırasında oluşan fazla miktarda ROS'a bağlı olarak, eritrosit (RBC) yıkımları atmakta ve sonuçta kan viskozitesinde artış ve kan akımına karşı rezistans ortaya çıkmaktadır. RBC yıkımları sonucunda ortaya çok miktarda hem ve zararlı demir şelatları çıkmakta ve bunlarda membran hasarı oluşturmaktadır. Serbest hem oluşumuna karşı, organizmanın bir çok defans mekanizması bulunmaktadır. Bunlardan birisi glikoprotein yapıda olan hemopeksin'dir (HPX). HPX hem molekülünü irreversible olarak bağlar ve retikuloendotelial sisteme (RES) gidip yıkılmasını sağlar. HPX verilmesinin I/R hasarını azalttığı gösterilmiştir¹⁵².

HO reaksiyonunun ürünleri I/R sürecinde koruyucudur. Biliverdin terapisi, endotel hücrelerinden adezyon moleküllerinin, proinflamatuvar sitokinlerin salınımını azaltarak ve anti-apoptotik yolun regülasyonunu yaparak, I/R sürecinde koruyucu etkiler göstermektedir. Biliverdinin, pro-inflamatuvar JNK/AP-1 sinyalini inhibe ettiği de gösterilmiştir¹⁵³⁻¹⁵⁶³. Biliverdin ve bilirubin, peroksil radikalının uzaklaştırılmasında da önemlidir¹⁵². Diğer hem yıkım ürünü olan CO'nin de çok önemli anti-inflamatuvar ve sitoprotektif etkileri vardır. CO mikrosirkülasyonun düzenlenmesinde önemlidir. CO'de NO'e benzer bir moleküldür ve sitoplazmik guanilat siklaza bağlanır. Aktivasyon sonunda siklik guanilat siklaz (cGMP) düzeyleri artar. Artan cGMP vazodilatasyon oluşturur ve platelet agregasyonunu inhibe eder¹⁵². Inhale CO, tedavivisinin erken pro-inflamatuvar gen ekspresyonunu ve nötrofil infiltrasyonunu azaltarak, karaciğer I/R ve transplantasyon modellerinde hasarı azalttığı gösterilmiştir^{157,158}. CO, anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik etkilerini p38 MAPK-sinyal yolunu modüle ederek göstermektedir¹⁵². Ayrıca eksojen CO TNF α , IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımını azaltmakta ve IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin salınımını artırmaktadır¹⁵².

2.2.7. I/R'da hücre ölümü

Reperfüzyon döneminde, hücre içi oksidan stress, eksternal sitotoksik mediatörler ve uzun süreli iskemiye bağlı olarak hücre ölümü gerçekleşir. Reperfüzyonda hepatosit ve EC ölümü, hücrelerde ve organellerinde şişme, hücre içeriğinin salınımı, eozinofili, karyolizis ve inflamasyonla karakterizedir¹⁵⁹. Bu morfolojik değişiklikler onkotik nekroz için karakteristiktir. Ancak son yıllarda hepatositlerin esas ölüm mekanizmasının apoptozis olduğu söylenmektedir. Bu hücrelerde

apoptozisin özellikleri olan küçülme, apoptotik partiküllerin oluşumu ve inflamasyon olmaması izlenir^{160,161}. Buna göre TUNEL çalışması (terminal deoxynukleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) reperfüzyon sonrası ilk 6 saatte hepatosit ve endotelial hücrelerde %50-80 ölüm olacağını söylemektedir^{160,161}.

2.3. Antioksidan sistemler ve Tioredoksin sistem

ROS oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar **"antioksidan savunma sistemleri"** veya kısaca **"antioksidanlar"** olarak bilinirler.

Antioksidanlar çözünürlüklerine göre **suda çözünenler (hidrofilik)** ve **yağda çözünenler (hidrofobik)** olmak üzere iki temel gruba ayrılabilir. Suda çözünenler genelde hücre sitoplazmasındaki ve plazmadaki oksidanlarla reaksiyona girerken, yağda çözünenler hücre membranını lipid peroksidasyonundan korumaktadır¹⁶². Bu maddeler insan vücudunda sentezlenebilir veya dışarıdan alınabilir¹⁶³.

En önemli sorulardan birisi bu çok farklı antioksidanlar arası ilişki nasıldır sorusudur. Tüm antioksidanlar hem birbirleriyle sinerjik hem de birbirlerinden bağımsız etki gösterirler^{164,165}.

2.3.1. Antioksidanlar etki mekanizmalarına göre 4 grupta toplanabilir¹²:

a. Toplayıcı etkili antioksidanlar: Serbest oksijen radikallerini tutar veya daha zayıf yeni moleküle çevirirler. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.

b. Bastırıcı etkili antioksidanlar: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip, onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltır veya inaktif şekle dönüştürürler. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

c. Zincir kırıcı etkili antioksidanlar: Serbest oksijen radikallerini bağlayarak, zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engellerler. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

d. Onarıcı etkili antioksidanlar: Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılmasını yaparlar.

2.3.2. Endojen antioksidanlar

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Enzim olan endojen antioksidanların başlıcaları SOD, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S-Transferazlar (GST), CAT, mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ve hidroperoksidaz olarak sayılabilir. Enzim olmayan endojen antioksidanlar ise, melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin ve albümin gibi moleküllerdir^{12,13,25,27,162-165}.

2.3.3. Eksojen antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler. Vitamin eksojen antioksidanlar α - tokoferol (vitamin E), β -karoten, askorbik asit (vitamin C) ve folik asittir^{12,13,25,27,162-165}.

İlaç olarak da kullanılan eksojen antioksidanlar ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten); NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, diphenyline iodonium), rekombinant süperoksit dismutaz, Trolox-C (vitamin E analogu); endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein); nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin); demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin); nötrofil adezyon inhibitörleri, sitokinler (TNF ve IL-1), barbitüratlar ve demir şelatörleridir^{12,13,25,27,162-165}.

Gıdalardaki eksojen antioksidanlara da butile hidroksitoluen (BHT), butile hidroksianizol (BHA), sodyum benzoat, etoksiquin, propilgalat ve Fe-süperoksit dismutaz örnek olarak verilebilir^{12,13,25,27,162-165}.

2.3.4. Başlıca antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1, EC-SOD) süperoksit serbest radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) H_2O_2 ve O_2 dönüşümünü katal $2 O_2^{\cdot-} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$,¹⁶⁷.

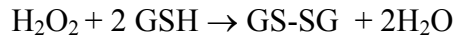
İnsanda SOD'un iki izomeri bulunmaktadır. **Cu-Zn SOD** sitozolde bulunur, Cu ve Zn içerir, dimerik yapıdadır, siyanidle inhibe edilir. **Mn SOD** mitokondride bulunur, Mn içerir, tetramerik yapıdadır, siyanidle inhibe olmaz. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD'dır^{166,168}.

SOD'un fizyolojik fonksiyonu hücreleri $O_2^{\cdot-}$ 'nin lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynar. SOD

aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku PaO₂ artışıyla artar. SOD'un ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür¹⁶⁶⁻¹⁶⁸.

Glutasyon sistem: Glutasyon sistem, glutasyon, glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz ve GST'den oluşmaktadır^{12,169}. Bu sistem hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda yer almaktadır¹⁶⁹.

GPx sitoplazmada bulunur, 4 selenyum atomu içerir ve tetramerik yapıdadır. GPx (glutasyon:H₂O₂ oksidoredüktaz, EC 1.11.1.9), H₂O₂ ve organik hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. İnsanlarda GPx'in 4 farklı izoenzimi bulunmuştur. GPx-1 en sık bulunandır ve H₂O₂'in efektif bir yok edicisidir. GPx-4 daha az bulunur ancak lipid hidroperoksidlerine karşı daha aktiftir^{12,170,171}.

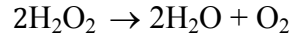


GPx'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GPx, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonunu yaparak, fagositik hücrelerin zarar görmesini önler. GPx eritrositlerde oksidatif strese karşı koruyan en etkili antioksidandır^{12,13,25}.

Glutasyon redüktaz, okside glutasyonun (GS-SG) tekrar redükte glutatyon (GSH) dönüşümünü katalize eder.

GST EC 2.5.1.18 kodlu ve her biri iki alt birimden oluşmuş bir enzim ailesidir. GST, başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı, selenyum-bağımsız GPx aktivitesi göstererek, bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar. Bunlar detoksifikasyon da yaparlar^{12,13,25,172,173}.

Katalaz (CAT): Katalaz (H_2O_2 : H_2O_2 oksidoredüktaz, EC 1.11.1.6) yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. CAT esas olarak peroksizomlarda daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. CAT H_2O_2 'yi suya ve oksijene parçalar. Demir veya manganezi kofaktör olarak kullanır^{12,13,25,174-176}.



Granulomatöz hücrelerde CAT, hücreyi kendi solunumsal patlamasına karşı koruma işlevini de görür. Hücrede oluşan H_2O_2 'yi, OH oluşumunu önlemek için ortadan kaldırır.

Mitokondriyal sitokrom oksidaz: Mitokondriyal sitokrom oksidaz solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksidi detoksifiye eder^{12,13,25}.

Vitamin C (askorbik asit): Askorbik asit tüm hayvan ve bitki hücrelerinde bulunan bir “monosakkrid antioksidandır”. İnsanda sentezi yoktur¹⁷⁷. $O_2^{\cdot-}$ ve $OH^{\cdot}$ ile reaksiyona girerek onları ortamdan temizler¹⁷⁸.

Askorbik asit antioksidan etkisinin yanında, oksidan etki de gösterir. Askorbik asit proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda H_2O_2 ile etkileşmeye ve $OH^{\cdot}$ oluşturmaya uygun ferro demire dönüştürür. Ancak bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü, yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği kaydedilmiştir.

Vitamin E (α -tokoferol): Vitamin E genel adı tokoferoller olan, yağda çözünen grubun üyesidir ve çok güçlü bir antioksidandır^{12,13,25,179,180}. Vitamin E, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Vitamin E, $O_2^{\cdot-}$ ve $OH^{\cdot}$, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Vitamin E zincir kırıcı

antioksidan olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonu, vitamin E vasıtasıyla sonlandırılabilir^{12,13,25,187,179-181}.

GPx ile vitamin E, serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. GPx oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırırken vitamin E peroksitlerin sentezini engeller.

Vitamin E selenyum metabolizmasında da önemli rol oynar. Vitamin E selenyumun organizmadan kaybını önleyerek veya onu aktif şekilde tutarak selenyum ihtiyacını azaltır.

Karotenoidler: Vitamin A'nın ön maddesi olan β -karotenin singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksit radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü saptanmıştır^{12,13,25}.

Melatonin (MLT): Melatonin en zararlı serbest radikal olan $OH^\bullet$ ortadan kaldıran, hücre membranı ve kan beyin bariyerini çok hızlı geçebilen, çok güçlü bir antioksidandır, günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir^{12,13,25,182,183}. Melatonin diğer antioksidanlardan farklı olarak, redoks döngüsüne girmez. Melatonin bir kere okside olduktan sonra bir daha redükte olamaz. Melatonin $OH^\bullet$ ile reaksiyona girdikten sonra, bir indolil katyon radikaline dönüşür ki bunun da ortamdaki $O_2^{\cdot-}$ 'i tutarak antioksidan aktivite gösterdiği kaydedilmiştir^{12,13,25,182,183}.

Glutatyon (GSH): Glutatyon (GSH) karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sentezlenebilen, sistein taşıyan bir tripeptittir^{12,13,25,184}. GSH çok önemli bir antioksidandır, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. GSH'ın antioksidan özelliği, sisteinin tiol gruplarından gelmektedir.

Hücrede GSH, glutatyon redüktaz sayesinde redükte formda tutulmaktadır. Hücrede redoks durumunun sabit tutulmasında santral rolü GSH oynar^{12,13,25,184}.

Ürat: Normal plazma konsantrasyonunda ürat, hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet oksijeni temizler. Fakat lipid radikalleri üzerine etkisi yoktur. Ayrıca vitamin C oksidasyonunu engelleyici etkisi vardır^{12,13,25}.

Bilirubin: Bilirubin, süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır^{12,13,25}.

Albümin: Albümin, LOOH ve HOCl toplayıcısıdır^{12,13,25}.

Seruloplazmin: Seruloplazmin olasılıkla SOD'a benzer mekanizmayla etki gösterir. Ferro demiri (Fe^{2+}) ferri demire (Fe^{3+}) yükseltgeyerek, Fenton reaksiyonunu ve böylece $OH\bullet$ oluşumunu inhibe eder^{12,13,25}.

Transferrin ve Laktoferrin: Transferrin ve laktoferrin dolaşımdaki serbest demiri bağlarlar^{12,13,25}.

Ferritin: Ferritin dokudaki demiri bağlar.

Sistein: Sistein süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.

Ebselen: Ebselen selenyumlu bir bileşiktir. GPx aktivitesini güçlendirir ve lipoksijenaz yolunu inhibe eder.

Sitokinler: Sitokinler başta CAT olmak üzere, antioksidan enzimleri aktive ederler. Ancak proteolitik enzimleri aktive ettiklerinden dolayı zararlı da olabilirler.

Demir şelatörleri: Demir şelatörleri hücre içine girerek, serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirirler, böylece Fenton reaksiyonunu ve sonuçta OH• oluşumunu inhibe ederler. Bu özelliklerinden dolayı reperfüzyonda kullanılmalarının faydalı olduğu kaydedilmiştir.

Desferroksamin: Desferroksamin serbest Fe³⁺ 'ü bağlar.

Oksipürinol: Oksipüranol allopürinolün metabolitidir, doğrudan OH• ve HOCl azaltıcı yönde etki eder.

Mannitol: Mannitol OH• toplayıcı etki gösterir.

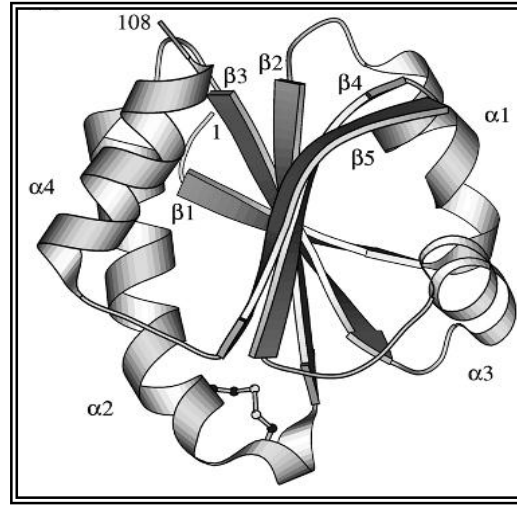
Probukol: Probukol kan kolesterolünü düşürmede kullanılır. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu kırıcı etkisi vardır.

Tiyoredoksin Sistem:

Hücresel düzeyde redüksiyon/oksidasyon (redox) dengesinin regülasyonu çeşitli antioksidan sistemlerle sağlanmaktadır. Bu sistemler içinde en önemlilerinden biri tiyoredoksin, glutaredoksin ve glutatyondan oluşan thiol sistemidir.

Trx ilk olarak 1964 yılında *E.coli*'de rionükleotid redüktaz için hidrojen vericisi olarak gösterilmiştir¹⁸⁵. Trx'ler molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 12 kDa olan ve *archaebacteria* grubundan insana kadar tüm yaşayan canlılarda karşımıza çıkan küçük proteinlerdir. Trx hücrelerde ribonükleotidlerin redüksiyonunda hidrojen vericisi olmak, fotosentetik enzim regülasyonu, ökaryotik hücrede transkripsiyon regülasyon faktörlerinin düzenlenmesi, kanserli hücre gelişiminde sinyal molekülü, ROS'ların yok edilmesi gibi görevler üstlenmektedir¹⁸⁶⁻¹⁹⁰.

Tiyoredoksinin yapısı: *Escherichia coli*'nin okside Trx yapısı (108 rezidü içeren protein), 1,68 Å⁰ çözünürlükle X-ray kristallografide gösterilmiştir¹⁹¹. Bu yapı Trx için referans yapıdır ve helikslerle sarılmış β-zincirlerden oluşan bir core'dan oluşmaktadır. Bu karışık β-tabaka yapısı beş zincir ve dönüş içerir. Trx 1-59 rezidüler arası βαβαβ , 76-108 rezidüler arası ββα yapısını ve bunları birleştiren 18 rezidülek uzun segment içerir. Şekil 8'de Trx'in yapısı izlenebilir.



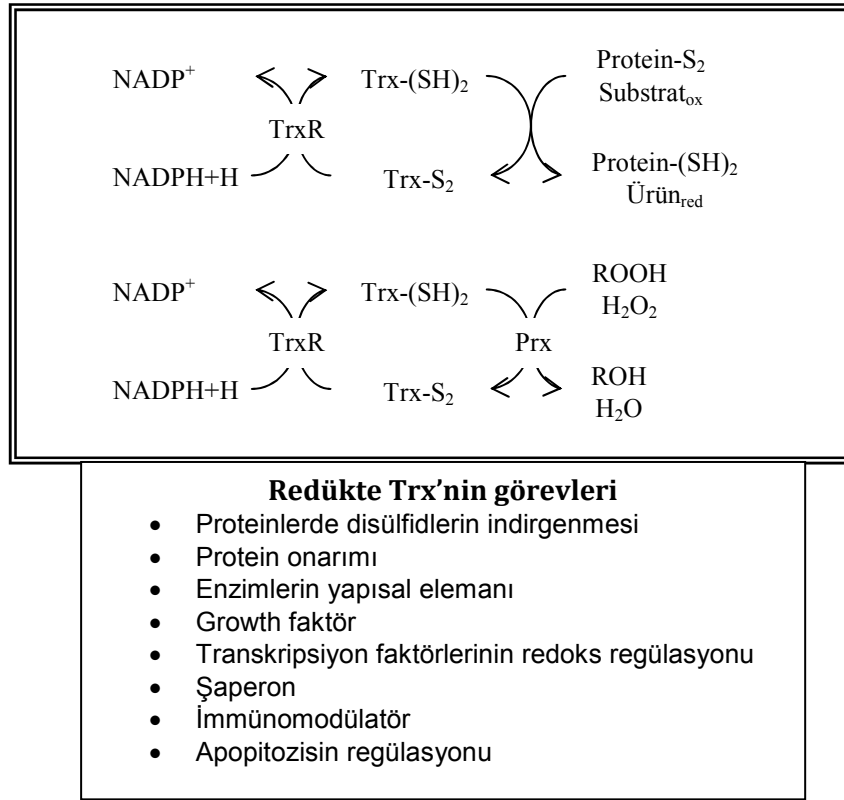
Şekil 8: Trx'in yapısı

İnsan Trx'i bir çok biyolojik süreçte aktif komponent olarak identifiye edilmiş ve sonradan Trx olarak tanımlanmıştır¹⁹²⁻¹⁹⁴. İnsan Trx'nin hem bir çok biyolojik fonksiyonu gören redükte formunun, hemde okside formunun kristal yapısı çalışılmıştır¹⁹⁵. Redükte Trx'nin aktif formu dimerik yapıdadır. Her bir monomer sistein kalıntıları içeren birbirine disülfid bağlarıyla bağlanmış iki monomerdan oluşur (aktif merkezde 3 sistein rezidüsü içerir)¹⁹⁵. Trx'de bulunan ve redoks aktif olan iki sisteinden (cys) (Trx-1-sitoplazmik- cys 32 ve cys 35), cys 35 yapıya gömülü olarak bulunurken, cys 32 açıkta yer alır. Ayrıca insan Trx'i 73. pozisyonda Trx'nin dimer oluşumu ve düzenleyici yollarla ilişkisi olabilecek ilave bir cys (cys73) içermektedir. Ancak memelilerde Trx-2 gibi (mitokondrial Trx)

ilave cys bulunmayan Trx'lerde bulunabilir. Trx-2 bakteriyel Trx'e Trx-1'e göre çok daha fazla benzerlik göstermektedir¹⁹⁶.

Tüm Trx'ler aktif merkezlerinde "Trx motifleri" (dithiol/disülfid aktif merkez motifi) adı verilen ve yapısında iki komşu sistein bulunduran Cys-X-X-Cys dizisini içermektedir¹⁹⁷. Bu dize β zincirin sonunda α -heliksin başlangıcında yer almaktadır^{198,199}. Trx'ler aktif merkezlerindeki Cys-Gly-Pro-Cys kalıntılarını kullanarak, disülfid bağlarının geri dönüşümlü redüksiyonunu yapmaktadır. Proteinin okside formu, tüm hücre tiplerinde bulunan NADP bağımlı sistemle redükte forma çevrilmektedir. Bu sistemde elektronlar okside Trx'e bir flavoprotein olan tiyoredoksin redüktazla (TrxR) NADPH'dan alınarak aktarılmaktadır¹⁹⁷. Redükte Trx major hücresel "**Protein disülfid redüktaz**"dır ve primer metabolizmadaki bir çok enzime elektron donörü olarak karşımıza çıkar. Ancak Trx'nin tüm fonksiyonu bu değildir ayrıca hücrede bir çok sistemin çalışmasına katılmaktadır. Şekil 9 'da TrxR'nin çalışma mekanizması ve kullanıldığı yerler izlenebilir.

GSH sisteminin aksine Trx sistemi hücrede çok daha düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır (GSH, 1-10 mM; Trx 1-10 μ M)²⁰⁰. Trx ve GSH'nun hücrenin korunmasındaki rolleri birbirinden farklıdır. GSH özellikle düşük redoks potansiyelinin ve serbest thiol seviyelerinin yükseltilmesinden; Trx ise sinyal iletimi ve gen regülasyonunda rol oynayan thiollerin redoks regülasyonundan sorumludur²⁰⁰. Trx'ler hücrede önemli biosentetik reaksiyonlarda kullanılan, hücrenin önemli biyolojik fonksiyonlarını regüle eden ve hücrede bir çok ayrı bölümde çeşitli izoformlarda karşımıza çıkan bir grup proteindir. Trx'ler TrxR'la beraber bir çok proteinin disülfid bağlarının indirgenmesine katılır ve bu sistem peroksitlerin indirgenmesinde kullanılan peroksidazlarıda (Prxs) içermektedir^{198,201-203}, Şekil.9.



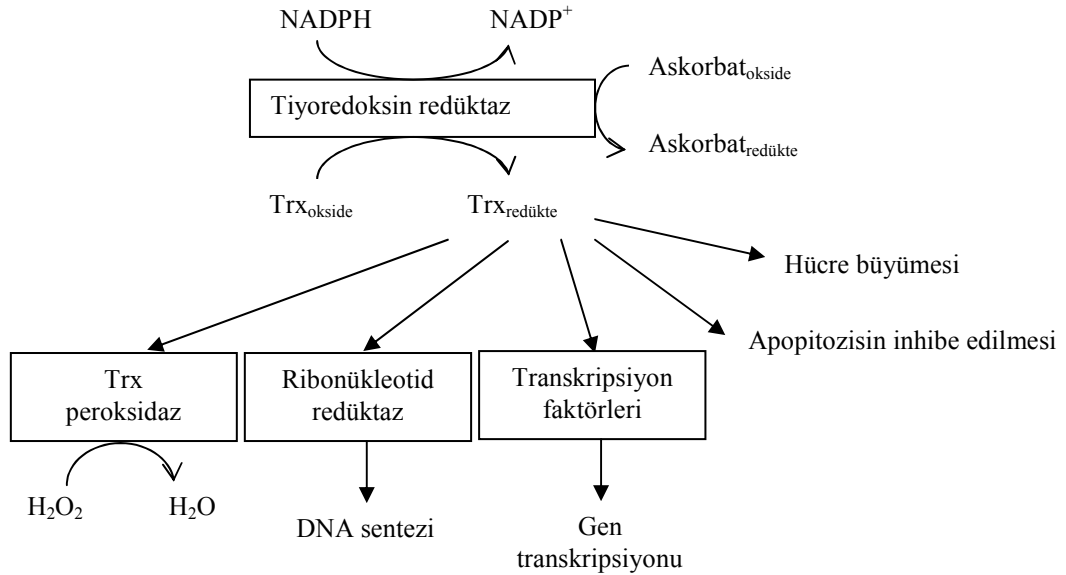
Şekil 9: Trx sistem ve görevleri. Bu şekil bize Trx enzimleriyle katalizlenen oksido-redüksiyon tepkimelerini özetlemektedir. TrxR NADPH'İ elektron kaynağı olarak kullanarak okside Trx'in (Trx-S₂) aktif merkezindeki disülfid bağını indirgemektedir. Redükte Trx'de (Trx-(SH)₂) protein/peptid disülfid bağlarının indirgenmesinde ve peroksiredoksinler (Prx) tarafından peroksidlerin indirgenmesinde elektron vericisi olarak rol oynar.

Trx'nin sitoplazma ve mitokondride yerleşmiş birbirinden farklı yapıda izoformları bulunmaktadır. Bu izoenzimlerin ifadesi, hücrel ve moleküler redoks ortamındaki değişiklikler ve çeşitli stres faktörleri tarafından değiştirilmektedir. Çeşitli çalışmalarda, Trx1'in ifadesinin astrositomlar gibi insan primer kanserlerinde ve tümör hücrelerinde arttığı gösterilmiştir. Trx yükselmesinin de, DNA sentezinin artışı, redoks aracılı transkripsiyon faktörlerinin uyarılması gibi mekanizmalarla kanser hücrelerinin gelişimini ve kemoterapiye karşı rezistansı artırdığı saptanmıştır²⁰⁴⁻²¹⁰. Mitokondrial izoenzim Trx2'de, enerji üretimi ve hücre yaşamı süresinin regülasyonunda önemli görevleri bulunmaktadır.

Thioredoxin Redüktaz: Tiyoredoksin redüktaz (TrxR) lipoamid dehidrogenaz, glutatyon redüktaz gibi piridin nükleotid-disülfid oksidoredüktaz sınıfı enzimlerin flavoprotein ailesindendir²¹¹. Bu ailenin tamamı homodimerik protein yapısındadır ve her bir monomer prostetik

grup olarak FAD, NADPH bağlanma bölgesi ve aktif merkezlerinde redoks aktif disülfid yapısı içerir²¹². Elektronlar NADPH'dan, FAD aracılığıyla TrxR'ın aktif merkezindeki disülfidlere aktarılırlar ve substratın redüksiyonunda kullanılırlar. İnsanda sitozolik Trx1/TrxR1 ve mitokondrial Trx2/TrxR2 olmak üzere iki izoenzimi bulunmaktadır. İnsan TrxR bir selenoenzimdir.

TrxR, okside Trx'in redüksiyonunu sağlayan yaklaşık olarak 10-12 kDa'luk, küçük ubikütöz redoks aktif peptittir. Aktif merkezinde –Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-lys- katalitik dizisini bulundurur ve iki sisteinin geri dönüşümlü oksidasyon/redüksiyonunu gerçekleştirmektedir²¹². TrxR'ın Trx'e ek olarak endojen substratları arasında, lipoik asit, lipid hidroperoksitler, sitotoksik peptid NK-lizin, vitamin K3, dehidroaskorbik asit, askorbil free radikaller ve tümör supresor protein p53 gösterilmiştir²¹². Şekil 10'da TrxR'ın substratları izlenebilir.

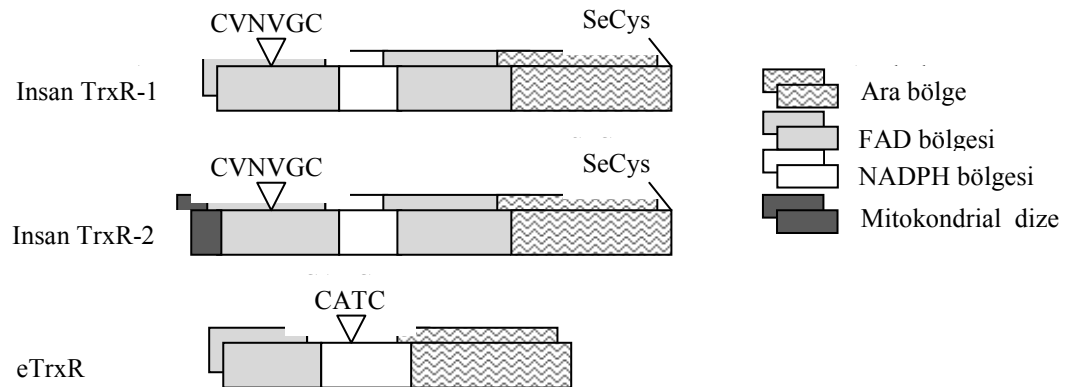


Şekil 10: Tiyoredoksin redüktazın substratları ve Tiyoredoksinin hücredeki fonksiyonları

İnsanda hücrelerde bulunan diğer thiol redoks sistemi glutatyon redüktaz/glutatyon sistemidir. Bu sistemde indirgeyici güçlerini NADPH'dan almaktadır. Bu iki sistem birbirine çok benzemesine rağmen,

glutasyon sistemi özellikle hücreyi ROS'lara ve elektrofilik maddelere karşı korumada daha önemlidir. Her iki sistemde piridin nükleotid-disülfid oksidoredüktaz grubundan, küçük redoks aktif peptidlerdir (Trx ve glutaroredoxin) ve thiol-disülfid değişimini yaparlar. Glutasyon redüktaz TrxR'dan farklı olarak sadece glutasyonu redükler ve redükte glutasyonun hücre içi düzeyleri Trx'e göre çok daha yüksektir²¹².

İnsan TrxR'ının katalitik bölgesinde –Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys- dizesi yer almaktadır. Bu dize hem TrxR1 de hem de TrxR2'de enzimin FAD bölgesine yerleşmiştir. Fakat *Escherichia coli*'nin TrxR'ının katalitik dizesi –Cys-Ala-Thr-Cys- NADPH bölgesinde yer alır. İnsan TrxR'ının monomerik biriminin moleküler ağırlığı yaklaşık 55 kDa civarındayken, bu değer bakteriyel TrxR'larda 35 kDa civarındadır. TrxR'lar küçük TrxR (35 kDa) ve büyük TrxR (55 kDa) olarak sınıflanmaktadır. Büyük TrxR'larda ilave bir C-terminal redoks merkezi bulunmaktadır. Bu merkez sisteinlerden indirgeyici ekivalanları alır ve final substrata iletir. TrxR1, C-terminalinde selenosistein rezidüsüne sahiptir ve bu rezidü katalitik aktivite için gereklidir. İnsan TrxR1 Sec varlığında peroksinitrit ve lipid hidroperoksitleri redükleme kapasitesine sahiptir²¹². Şekil 11'de Trx'lerin yapısı izlenmektedir.



Şekil 11: İnsan TrxR-1, TrxR-2 ve E.coli TrxR'nin yapısının karşılaştırılması.

Tiyoredoksin Redüktaz sisteminin fonksiyonları: Trx sistemi insanda ribonükleotid redüktaz ve tiyoredoksin peroksidaz gibi enzimlere redükleyici ekivalanları sağlar. Bazı transkripsiyon faktörlerinin cys kalıntılarını indirgeyerek, DNA'ya bağlanmasını artırır. Gen transkripsiyonunu değiştirir. Ayrıca glukokortikoid gibi bazı steroid reseptörlerinin, androjen reseptörlerinin, NF-κB ve AP1 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktive edimesini sağlar²¹².

Hücre gelişimi üzerine etkileri: Trx sisteminin hücre gelişimi ve apoptozisin önlenmesinde önemli görevleri bulunmaktadır. Bu sistemi uyaran Trx'in indirgenmiş formudur. Bu nedenden dolayı Trx'in indirgenmesini sağlayan TrxR büyümenin regülasyonunda kilit rolü oynamaktadır. Hücre kültürlerinde Se'un TrxR aktivitesini bir kaç kat artırdığı gösterilmiştir. Artmış TrxR aktivitesinin, hücre büyümesini artırıcı etkileri net bir şekilde ortaya konmamış olsa da TrxR aktivitesinin inhibisyonunun hücre büyümesini inhibe ettiği net bir şekilde gösterilmiştir.

P53 aktivitesine etkileri: p53 bir çok tümörde saptanan bir tümör-baskılayıcı protein ve transkripsiyon faktörüdür. İnsanda olduğu gibi normal p53 geni olan *Schizosaccharomyces pombe* mayasında güçlü bir gelişme geriliği görülmektedir. Bunun tesbitinden sonra p53 geninin normal aktivitesi için gerekli olanlar incelenince, p53 parsiyel rezistansı olanlarda TrxR kodlayan *trr1* geninde mutasyon olduğu izlenmiştir²¹²⁻²¹⁴. *trr1* fonksiyonunda kayıp olan mutant mayalarda H₂O₂'in ve atmosferdeki %100 oksijenin zararlı etkilerine artmış duyarlılık olduğu tesbit edilmiştir. İnsanda TrxR'ın p53 geni üzerinde benzer etkileri olup olmadığı net olarak gösterilememiştir. Bununla beraber oksidasyon ürünlerinin arttığı durumlarda, p53 geninin DNA'ya bağlanma yeteneğinin değiştiği gösterilmiştir. Ayrıca p53 gen ifadesi, TrxR gibi redoks genlerinin ifadesinden de etkilenmektedir²⁰⁰.

Oksidatif strese karşı koruma: Düşük düzeyde ROS üretimi, normal oksidatif metabolizma sırasında karşımıza çıkmaktadır. Ancak, koruyucu sistemlerin kapasitelerini aşacak miktarda ROS üretilmesi protein tiollerinin oksidasyonuna ve onarılamayacak düzeyde makromoleküllerde hasar oluşmasına, buna bağlı olarak da apoptozis gibi patolojik proseslerin başlamasına yol açmaktadır. Trx, ROS artışına bağlı apoptozise karşı hücreleri korumaktadır. TrxR ve Trx, mRNA'larının yeni doğan maymunlarda havayla temas veya O₂ alımı sonucu arttığı gösterilmiştir. Ayrıca adult maymunlarda da %95'lik O₂'nin solunmasına bağlı olarak da artış oluşmaktadır. Bu artmış gen ifadesi bize, insanda TrxR1 ve Trx'in, O₂ solunması sonucu oluşacak ROS üretimine karşı koruyucu olduğunu göstermektedir.

Glutareredoksin ve glutatyon gibi tiyoredoksin sistemde, oksidatif stresle inaktive olmuş proteinleri, yenileme yeteneğindedir ve bu fonksiyona katkısı %50'den fazladır. Örneğin ROS ürünleriyle oksitlenmiş gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enziminin, tiol gruplarını redükleyebilir. Ayrıca dehidroaskorbatı askorbata çevirebilir²¹⁵⁻²¹⁸.

Farklı özelliklerinden ve singlet oksijeni baskılama ve hidroksil radikallerini temizleme kapasitelerinden dolayı Trx'ler, önemli antioksidan proteinler olarak kabul edilirler. Trx1 sitoplazma ve çekirdekte yer alır. Trx2 mitokondrialdır ve özellikle beyinde ROS üretimiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir²¹⁸. Trx transgenik farelerde iskemik hasara, diabete, akut akciğer yetmezliğine ve çevresel toksisiteye artmış duyarlılık saptanmıştır. Trx, oksidatif stres hasarına bağlı hastalıklara karşı da koruyucu görülmektedir²¹⁸. TrxR'nin selenosistein grubu, H₂O₂ için bir sensör gibi görev görür ve oksidatif stresi önleyen proteinlerin ekspresyonunu başlatır²¹⁷. Yüksek TrxR2 aktivitesinin insan embriyonik böbrek hücrelerini, antimisin A (elektron transport zinciri kompleks III inhibitörü) inhibisyonunun yarattığı toksisiteye karşı koruduğu

gösterilmiştir. Bu etki TrxR2 ve/veya Trx2'nin aşırı eksprese edildiği fare maymun ve insanlarda gösterilmiştir²¹⁸.

Askorbat geri-dönüşümü: İnsanda askorbat sentezi olmadığı için, hücre için önemli bir antioksidan olan askorbatın diyetle alımı veya okside formu olan dehidroaskorbik asidin veya askorbil free radikallerin tekrara kullanılabilir hale getirilmesi, hücre içi askorbat seviyelerinin devamı için oldukça önemlidir. Se'dan yoksun beslenen ratlarda hücre içi glutatayon seviyeleri değişmeden glutatyon redüktaz, TrxR ve askorbat seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. TrxR'ın askorbil free radikallerin tekrar askorbat haline dönüşümünde önemli olduğu da gösterilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER:

Bu tez çalışması Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı, Gazi Üniversitesi Hayvan Laboratuvarı, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı ve Ankara Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBE-01-2005-68 nolu proje numarası ile desteklenmiştir. Çalışma için Gazi Üniversitesi Etik Kurulundan izin alınmıştır.

3.1. Deney hayvanları ve cerrahi yöntem

Bu çalışmada 235-270 g ağırlığında 50 erkek Wistar rat kullanıldı. Ratlar çalışma zamanına kadar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortam döngüsüyle bekletildi ve bu sürede standart rat besini ve suyla beslendi. Tüm ratlar cerrahi öncesi 12 saat aç bırakıldı. Ratlar anestetik madde olarak, vücut ağırlığına göre 100 mg/kg ketamin (Bodyweight, BW) ve 10 mg/kg ksilazin intraperitoneal uygulanarak uyutuldu. Hayvanlara sternumdan pubise uzanan bir orta hat kesisi yapıldı. Ortalama arteriyal kan basıncının izlenmesi için, sağ femoral artere kanül yerleştirildi. İlaç infüzyonu için, portal ven yoluyla ileaçekal vene polietilen katater (PE-50, ID 0.28, OD 0.61; Portex, Hyte, UK) yerleştirildi. Retraktörler flank bölgesine yerleştirilerek, karaciğer expoze edildi. Karaciğer ve diafragma arasındaki ligament kesilerek karaciğer serbestleştirildi. Splanknik konjesyondan korumak için kısmi karaciğer iskemisi uygulandı. Kısmi karaciğer iskemisi için, sol lateral ve median lobları besleyen hepatik arter ve portal ven atravmatik vasküler klemple (Harvard Apparatus INC, Holliston, MA, USA) 60 dakika klemlendi. Daha sonra klempler açılarak 2 saat reperfüzyon yapıldı. Vücut sıvıları karaciğeri etkilemesin diye tüm abdominal kavite steril gazlı bezle kaplandı.

3.2. Deney grupları

Ratlar çalışma protokolüne göre 5 gruba ayrıldı.

Sham grubu (n=10): Hayvanlara anestezi ve laparotomi uygulandı.

Kontrol (I/R) grubu (n=10): 60 dakikalık parsiyel iskemiye takiben reperfüzyon yapıldı. Reperfüzyonun hemen başında portal venden 10 dakika içinde 1ml fosfat buffer içinde tuz solusyonu verildi.

Tiyoredoksin (Trx) grubu (n=10): 60 dakikalık parsiyel iskemiye takiben reperfüzyon yapıldı. Reperfüzyonun hemen başında portal venden 10 dakika içinde rekombinat tiyoredoksin (10 mg/kg) (Promega Corporation, WI, USA) verildi.

N-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) grubu (n=10): 60 dakikalık parsiyel iskemiye takiben reperfüzyon yapıldı. Reperfüzyonun hemen başında portal venden 10 dakika içinde L-NAME (10 mg/kg) verildi.

Trx ve L-NAME grubu (n=10): 60 dakikalık parsiyel iskemiye takiben reperfüzyon yapıldı. Reperfüzyonun hemen başında portal venden 10 dakika içinde L-NAME (10 mg/kg) ve rekombinant tiyoredoksin (10 mg/kg) verildi.

L-NAME hazırlanması: 100 mg L-NAME 40 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi içinde çözüldü.

Trx hazırlanması: 50 mM Tris-HCL (pH=7.5), 1 mM EDTA içeren 40 ml solüsyonda çözüldü. Konsantrasyonu 280 nm'de absorbans katsayısına (molar absorbtivite) $E^{0.1\%} = 1.171$ (1.171 1 mg/ml solüsyon için) göre değerlendirildi.

3.3. Kullanılan aletler:

Hassas terazi (Schimadzu, Libror, AEG 220)

Homojenizatör (IKA T10 Ultra-Terra X)

Vorteks (Stuart vorteks karıştırıcı)

Benmari (Nüve NB5 bath ve Nüve ST 402 su su banyosu)

Santrifüj (Nüve, NF800)

Soğutmalı santrifüj (Nüve, NF800R)

Spektrofotometre (Schimadzu, UV1601)

pH metre (Jenway)

Orbital Karıştırıcı

Eliza okuyucu ve yıkayıcı

Tam otomatik eliza sistemi (DiaSorin Etimax 3000 mikroeliza cihazı)

Otoanalizör (Konelab 60i, Thermo Scientific)

Örnekleri azot gazı ile uçurmak için VLM EC1

Socorex Swiss mikropipet 20µl -200µl

Socorex Swiss mikropipet 100µl -1000µl

3.3. Yöntemlerin uygulanması:

3.3.1. Serum örneklerinin hazırlanması:

I/R sonrası 2. saatte ratlar sakrifiye edildi. Sakrifikasyonu takiben hızla, 0.5 gr sol hepatik lobdan doku örneği ve portal venden 4ml kan örneği alındı. Sham grupları da aynı zamanlarda sakrifiye edildi.

Ratlardan alınan kan örnekleri, 10 ml'lik jelli vakumlu tüplere ve EDTA'lı tüplere aktarıldı. Alınan kan örnekleri +4 °C'de 1600 x g'de 15 dakika santrifüjlendi. Elde edilen serum örneklerinin yaklaşık 500-1000 µl'lik kısım ayrılarak bekletilmeden biyokimya testleri için çalışmaya alındı. Geri kalan serum örnekleri P-selektin ve nitrik oksid çalışmaları için, sırasıyla 100 µl ve 200 µl olmak üzere ayrı ayrı tüplere konularak, çalışma zamanına kadar -80 °C'de saklandı. EDTA'lı örnekler, EDTA'lı tüplerden santrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerine 0.6 TIU/ml kan olacak şekilde aprotinin eklendi. Örnekler +4 °C'de 1600 x g'de 15 dakika santrifüjlendi ve elde edilen plazma örnekleri çalışma zamanına kadar -80 °C'de saklandı.

1 TIU (Tripsin inhibitör ünitesi) = 1025-1300 KIU (Kallikrein inhibitör ünitesi)

3.3.2.Hepatik doku kan akımı:

Hepatik doku kan akımı (hepatic tissue blood flow, HTBF) lazer-doppler flowmetre (Periflux 5000; Perimed, Stockholm, Sweden) kullanılarak iskemiden önce, iskeminin 5, 15 ve 45. dakikalarında ve iskemi sonrası 5, 15, 30 ve 60. dakikalarda ölçüldü. Her bir ölçüm zamanında değişik loblardan (segment II-IV) elde edilen 3 değerlerin ortalaması hesaplandı. Yöntem ışık üreten bir lazer diyotun (780 nm dalga boyu ve minimum emisyon enerjisi 1.0 mW) dokuya batırılması ve ışığın hücrelerde dolaşan kandan yansıtılarak ölçülmesi ilkesiyle çalışır. Analog lazer doplerin akım sinyalleri dijitalize edildi ve stabil sinyal elde edildikten

sonra 30 sn kayıt yapıldı. Puls wawe analizden elde edilen datalar area under curve olarak değerlendirildi. HTBF arbitrary unit (AU) olarak ifade edilir²¹⁹.

3.3.3. Biyokimyasal testlerin ölçülmesi:

Biyokimyasal parametreler olan üre, kreatinin, alkalen fosfataz (ALP), aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), γ -glutamilttransferaz (GGT), laktat dehidrogenaz (LDH) ve direk ve total bilirubin Konelab 60i otoanalizöründe (LabSystems Clinical Laboratory Division, Espoo, Finland), orijinal kitleri olan Thermo Fischer Scientific (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland) kitlerle çalışıldı. Günler arası ve çalışmalar arası varyasyonları engellemek için çalışma aynı gün ve aynı seride gerçekleştirildi.

3.3.4. Nitrik Oksit (NO) ölçümü:

Serum NO düzeylerinin ölçümü Stressgen's StressXpress® NO (total) kiti (katalog no:EKS-310) ile gerçekleştirildi. Bu yöntemde önce nitrat redüktaz enzimiyle nitrat nitrite çevrildi ve edilen nitriti azo boyası ile renklendirilerek (Griess Reaksiyonu) 540 nm'de absorbansı ölçüldü.

Yöntemin uygulanması:

1. 1.kuyucuğa 200 μ l reaksiyon tamponu kör olarak pipetlendi
2. Takip eden 6 kuyucuğa (2-7. Kuyucuklar) 6 standart sırasıyla 25 μ l pipetlendi
3. 8. Kuyucuğa 50 μ l reaksiyon tamponu 0 standart olarak pipetlendi
4. 50 μ l serum örnekleri pipetlendi

5. 25 µl önceden hazırlanan NADPH, kör hariç tüm kuyulara pipetlendi
6. 25 µl önceden hazırlanan nitrat redüktaz kör hariç tüm kuyulara pipetlendi
7. Örneklerin iyice karışması sağlanarak 37 °C'de 30 dak inkübe edildi
8. 50 µl Griess reaktif-I kör hariç tüm kuyulara pipetlendi
9. 50 µl Griess reaktif-II kör hariç tüm kuyulara pipetlendi
10. İyice karıştırdık ve 10 dak oda ısısında inkübe edildi
11. Optik dansiteleri (OD) eliza okuyucuda 540 nm dalga boylarında köre karşı okundu
12. Standartlar ve örneklerden elde edilen OD değerlerinden 0 standardının OD değerini çıkartılarak net OD değerleri hesaplandı.
13. Standartların net OD değerleri ve konsantrasyonlarıyla standart eğri oluşturuldu ve örneklerin konsantrasyonları değerlendirildi

3.3.5. P-Selektin Eliza ölçümü:

Serum P-Selektin çalışması Eliza (enzyme-linked immunosorbent assay) kitiyle (Diacclone Research, Codex, Fransa) gerçekleştirildi.

Yöntemin uygulanması:

1. Tüm kuyucuklar yıkama solüsyonuyla iki kez yıkandı

2. Standartların pipetleneceği kuyucuklara 100 µl çalışma tamponu koyuldu
3. ilk kuyucuğa 100 µl P-Selektin standardı pipetlendi. Elde edilen karışımdan her seferinde 100 µl bir sonraki kuyucuğa aktarılarak 140-2.19 ng/ml'lik standartlar elde edildi (toplam 7 standart).
4. 100 µl çalışma tamponu kr olarak pipetlendi
5. 90 µl sample buffer örneklerin konacağı tüm kuyucuklara pipetlendi
6. 10 µl serum örneklerin sırasıyla kuyucuklara pipetlendi
7. HRP-konjugat 1/100 oranında çalışma tamponu ile dilüe ederek hazırlandı.
8. 50 µl HRP-konjugat tüm kuyucuklara pipetlendi
9. 2 saat oda ısısında inkübe edildi
10. 3 kez yıkama solsyonula yıkandı
11. TMB substrat solüsyonu kullanımdan 5 dak önce hazırlandı ve 100 µl TMB substrat solüsyonu kr dahil tüm kuyulara pipetlendi
12. 15 dak oda ısısında inkübe edildi
13. 100 µl stop solüsyonun kr dahil tüm kuyulara pipetlendi
14. Oluşan renk şiddeti eliza okuyucuda 450 nm'de okundu.

3.3.6. Endotelin-1 ölçümü:

Plazma endotelin-1 seviyelerinin ölçümünde Endotelin-1 enzim immünassay (EIA) (Phoneix Pharmaceuical, CA, USA) kiti kullanıldı.

Yöntemin uygulanması:

1. Alınan plazma örneklerini eşit miktarda buffer A ile karıştırıldı ve 10000 x g'de +4 °C'de 20 dakika santrifüjlendi.
2. Elde edilen süpernatant, 200 mg C18 taşıyan SEP-COLUMN'dan önce buffer A (3 ml, 3 kez) sonra buffer B (1 ml, 1 kez) ile yıkanarak geçirildi.
3. Elde edilen örnek azot gazı altında uçuruldu.
4. İlk kuyucuk kör olarak boş bırakıldı.
5. 2. Kuyucuğa 50 µl çalışma tamponu total bağlanma olarak, sonra sırasıyla hazırlanan 5 standart, rehidrate edilmiş pozitif kontrol ve serum örnekleri 50 µl olacak şekilde pipetlendi.
6. 25 µl rehidrate edilmiş primer antiserumu kör hariç tüm kuyucuklara pipetlendi
7. 25 µl rehidrate edilmiş biotinlenmiş peptit kör hariç tüm kuyucuklara pipetlendi
8. Plate'in üzeri asetat plak örtücüyle (APS) örtülerek orbital karıştırıcıda 300-400 rpm'de oda ısısında 2 saat inkübe edildi.

9. Kuyucuklar boşaltıldı ve 350 µl çalışma tamponula 4 kez yıkandı
10. 100 µl SA-HRP solüsyonu her bir kuyucuğa eklendi
11. APS ile kapatılarak orbital karıştırıcıda 300-400 rpm'de oda ısısında 1 saat inkübe edildi.
12. 4 kez çalışma tamponu ile yıkandı.
13. 100 µl TMB substrat eklendi. APS ile üzerini kapatıldı ve oda ısısında ışıktan korunarak 1 saat inkübe edildi.
14. Her bir kuyucuğa stop solüsyon olarak 100 µl 2N HCl pipetlendi
15. Plak mikroeliza okuyucuda 450 nm'de OD'si okundu.

3.3.7. Lowry doku protein ölçümü:

Kullanılan reaktifler:

- %2'lik Na_2CO_3 içinde 0.1 N'lik NaOH (A1)
- %2'lik Na-K tartarat (B1)
- %1'lik CuSO_4 (B2)
- Folin ciocalteu's fenol reaktifi

Standart olarak 1 mg/ml bovin serum albumin (BSA) kullanıldı.

C solüsyonu: 0.5 ml B1 + 0.5 ml B2 + 16.5 ml A1

Folin reaktifi (F.c.): 1 hacim F.c. + 1 hacim distile su

Tablo 2. Lowry doku protein ölçümünün yapılışı

	BSA	Distile su	C solüsyonu
Kör	-	100 µl	2 ml
Standart-1	20 µl	80 µl	2 ml
Standart-2	20 µl	80 µl	2 ml
Numune	20 µl	80 µl	2 ml

Numuneler vortekslenip 15 dak beklendi. Daha sonra numunelere 200 µl folin reaktifi eklenip, iyice vortekslendi ve 1 saat karanlıkta bekletildi. Tüpleri 750 nm’de köre karşı okundu ve elde edilen absorbans değerleriyle sonuçlar hesaplandı.

$$\text{Protein miktarı} = \frac{\text{Numune absorbansı}}{\text{Standart absorbansı}} \times \text{Standart konsantrasyonu}$$

Çalışmamız sırasında dokuda ölçtüğümüz tüm değerleri doku proteinine bölerek mgr doku cinsinden ifade ettik.

3.3.8. Doku Süperoksid Dismutaz Ölçümü:

Doku SOD ölçümlerinde Oxford Biomedical Reserch’e (Oxford, MI, USA) ait (Ürün No: FR10) fotometrik kiti kullanıldı. Kiti Konelab 60i otoanalizöre aplike edildi ve çalışıldı. Elde edilen değerler doku proteinine bölünerek U/mg Doku olarak ifade edildi.

Doku örneklerinin hazırlanması:

1. Karaciğer dokusunu eritrositleri uzaklaştırmak için 0.16 mg/ml’lik heparin içeren % 0.9 NaCl ile yıkandı.

2. 8 g NaCl, 1,15 g Na₂HPO₄, 0.2 g KCl, 0.2 g KH₂PO₄'ı deiyonize su ile eritildi ve 1 litreye tamamlandı. pH'ı 7.28-7.60 arasında ayarlanarak fosfat tampon (PBS buffer) hazırlandı

3. Yıkama sonrası doku örnekleri yaklaşık 1/10 PBS buffer ile buzlu ortamda homojenize edildi.

4. Elde edilen homojenatlar 15.000 rpm'de +4 °C'de 15 dakika santrifüjlendi ve süpernatant alınarak çalışma gerçekleşene kadar -80 °C'de saklandı.

Yöntemin cihaza aplikasyonu:

Test tipi: Fotometrik

Örnek tipi: Serum, plazma, doku homejenatı

Tablo 3. SOD cihaz aplikasyonu

	Örnek	Kör
SOD Buffer	200 µl	200 µl
Örnek	10 µl	-
Su	-	10 µl
Karıştırma		
Kör okuma		
SOD Reaktif 2	7 µl	7 µl
Karıştırma		
İnkübasyon 60 saniye		
SOD Reaktif 1	7 µl	7 µl
Karıştırma		
510 nm'de her 3 dakika boyunca 54 saniyede bir toplam 4 okuma yapıldı		

SOD reaktif 1: HCl içeren dietilentriaminopentaasetikasit ve ethanol içinde 5,6,6a,11b-tetrahidro-3,9,10-trihidroksibenzo fluren.

SOD reaktif 2: HCl içinde 1-metil 2-vinilpiridinium trifluorometansülfonat

SOD Buffer: Borik asit ve DTPA içeren 2-amino 2-metil-1,3-propanediol

Hesaplama:

V_c = 5 Kör okumasından elde edilen ortalama absorbans

V_s = Örneğin 4 okumadan elde edilen Δ absorbansların ortalaması

SOD aktivitesini aşağıdaki fomüle göre hesapladık:

$$SOD = \frac{0.93 \times \left(\frac{V_s}{V_c} - 1 \right)}{1.073 - 0.073 \times \left(\frac{V_s}{V_c} \right)}$$

Elde edilen SOD aktivitesi SOD'un tipinden (Cu/Zn SOD, Mn SOD, Fe SOD) bağımsızdır.

3.3.9 Doku Total Glutasyon ölçümü:

Doku tGSH ölçümlerinde Oxford Biomedical Reserch'e ait (Oxford, MI, USA) (Ürün No: GT 20) fotometrik kiti kullanıldı. Kiti Konelab 60i otoanalizöre aplike edildi ve çalışıldı. Elde edilen değerler doku proteinine bölünerek µg/mg Doku olarak ifade edildi.

Doku örneklerinin hazırlanması:

1. Doku örneklerin 1 kez PBS buffer'la yıkandı
2. Örnekler filtre kağıdında kuruldu

3. Doku örnekleri 1/10 oranında %5'lik metafosforik asit (MPA) ile buzlu ortamda homojenize edildi.
4. Elde edilen homojenat 3000 x g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüjlendi
5. Süpernatant ayırarak çalışma gerçekleşene kadar -80 °C'de saklandı.

Yöntemin cihaza aplikasyonu:

Test tipi: Fotometrik

Örnek tipi: Serum, plazma, doku homejenatı

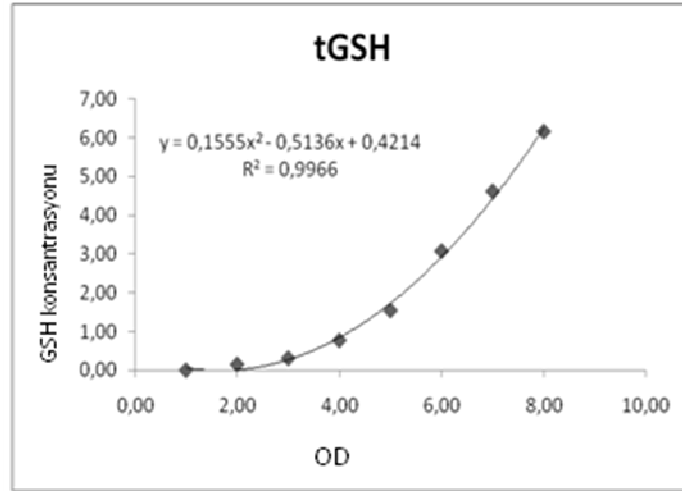
Tablo 4. tGSH cihaz aplikasyonu

	Örnek	Kör	Standart
Reaktif-1 (DTNB)	50 µl	50 µl	50 µl
Reaktif-2 (GSH oksidoredüktaz)	50 µl	50 µl	50 µl
Örnek	50 µl	-	-
Distile su	-	50 µl	-
Standart	-	-	50 µl
Karıştır			
İnkübasyon 450 saniye			
Reaktif-3 (NADPH)	50 µl	50 µl	50 µl
Karıştır			
405 nm'de 240 saniye bounca her 54 saniyede bir toplam 5 kez okuma			

Reaktif-1: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoik asid) (DTNB)

Reaktif-2: Glutasyon oksidoredüktaz

Reaktif-3: β-NADPH₂



Grafik 1. tGSH standart eğrisi ve regresyon denklemi

Sonuçların hesaplanması: Sonuçların hesaplanmasında standartların ve her bir örneğin mean V değerleri [Mean V = (4 dakikadaki OD değişimleri - 0. Dak OD değeri) / 4] hesaplandı. Standartların mean V değerleriyle glutatyon konsantrasyonları arasındaki standart eğri çizildi. Elde ettiğimiz regresyon denklemine göre örneklerin glutatyon değerleri hesaplandı.

3.3.10. Doku Glutatyon Peroksidaz ölçümü:

Doku GPx ölçümlerinde Oxford Biomedical Reserch'e (Oxford, MI, USA) ait (Ürün No: GT 20) fotometrik kiti kullanıldı. Kiti Konelab 60i otoanalizöre applike edildi ve çalışıldı. Elde edilen değerler doku proteinine bölünerek mIU/mg Doku olarak ifade edildi.

Doku örneklerinin hazırlanması:

1. Homojenizasyonda kullanılacak olan buffer üreticinin önerisiyle kullanımdan hemen önce hazırlandı
2. Karaciğer dokusundan eritrositleri uzaklaştırmak için 0.16 mg/ml'lik heparin içeren % 0.9 NaCl ile yıkandı.

3. Doku örnekleri 1/10 5 mM EDTA ve 1 mM 2-mercaptoetanol içeren 50 mM TRIS-HCl, pH 7.5'lik soğuk tamponla homojenize edildi.
4. 10000 x g'de 15 dakika +4 °C'de santrijüldü
5. Süpernatant alınarak çalışmaya kadar – 80 °C'de saklandı.

Yöntemin cihaza uygulaması:

Test tipi: Fotometrik

Örnek tipi: Serum, plazma, doku homojenatı

Tablo 5. GPx cihaz uygulaması

	<i>Örnek</i>	<i>Kör</i>
GPx Buffer	50 µl	-
GPx Reaktif-1	50 µl	-
Su	-	10 µl
Örnek	10 µl	-
GPx Reaktif-2	50 µl	-
Karıştırma		
Kör okuma		
340 nm'de her 3 dakika boyunca 54 saniyede bir toplam 4 okuma		

GPx Buffer: pH 7.6

GPx Reaktif-1: redükte NADPH, Glutasyon ve glutasyon redüktaz

GPx Reaktif-2: %70 tert-Butyl Hidroperoksit

Sonuçların değerlendirilmesi:

1. Ortalama dakikadaki A₃₄₀ azalması hesaplandı

2. A_{340}/min değeri kullanılarak aşağıdaki formülle NADPH tüketimine göre hesaplama yapıldı:

$$1 \text{ mU/ml} = 1 \text{ nmol NADPH/min/ml} = (A_{340}/\text{min}) / 0.00622$$

3. Dilüsyon düzeltmesi yapıldı. Çalışmada örnek 16 kat dilüe edildi ($70 \mu\text{l} \rightarrow 1120 \mu\text{l}$). Çıkan sonuçlar 16'la çarpılarak hesaplandı.

3.3.11. Lipid Peroksidasyon Ürünleri (MDA ve HAE) ölçümü:

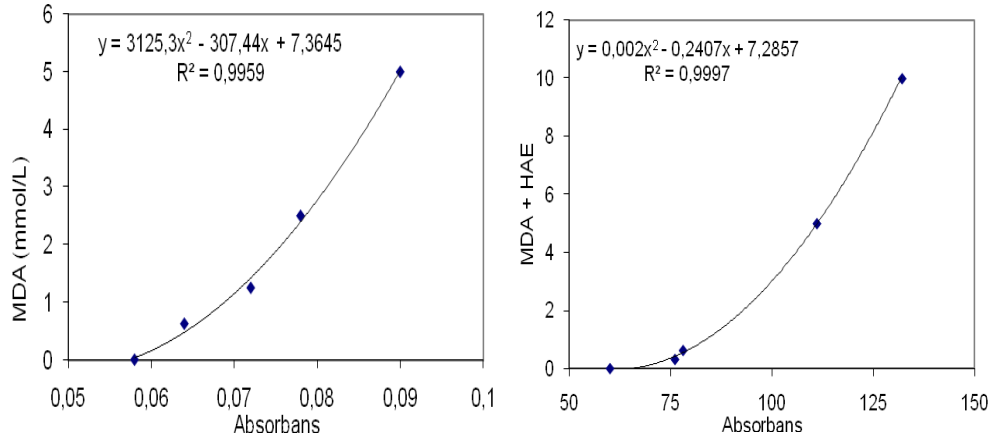
Dokuda lipid peroksidasyon ürünü olarak malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksialkenal'i (HAE) Oxford Biomedical Research'e ait (Oxford, MI, USA) Lipid Peroksidasyon kitiyle (Ürün no: FR 12) çalışıldı. Elde edilen değerler doku proteinine bölünerek nmol/mg Doku olarak ifade edildi.

Doku örneklerinin hazırlanması:

1. Soğutulmuş izotonik tuz çözeltisiyle (%0.9 NaCl) doku örneği yıkanarak eritrositler uzaklaştırıldı.
2. 1/10 oranında 20 mM fosfat tamponla (PBS, pH 7.4) doku homojenizatı buzlu ortamda hazırlandı.
3. Örneği oksidasyondan korumak için santrifüj öncesi örneğe, 1 ml'ye 10 μl asetonitril içinde 0.5 M butile hidroksitoluen (BHT) çözeltisi eklendi
4. Homojenat 3000 x g'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika santrifüjlendi.
5. Elde edilen örnekler çalışmaya kadar -80°C 'de saklandı.

Test çalışması:

1. Standartları 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.315 ve 0 olmak üzere hazırlandı ve okutularda MDA ve MDA+HAE için ayrı ayrı standart eğrileri çizildi



Grafik 2. MDA+HAE ve MDA standart eğrileri ve regresyon denklemleri

2. Örnekleri 200µl olacak şekilde polipropilen tüplere kondu
3. 650 µl dilüe edilmiş R1 reaktifi eklendi
4. Vortekslendi
5. 150 µl R2 reaktif eklendi
6. İyice karıştırıldı
7. 45 °C'de 60 dakika inkübe edildi
8. Örnekler 15000 x g'de 10 dakika santrifüjlendi
9. Süpernatantlar mikroeliza plağa aktarılarda 586 nm'de absorbansları okundu.
10. Okunan absorbans değerleri standart eğrilerden elde edilen formüllerde yerine konarak hesaplama yapıldı.

3.3.12. Apoptozis değerlendirilmesi:

“Hematoksilen ve eozinle boyalı dokularda apoptotik hücre, yoğun kromatin fragmanlı, belirgin eozinofilik sitoplazmalı yuvarlak veya oval şekilli görünür. Apoptotik cisimler hızlı oluşup fagosite olduğundan ve hücrede büzülme meydana geldiğinden, histolojik kesitlerde görünür hale gelmeden önce dokularda hatırı sayılır apoptoz gerçekleşmiş olabilir. Ek olarak, nekrozun aksine apoptoz inflamasyon başlatmadığından tanı alması daha da zordur²²⁰.

Rat karaciğer dokularında, immünohistokimyasal metod ile Apo-BrdU-IHC in situ DNA fragmentasyon kit ekspresyonu (TUNEL kiti) çalışıldı. Apo-BrdU-IHC immünohistokimyasal olarak apoptotik hücreleri belirlemeye yarayan bir TUNEL metodlu bir tahlildir. Apo-BrdU-IHC ekspresyonu, ışık mikroskopunda 20 büyük büyütme alanında immünohistokimyasal metod ile apoptotik endeks (AE) kullanarak şöyle hesaplandı:

$$AE = \text{Apoptotik hücre sayısı} / \text{total sayı} \times 100."$$

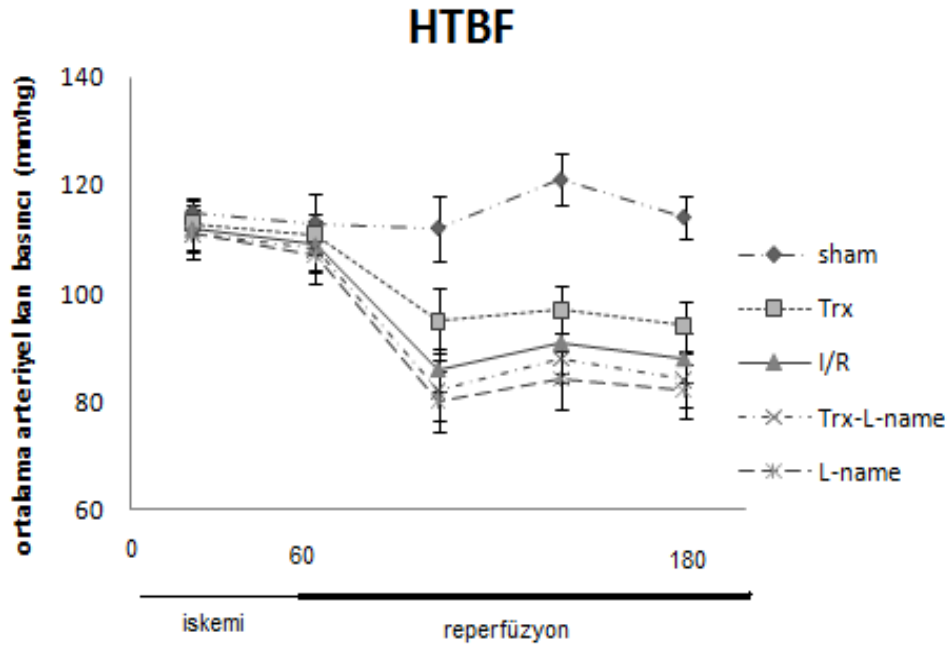
3.3.13. İstatistiksel analiz:

İstatistiksel analizler için SPSS for Windows 15.0 programı kullanıldı. Grupların dağılımlarını saptamak için Shapiro-Wilks testi uygulandı. Gruplar arasında ise Kruskal Wallis varyans analizi ve iki grup karşılaştırılmalarında da Mann Whitney U testi yapıldı. Nominal değeri olan parametreler için χ^2 testi yapıldı. Anlamlılık p değeri <0.05 olarak tanımlandı.

4. BULGULAR

4.1.Hepatik kan akımı

Hepatik doku kan akımı sonuçları şekil 14’de sunulmuştur. Tüm gruplardaki iskemi öncesi HTBF değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Parsiyel hepatic oklüzyon, HTBF değerlerini orijinal seviyelerine göre yaklaşık olarak %20 azaltmıştır. Reperfüzyonun 30. dakikasından çalışmanın sonuna kadar ki kan akım değerleri gruplara göre kaydedildiğinde, Trx uygulanan grupta kan akım değerleri sham grubuna benzer artmıştır ($p<0.05$). Gruba L-name eklenmesiyle anlamlı azalma elde edilmiştir ($p<0.05$). Trx uygulanması HTBF’de I/R, L-name ve Trx-L-name gruplarıyla kıyaslayınca anlamlı bir artış yaratmıştır ($p<0.001$). Grafik 3’de hepatic kan akımlarını gruplara göre değişimi izlenebilir.

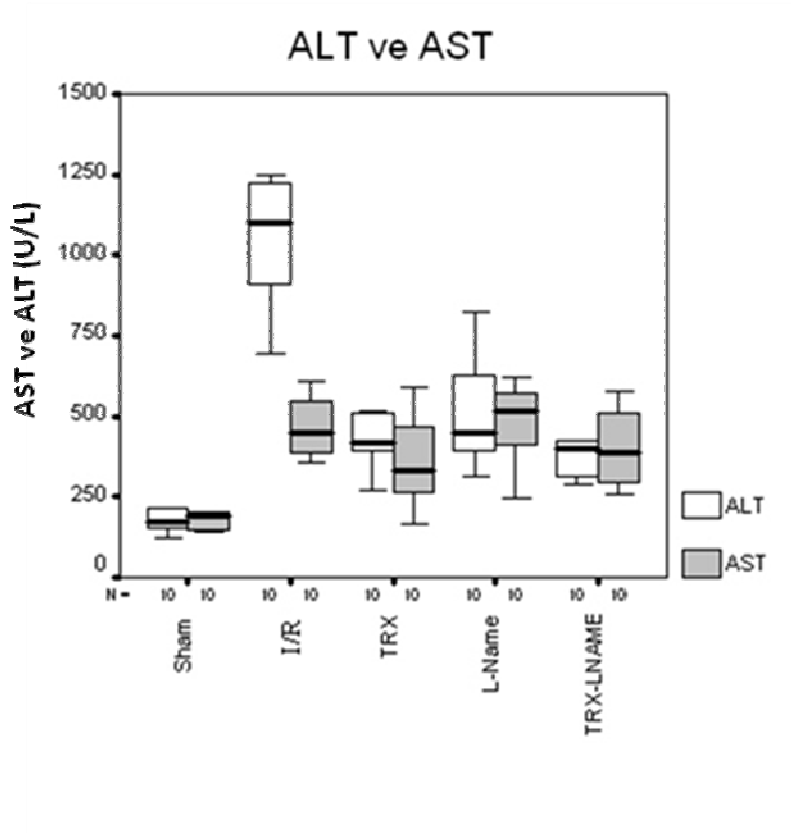


Grafik 3: Hepatik doku kan akımları

4.2. Biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi

Deney gruplarından elde edilen biyokimyasal parametrelere ait değerler tablo 6'da özetlenmiştir. Ayrıca tabloda sham grubu ve iskemi grubuyla diğer gruplar arasındaki, istatistiki değerlendirme sonuçları izlenebilir.

Karaciğer enzimlerinin değerleri çalışma gruplarında incelendiğinde ALT, AST, LDH ve GGT değerlerinin iskemi grubunda arttığı ve TRX, L-name ve TRX-L-name'in beraber verildiği gruplarda azaldığı ancak sham grubuna göre hala yüksek olduğu gözlemlendi (Tablo 6, Grafik 4 ve 5)



Grafik 4. ALT ve AST değerlerine ait Box-Plot grafikleri

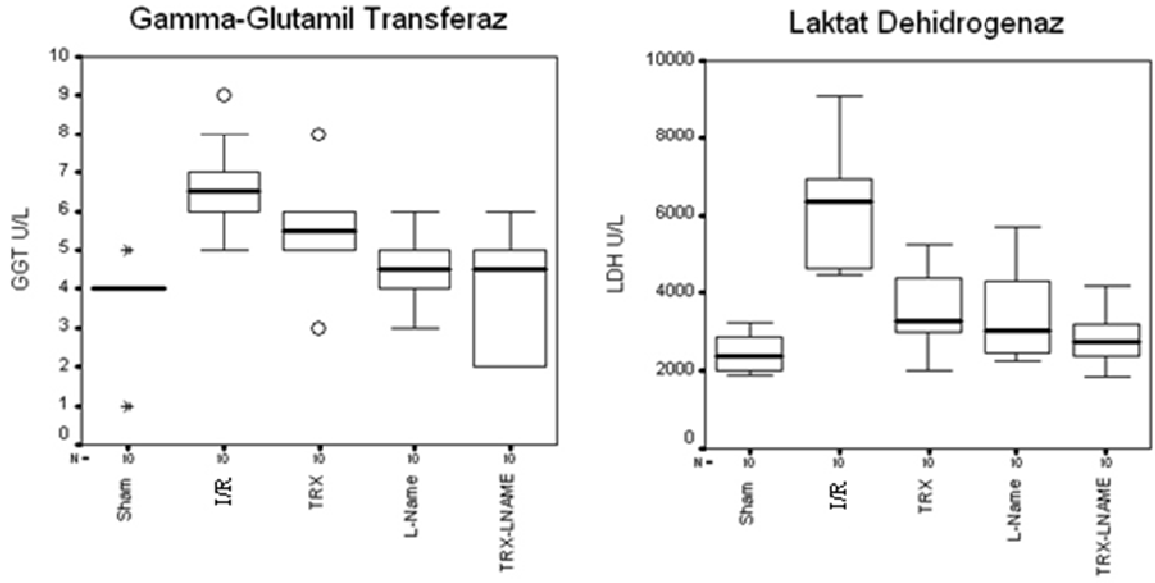
Tablo 6: Deney gruplarında ölçülen parametrelere ait ortalama ve standart sapma değerleri

	Sham (I)	I/R	Thioredoksin	L-NAME	Thioredoksin ve L-Name	Sham/I/R	Trx/I/R	L-NAME/I/R	Trx-L-NAME/I/R
ALP (U/L)	357.3 ± 38	436.8 ± 65.5	315 ± 52	315.9 ± 82.1	234.7 ± 45.3**	0.004	<0.001	<0.001	<0.001
ALT (U/L)	206.7 ± 88.3	1113.4 ± 313**	426.8 ± 76.7*	507 ± 159**	413.8 ± 117	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
AST (U/L)	208.4 ± 76.8	468.5 ± 93.3**	360.1 ± 132*	479.5 ± 133**	397.2 ± 119*	<0.001	0.038	0.829	0.166
LDH (U/L)	2455 ± 518	6222 ± 1547**	3551 ± 1067*	3421 ± 1118*	2811 ± 675	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
GGT (U/L)	3.9 ± 1.1	6.6 ± 1.26**	5.5 ± 1.27*	4.4 ± 0.97	4.1 ± 1.59	0.007	0.057	0.057	0.017
T. Bilirubin (mg/dl)	0.57 ± 0.2	0.42 ± 0.37	0.31 ± 0.15*	0.46 ± 0.26	0.28 ± 0.16*	0.175	0.318	0.715	0.205
D.Bilirubin (mg/dl)	0.37 ± 0.13	0.26 ± 0.18	0.2 ± 0.10*	0.29 ± 0.20	0.22 ± 0.14*	0.117	0.388	0.665	0.564
Kreatinin (mg/dl)	0.59 ± 0.06	0.52 ± 0.12	0.47 ± 0.11*	0.49 ± 0.06*	0.49 ± 0.14*	0.130	0.277	0.512	0.512
Üre (mg/dl)	63.89 ± 6.57	73.39 ± 18.1	77.71 ± 16.1*	81.46 ± 7.19*	69.16 ± 10.4	0.098	0.446	0.158	0.455
P-Selektin (ng/ml)	150.2 ± 65.4	448.5 ± 119**	237.9 ± 94.7*	279.4 ± 71.6*	173.5 ± 34.2	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Endotelin-1 (ng/ml)	45.52 ± 12.7	125.46 ± 35.5**	94.99 ± 10.2**	84.85 ± 11.8**	72.24 ± 11.5*	<0.001	0.001	<0.001	<0.001
NO (µmol/L)	208 ± 54.9	420.72 ± 70.6**	237.67 ± 49.6	168.75 ± 60.9	123.24 ± 44.7*	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
SOD (U/ml)	0.423 ± 0.19	0.28 ± 0.10	0.537 ± 0.14	0.603 ± 0.22*	0.645 ± 0.15*	0.060	0.001	<0.001	<0.001
MDA (nmol/mg protein)	1,148 ± 0.43	3,671 ± 1,87**	2,619 ± 0.75*	2,206 ± 1.05*	2,561 ± 0.46*	<0.001	0.031	0.003	0.023
HAE (nmol/mg protein)	0,738 ± 0.47	2,39 ± 0.73**	1,455 ± 0.70*	1,624 ± 0.88*	1,348 ± 0.59	<0.001	0.004	0.017	0.002
GPx (mIU/mg protein)	3,009 ± 1,13	1,966 ± 0.42	7,108 ± 2,14**	6,417 ± 1,95**	10,173 ± 2,06**	0.171	<0.001	<0.001	<0.001
GSH (mg//mg protein)	9,211 ± 1,80	4,371 ± 1,09**	5,63 ± 1,63**	5,047 ± 1,60**	5,744 ± 1,47**	<0.001	0.073	0.330	0.052
Apoptozis (%)**	%4-6 (%4-6, %4-6)	%10-12 (%10-12, %10-12)	% 8-10 (% 8-10, % 8-10)	% 5-6 (% 5-6, % 5-6)	%2 (%2, %2)				

*Sham grubu ile diğer gruplar arasında karşılaştırma sonuçları (Mann Whitney U testi, anlamlılık p<0.05)

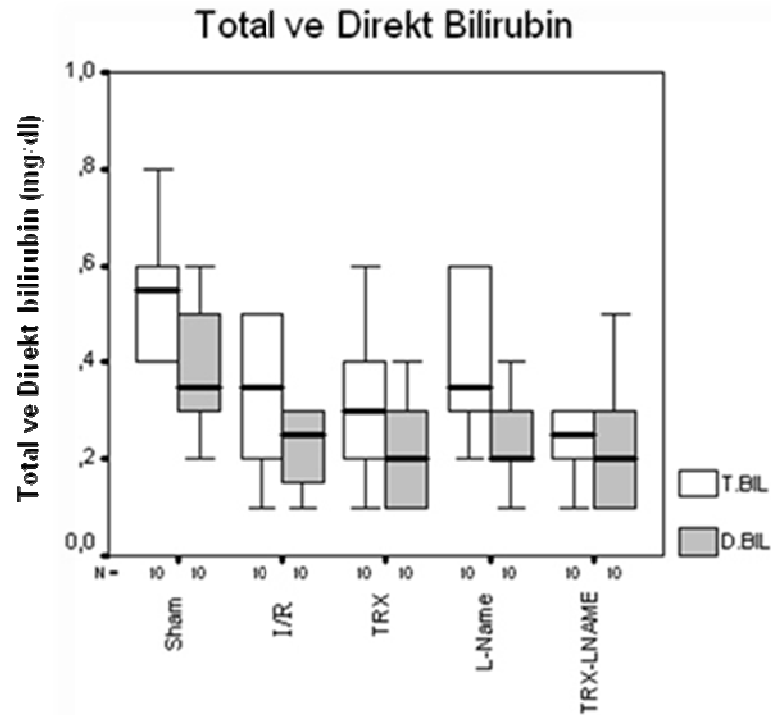
** Sham grubu ile diğer gruplar arasında karşılaştırma sonuçları (Mann Whitney U testi, anlamlılık p<0.001)

*** Apoptozis değerleri ortanca (%25-%75 persentil) değer olarak verilmiştir.



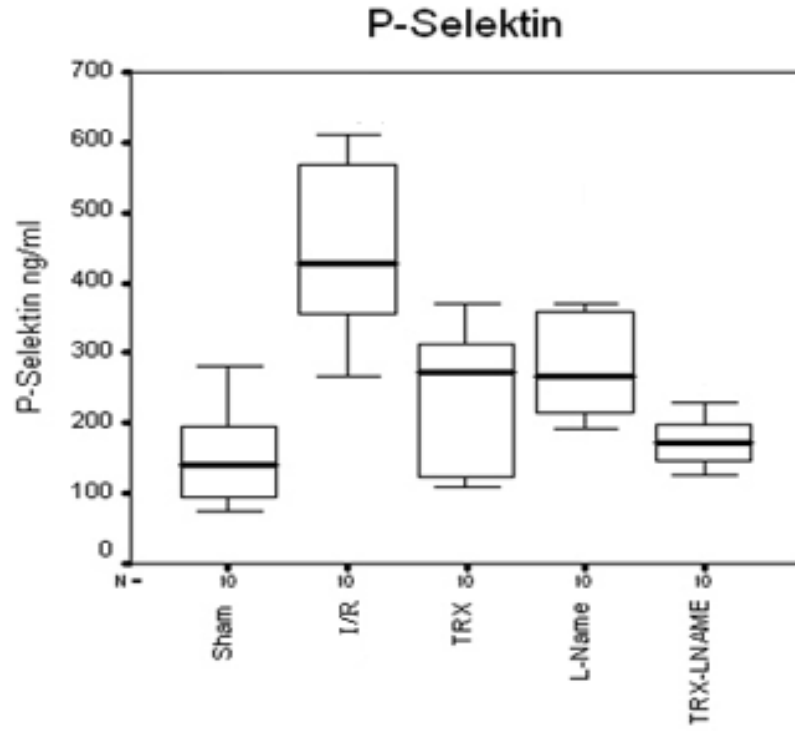
Grafik 5: GGT ve LDH değerlerine ait Box-Plot grafikleri

Üre, kreatinin, total ve direkt bilirubin değerleri çalışma gruplarında incelendiğinde, gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır (Tablo 6, Grafik 6).

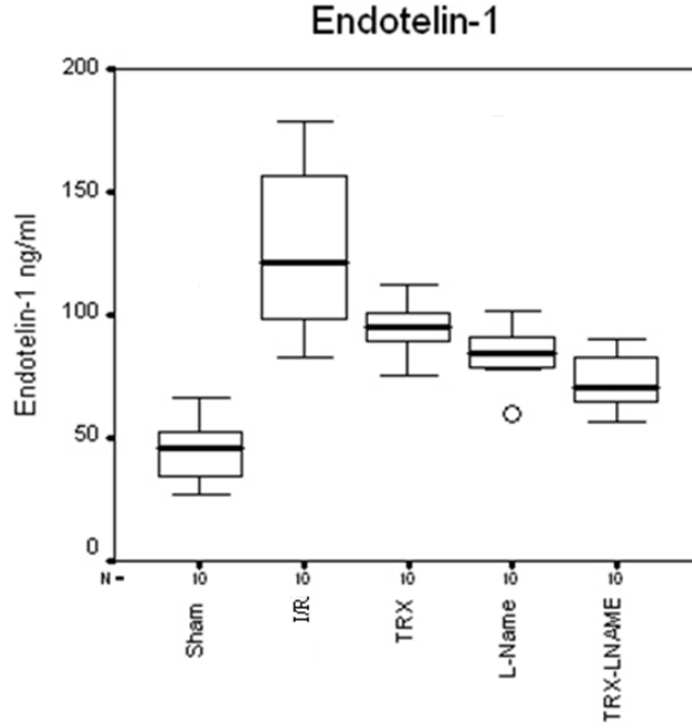


Grafik 6: Total ve direkt bilirubin değerlerine ait Box-Plot grafikleri

Adezyon molekülleri P-selektin ve endotelin-1 değerleri çalışma gruplarında incelendiğinde, iskemi grubunda sham grubuna göre belirgin artış olduğu, Trx, L-name ve Trx-L-name verilen gruplarda azaldığı ancak elde edilen değerlerin sham grubuna göre hala yüksek olduğu izlenmektedir. Hem P-selektin hem de endotelin-1 değerleri için en belirgin azalma Trx ve L-name'in beraber verildiği grupta saptanmıştır. (Tablo 6, Grafik 7 ve 8)

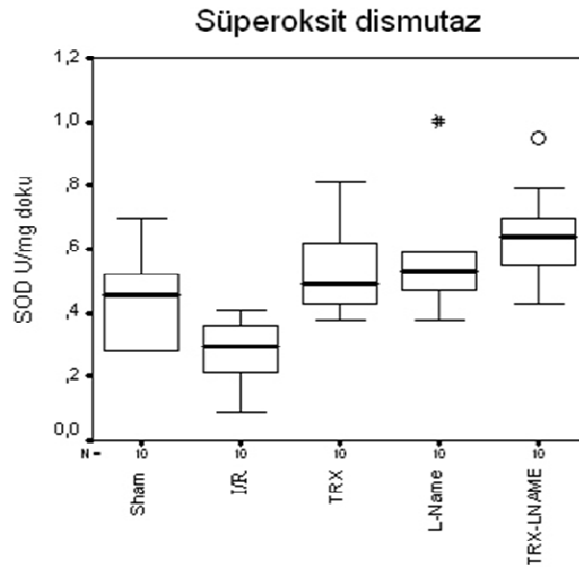


Grafik 7 : P-selektin değerlerine ait Box-Plot grafiği

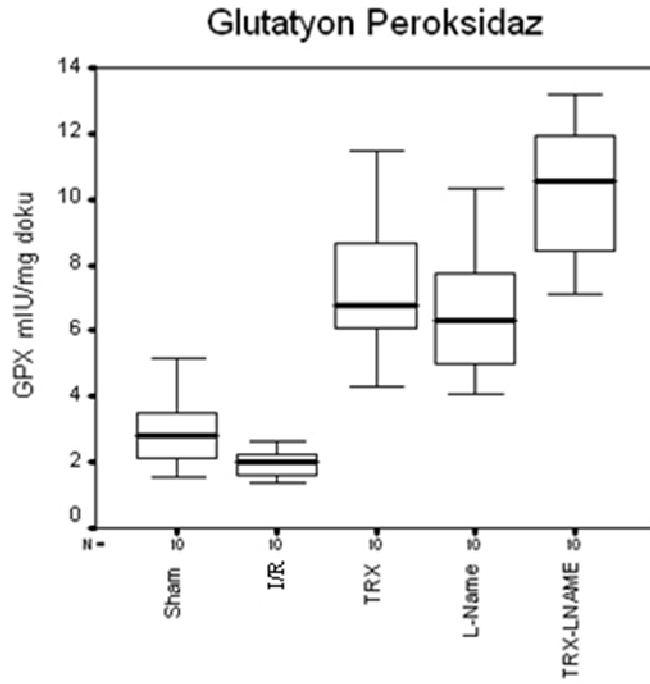


Grafik 8 : Endotelin değerlerine ait Box-Plot grafiği

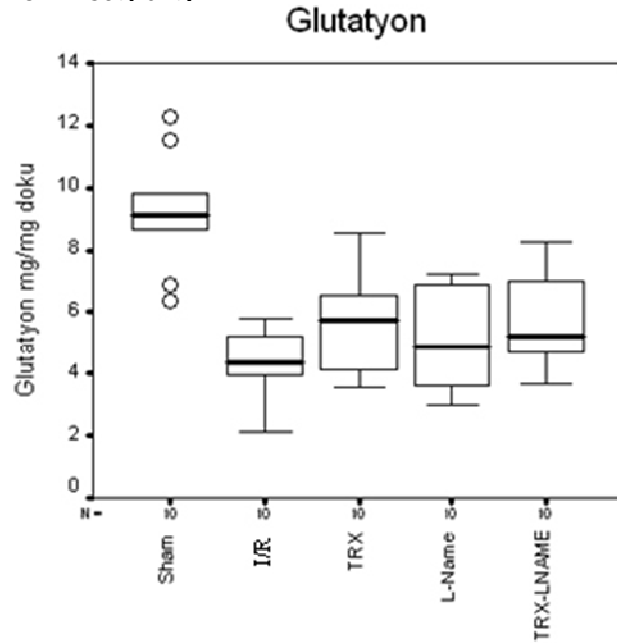
Hücre içi antioksidan enzimlerden GPx ve SOD enzimleri ve total glutatyon (tGSH) çalışma gruplarında incelendiği zaman, iskemi grubunda sham grubuna göre belirgin azaldığı, Trx, L-name ve Trx-L-name verilen gruplarda arttığı, hatta GPx ve SOD için elde edilen değerlerin, sham grubu değerlerinden de yüksek olduğu izlenmektedir. (Tablo 6, Grafik 9-11)



Grafik 9: SOD değerlerine ait Box-Plot grafiği

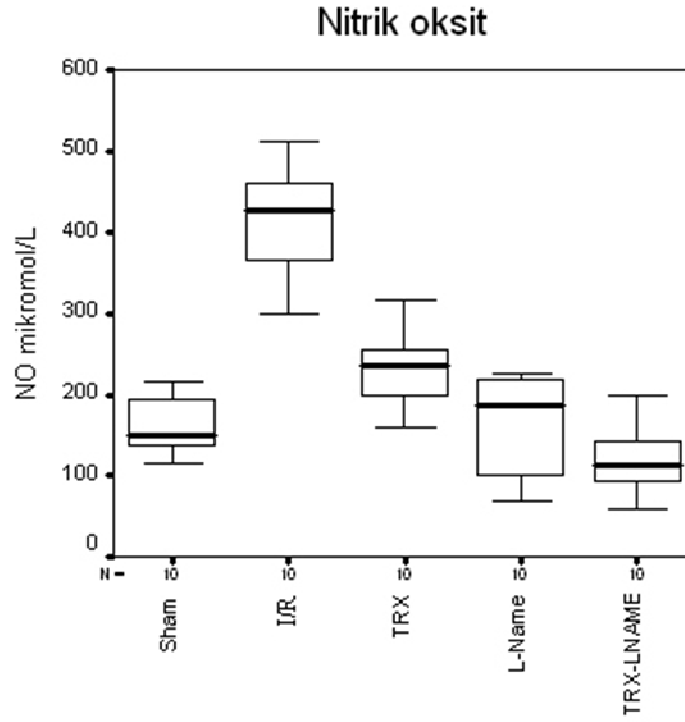


Grafik 10: GPx değerlerine ait Box-Plot grafiği



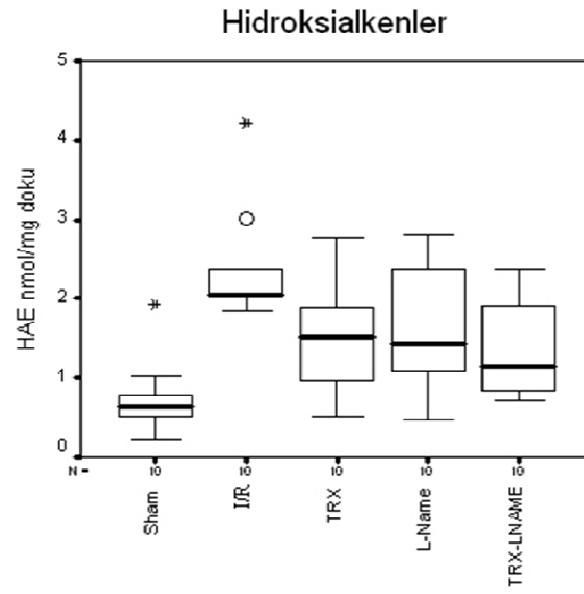
Grafik 11: tGSH değerlerine ait Box-Plot grafiği

NO değerleri çalışma gruplarında incelendiği zaman iskemi ile beraber NO değerlerinin belirgin olarak arttığı ve Trx, L-name ve Trx-L-name verilen gruplarda azaldığı izlenmektedir. Hatta L-name ve Trx-L-name verilen gruplarda NO düzeyinin sham grubunun bile altına indiği görülmüştür (Tablo 6, Grafik 12)

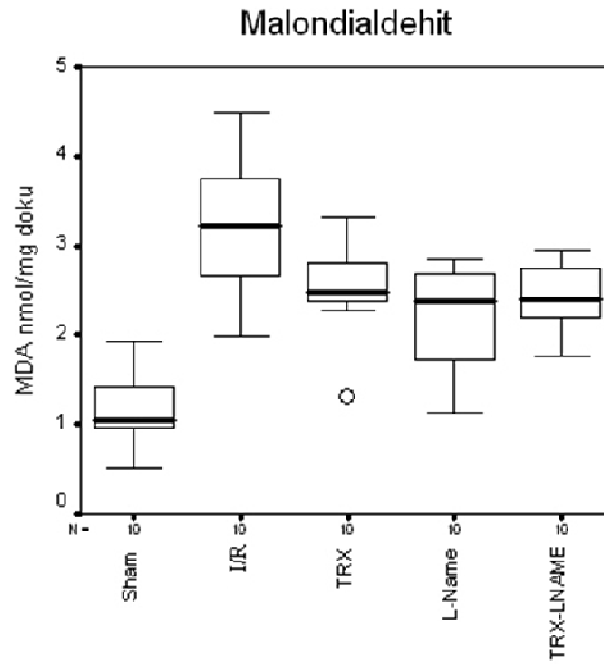


Grafik 12: NO değerlerine ait Box-Plot grafiği

Lipid peroksidasyon ürünleri açısından çalışma grupları değerlendirildiği zaman MDA ve HEA'nın iskemi grubunda sham grubuna göre belirgin yükseldiği izlenmektedir. Trx, L-name ve Trx-L-name verilen gruplarda iskemiye göre MDA ve HEA düzeyleri daha düşük olsada sham grubuna göre yüksek olduğu izlenmektedir. (Tablo 6, Grafik 13-14)



Grafik 13: HAE değerlerine ait Box-Plot grafiği



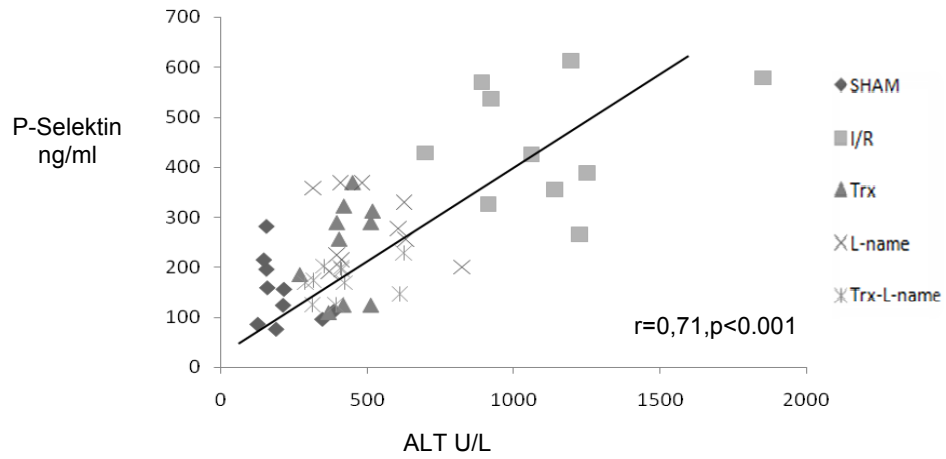
Grafik 14: MDA değerlerine ait Box-Plot grafiği

4.3. Korelasyon sonuçları

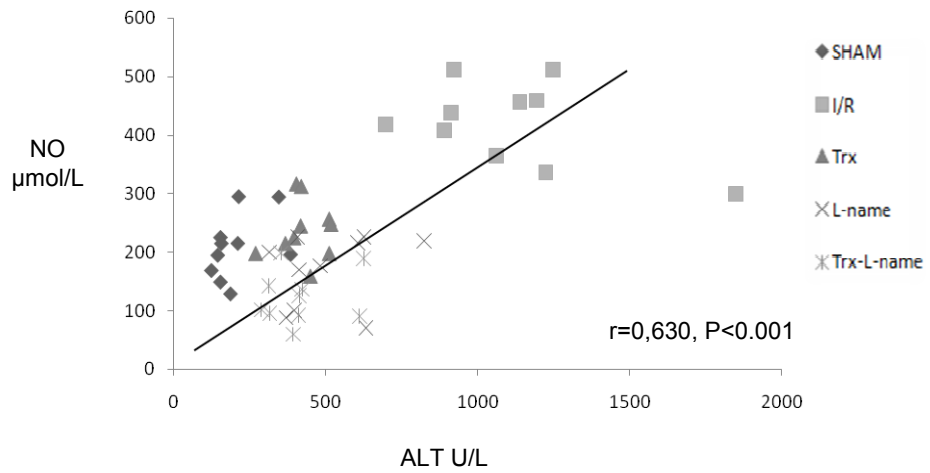
Tablo 7: Deney grularından çalışılan biyokimyasal parametreler ve patolojik değerlendirmelere ait korelasyon sonuçları.

	ALT	AST	LDH	GGT	P-Sel	NO	Endo	SOD	MDA	HAE	GPX	GSH	APO
ALP	r	0,454	0,484	0,381	0,434	0,636	0,286	-0,376	0,085	0,232	-0,623	-0,148	0,632
	p	<0,001	<0,001	0,006	0,002	<0,001	0,044	0,007	0,557	0,105	<0,001	0,304	<0,001
ALT	r	0,498	0,834	0,508	0,712	0,630	0,665	-0,293	0,491	0,591	-0,337	-0,530	0,583
	p	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,039	<0,001	<0,001	0,017	<0,001	<0,001
AST	r		0,387	0,278	0,490	0,104	0,412	-0,129	0,384	0,450	0,004	-0,409	0,105
	p		0,005	0,051	<0,001	0,473	0,003	0,373	0,006	0,001	0,979	0,003	0,468
LDH	r			0,604	0,629	0,617	0,580	-0,438	0,396	0,480	-0,361	-0,386	0,629
	p			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	0,004	0,001	0,010	0,006	<0,001
GGT	r				0,491	0,414	0,473	-0,186	0,334	0,547	-0,260	-0,229	0,586
	p				<0,001	0,003	0,001	0,197	0,018	<0,001	0,068	0,110	<0,001
PSelektin	r					0,656	0,552	-0,431	0,379	0,532	-0,409	-0,341	0,593
	p					<0,001	<0,001	0,002	0,007	<0,001	0,003	0,015	<0,001
NO	r						0,517	-0,586	0,300	0,290	-0,666	-0,356	0,810
	p						<0,001	<0,001	0,034	0,041	<0,001	0,006	<0,001
Endotelin	r							-0,191	0,435	0,411	-0,142	-0,635	0,595
	p							0,185	0,002	0,003	0,326	<0,001	<0,001
SOD	r								-0,172	-0,113	0,603	-0,112	0,509
	p								0,233	0,436	<0,001	0,439	<0,001
MDA	r									0,676	0,005	-0,413	0,348
	p									<0,001	0,975	0,003	0,013
HAE	r										-0,046	-0,414	0,376
	p										0,754	0,003	0,007
GPX	r											-0,138	0,595
	p											0,338	<0,001
GSH	r												0,235
	p												0,100

İncelenen parametreler arasında korelasyon sonuçları incelendiğinde ALT ve LDH değerlerinin AST, ALP, GGT, P-selektin, ET-1, GPx, tGSH, SOD, MDA, HAE ve apopitozla yüksek korelasyon gösterdiği izlenmektedir ($p<0.05$). Ancak AST değerlerinin NO, SOD, GPx, ALP ve apopitoz değerleriyle; GGT değerlerindeki GPx, tGSH, SOD değerleriyle korelasyon göstermediği saptandı. Aşağıda ALT ile NO ve P-Selektin arasındaki korelasyon grafikleri izlenebilir (Tablo 7, Grafik 15 ve 16)

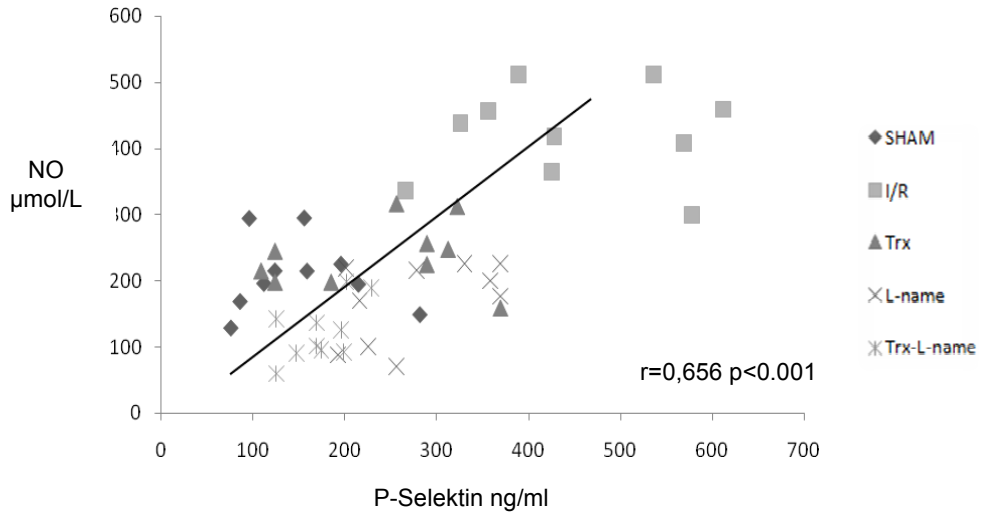


Grafik 15: ALT ve P-Selektin korelasyon grafiği

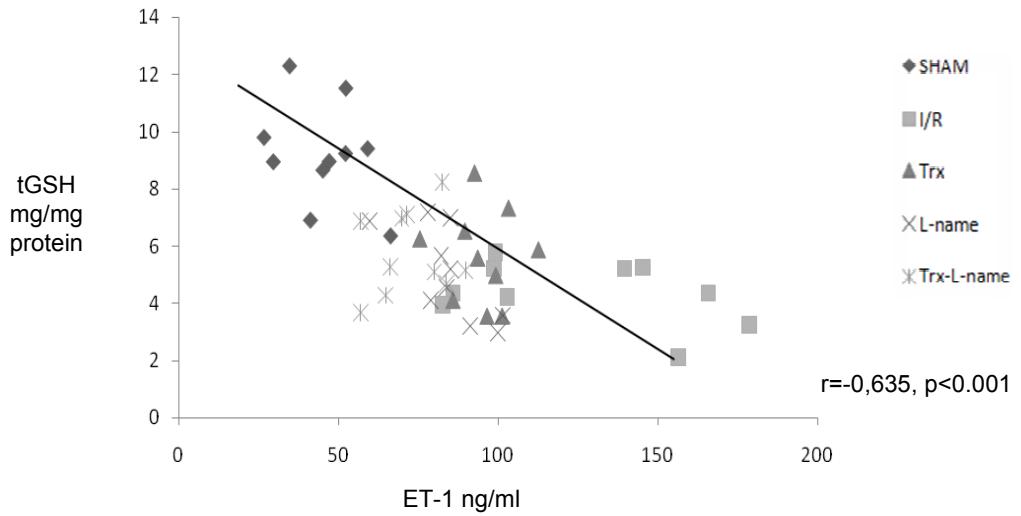


Grafik 16: ALT ve NO korelasyon grafiği

Adezyon moleküllerinden P-Selektin değerleri ALT, LDH, AST, ALP, GGT, P-selektin, ET-1, GPx, tGSH, SOD, MDA, HAE ve apoptoz değerleriyle korelasyon göstermektedir ($p<0.05$). Ancak diğer adezyon molekülü ET-1 SOD ve GPx'le korelasyon göstermemektedir. P-Selektinin NO ile, ET-1'in GSH ile olan korelasyonlarını gösteren grafikler aşağıda izlenebilir (Tablo 7, Grafik 17 ve 18). ET-1, doku tGSH'la güçlü bir negatif korelasyon göstermiştir ($r=-0,635$, $p<0,001$).

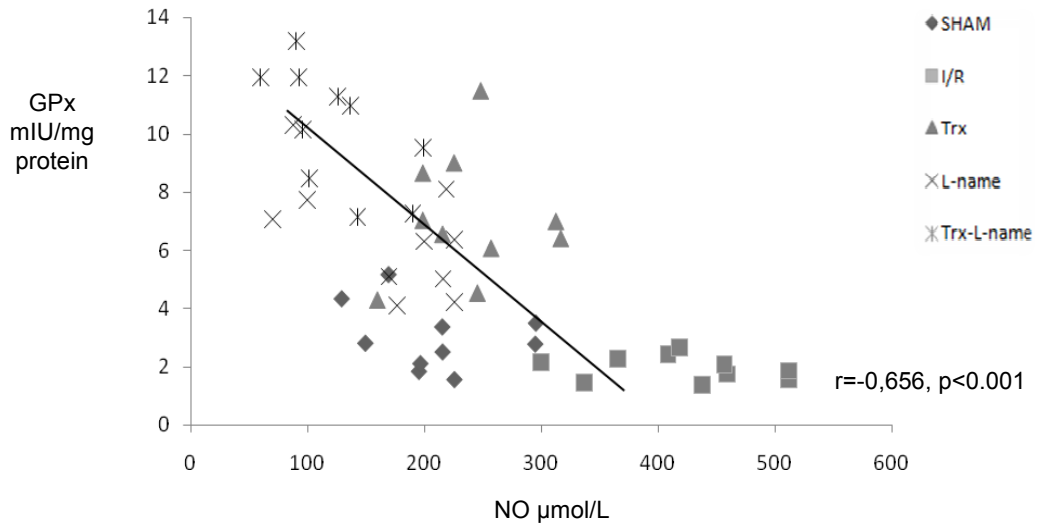


Graik 17: P-Selektin ve NO korelasyon grafiği

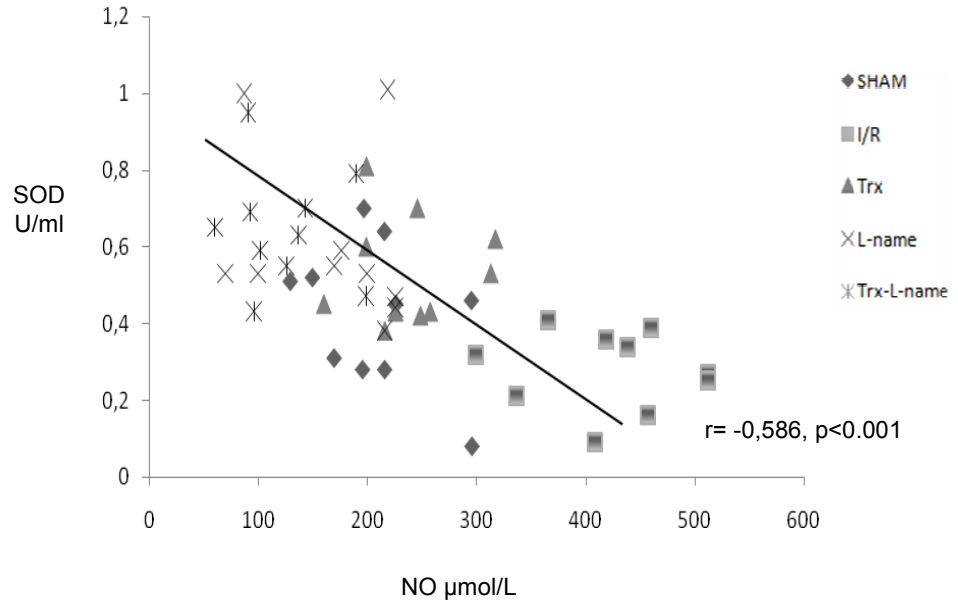


Grafik 18: tGSH ve ET-1 korelasyon grafiği

GPx ve SOD enzimleri ve tGSH'nin düzeylerinin korelasyon değerleri izlendiğinde, her üçünde ALT, LDH, NO ve P-selektin düzeyleriyle anlamlı negatif korelasyon gösterdikleri izlenmektedir ($p < 0.05$) (Tablo 7, Grafik 19 ve 20).

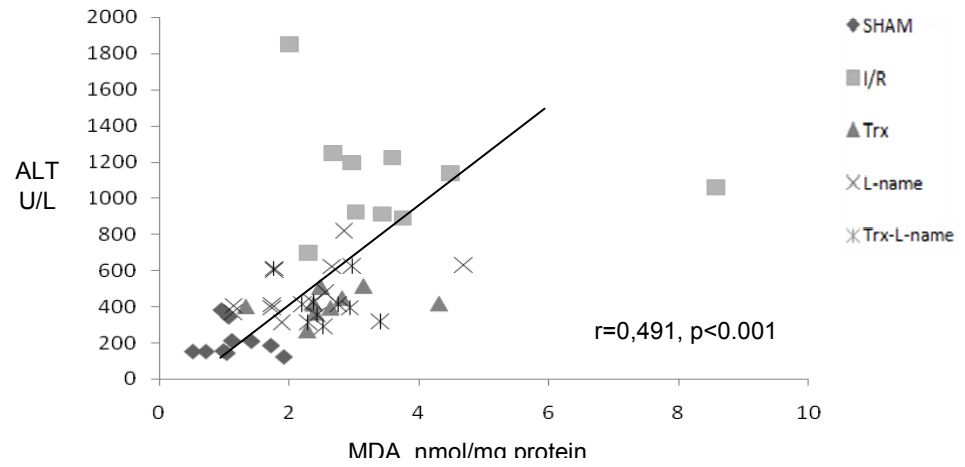


.Grafik 19: GPx ve NO korelasyon grafiği

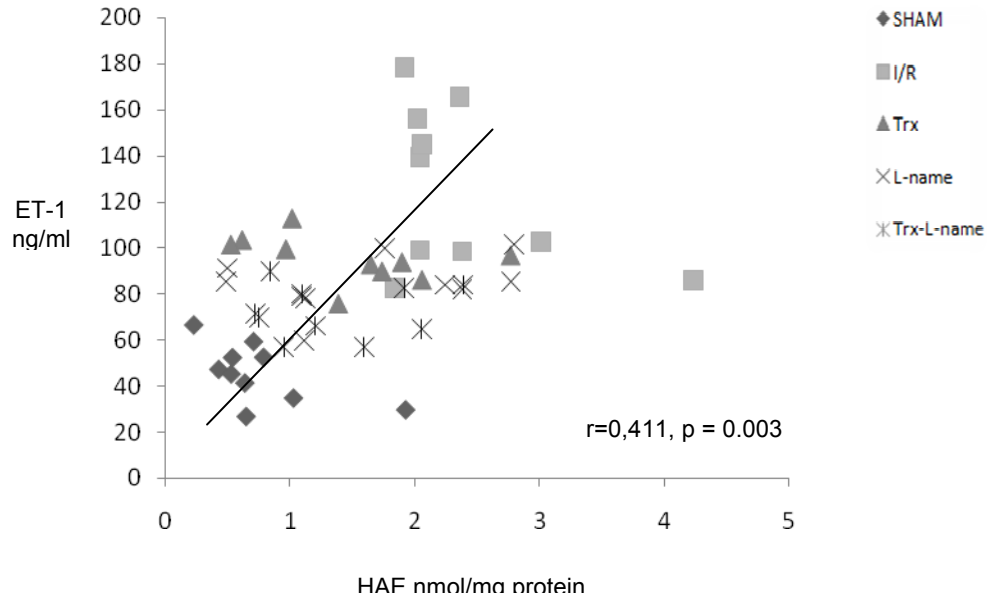


.Grafik 20: SOD ve NO korelasyon grafiği

Lipid peroksidasyon ürünleri olan MDA ve HAE değerlerinin karaciğer enzimleri ALT, AST, LDH, GGT ile yüksek düzeylerde ($p<0.001$), ET-1, P-selektin gibi adezyon molekülleriyle daha düşük düzeylerde ($p<0.05$) pozitif korelasyon gösterdiği görülmektedir (Tablo 7, Grafik 21 ve 22).



. Grafik 21: ALT ve MDA korelasyon grafiği

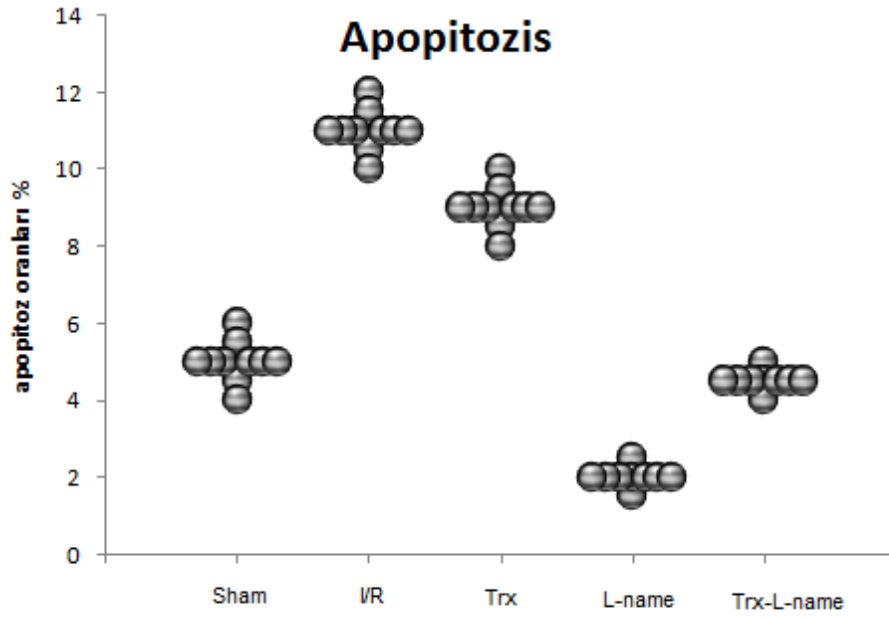


. Grafik 22: ET-1 ve HAE korelasyon grafiği

Gruplardan elde edilen apoptoz sonuçları Tablo 8 ve Grafik 23'de sunulmuştur.

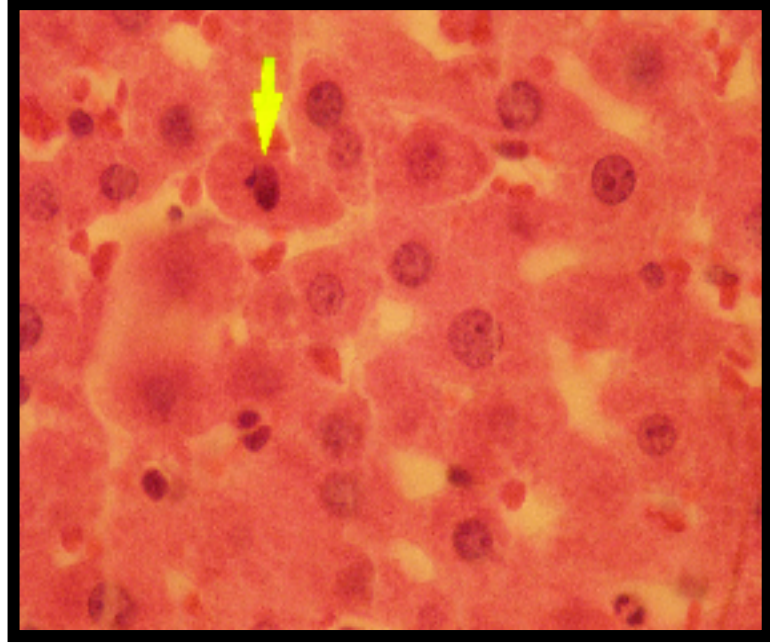
Tablo 8: Apoptoz değerlendirme sonuçları

Grup	Apoptoz oranları %
Sham grubu (n=10)	4-6
I/R grubu (n=10)	10-12
Trx grubu (n=10)	8-10
L-NAME grubu (n=10)	2
Trx ve L-NAME grubu (n=10)	4-5



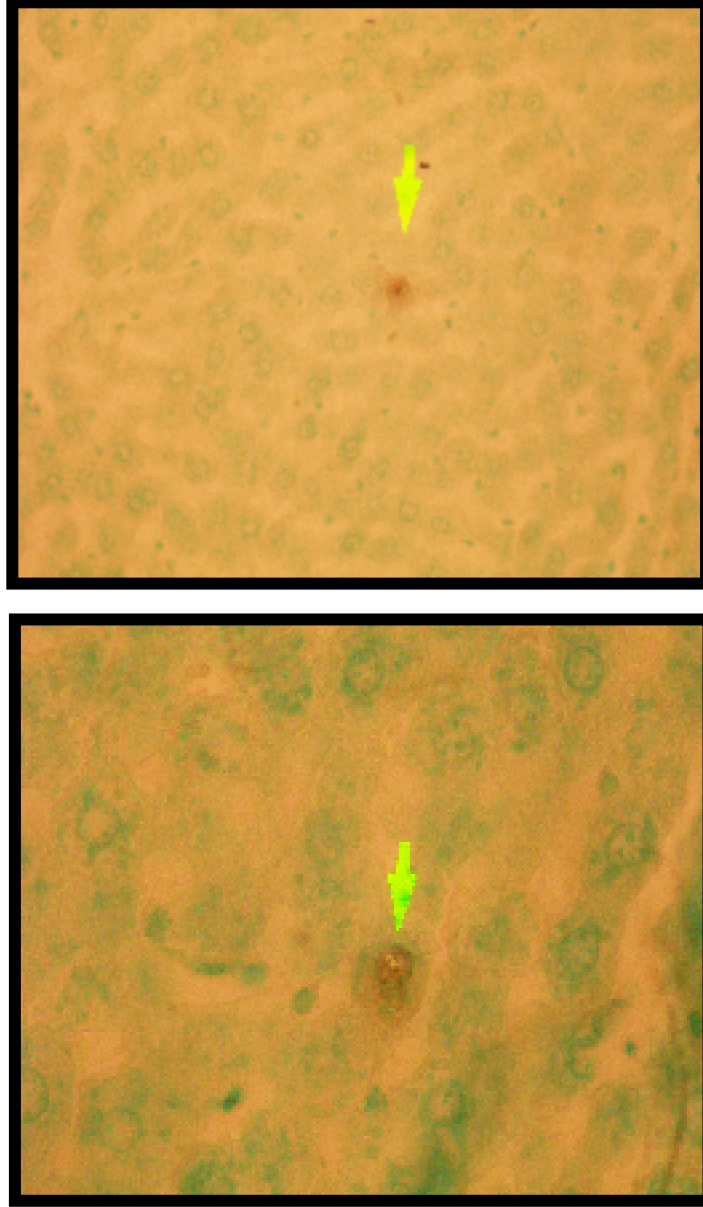
Grafik 23. Apoptozis oranları

Resim 1 ve 2'de hematoksililen eozin boyama ve 100 x'de çekilen apoptotik hücre görüntüleri izlenmektedir.



Resim 1 ve 2. Apoptotik hücre histomorfolojileri (100x HE)

Resim 3 ve 4'de ise Rat karaciğer dokularında, immünohistokimyasal metod ile Apo-BrdU-IHC in situ DNA fragmentasyon kit ekspresyonu (TUNEL kiti) çalışmasına ait fotoğraflar izlenmektedir.



Resim 3 ve 4. Apo-BrdU-IHC in situ DNA fragmentasyon kitle işaretlenmiş apoptotik hücreler (20x ve 100x, Apo-BrdU-IHC immünohistokimyasal boya)

5. TARTIŞMA

İskemi/reperfüzyon zedelenmesi hücre ve doku hasarına yol açan kompleks bir seri olaylar dizisidir³². Yapılan çalışmalarda bazı dokuların iskemiye karşı daha dayanıklı olabildiklerini göstermişlerdir³³. İskemi sırasında hücreler iyonik gradiyentini ve homeostazını korumak için gerekli olan enerjiyi sağlayamamaktadır.

I/R zedelenmesinde, ilk önce dolaşıma gelen kan akımının kesilmesine bağlı olarak (iskemi fazı), anoksi oluşmaktadır. Anoksi sonucu oksidatif fosfrilasyonun bozulması ve buna bağlı olarak ATP miktarının azalması karşımıza çıkmaktadır. ATP yetersizliğine bağlı olarak, membran transportunun bozulmasıyla beraber, kalsiyum (Ca^{++}), homeostazının bozulduğu ve hücre içine su, Na^+ ve Ca^{++} girişi arttığı ve tüm bunların sonucunda da hücrede ödem olduğu bilinen fizyopatolojik sonuçlardır⁴¹. Sonuç olarak iskemi sırasında hücreler iyonik gradiyentini ve homeostazını korumak için gerekli olan enerjiyi sağlayamamakta ve hasar ortaya çıkmaktadır. İskemi sonrası dokunun yaşamını devam ettirmesi için, reperfüzyon mutlaka gereklidir. Fakat I/R döngüsünün hasarı sadece iskemiye göre daha fazla arttırdığı da gösterilmiştir^{28,29}

Hücre hasarını biyokimyasal olarak göstermenin en iyi yollarından biri, hücresel enzimlerin dolaşımdaki düzeyinin takip edilmesidir. Biz çalışmamızda karaciğer hücre yıkımının göstergesi olarak kullanılan ALT, AST, LDH, GGT ve ALP'düzeylerini I/R grubunda sham grubuyla kıyaslayınca anlamlı olarak yüksek bulundu. I/R grubuyla, Trx ve L-name verilen gruplar karşılatırdığında ALT, ALP ve LDH değerlerinin I/R grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ve en belirgin azalmanın Trx ve L-name'in beraber verildiği grupta olduğu görüldü. AST değerleri için istatistiksel anlamlı azalma Trx grubunda, GGT için ise sadece Trx ve L-name'in beraber verildiği grupta bulundu. Böylece antioksidan özellikteki

Trx ve NOS inhibitörü olan L-name'in genel bir bakışla hücrede koruyucu etkiler gösterdiğini ve karaciğer hücre zedelenmesinin göstergesi olan enzimlerde belirgin azalma yaptığını göstermiş olduk. Bu enzimler içinde en belirgin azalma membran enzimi olan ve I/R zedelenmesinde ilk etkilenmesi beklenen ALT'de ortaya çıkarken, hücrenin mikrozomal fraksiyonunda yer alan AST ve GGT gibi enzimlerde azalmaların daha düşük düzeylerde olduğu saptanmıştır. Trx verilmesi sonucu elde edilen bu sonuçlar Trx'inin antioksidan, protein onarıcı ve korucu etkileriyle açıklanabilir. L-name verilmesi yani NOS'un inhibisyonu, Squadrito ve arkadaşlarının gösterdiği gibi hücresel düzeyde hem peroksinitrit oluşumunu azaltmakta hem de Thiemeermann ve arkadaşlarının ifade ettiği gibi oluşacak fazla vazodilatasyonu ve doku kanlanmasıdaki bozulmayı engellemektedir ve böylece zedelenmeye karşı koruyucu etkiler göstermektedir^{73,74}.

Sonuçlarda korelasyon tablosu ve grafikleri incelendiğinde (tablo 7, şekil 27) oksidatif stres artışının göstergesi olan NO ile ALP, ALT, GGT ve LDH arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon olduğu izlenmektedir.

I/R zedelenmesi ve I/R'da koruyucu olarak Trx ve L-name kullanılması total ve direkt bilirubin, üre, kreatinin değerlerinde belirgin bir değişikliğe neden olmamıştır. Bilirubin, üre ve kreatinin değerlerinin değişmemesi bize hem iskeminin hem de verilen Trx ve L-name gibi maddelerin böbrek ve karaciğerin ekskresyon fonksiyonlarını bozmadığını bize göstermiştir.

Endotel kökenli adezyon molekülleri, özellikle P-selektin doku hasarında lökositlerin aktive endotele tutunmasında önemli olan partiküllerdir⁹⁶⁻¹⁰¹. P-selektin lökositlerin dokuya göçünde kritik rol oynayan hücre yüzey glikoproteinidir⁹⁹. Rat çalışmalarında endotelial hücrelere

lökosit adezyonundan temelde sorumlu olanın P-selektin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda hepatik I/R zedelenmesinde P-selektin antikorlarla yapılan tedavinin hasarı azalttığı ve yaşam süresini uzattığı da gösterilmiştir¹²⁵⁻¹²⁶. Aşağıdaki tabloda karaciğer I/R ve selektin çalışmalarının bir özeti bulunabilir. (Tablo 9).

Tablo 9: Seçilmiş P-selektin çalışmalarından örnekler

Tür	Selektin ölçümü/hedef	Değerlendirilen Hasar modeli	Sonuç	Referans
Fare	P-selektin	30 dak. Sol hepatik lob iskemisi	Lökositlerin endotel hücrelerine adezyonunda P-selektin primer determinant olarak saptanmış	125
Rat	P-selektin antikor	Kontrolsüz hemorajik şok	Hepatosellüler hasarda azalma ve artmış yaşam süresi	126
Rat	P-selektin glikoprotein ligand-1	Soğuk iskemi	Karaciğer izograft yaşam süresinde belirgin artış	221

Bizim çalışmamızda P-selektin seviyelerinin I/R grubunda sham grubuna göre belirgin artış gösterdiği saptandı. Ayrıca Trx, L-name ve Trx ve L-name'in beraber verildiği gruplarda P-selektin ekspresyonunun I/R grubuna göre azaldığı, ancak elde edilen düzeylerin sham grubuna göre yüksek olduğu gösterildi. Daha önce Jekell ve arkadaşlarının kronik kalp yetmezlikleriyle yaptığı çalışmalarda da bulgularımızı destekleyen sonuçlar elde edilmiştir¹⁰². Dolaşımdaki Trx'nin inflamasyonda nötrofil invazyonunu engellediği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda human

rekombinant Trx'inin İV olarak uygulanmasının I/R hasarını ratlarda, tavşanlarda ve köpeklerde azalttığı bulunmuştur²²². Ayrıca yapılan çalışmalarda Trx'inin lökosit ekstrasvazasyonunu da engellediği gösterilmiştir²²². Bizim elde ettiğimiz sonuçlarda literatürle uyumlu olarak izlenmiştir.

iNOS'la adezyon moleküllerinin ilişkileride çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır. Normal ve iNOS -/- farelerde yapılan çalışmada çekal ligasyon ve perforasyon yapıldıktan 6 saat sonra normal farelerde belirgin E- ve P-selektin artışı olduğu ancak iNOS -/- olan ratlarda ise daha düşük artışlar olduğu ortaya konmuştur²²³. Ayrıca ince barsaklarda I/R bağlı olarak selektin artışının iNOS -/- farelerde tamamen bozulduğuda gösterilmiştir²²³. Ancak bunun yanında NO'nun endotelial hücrelerde adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azalttığını belirten in vitro çalışmalarda literatürde izlenebilir²²⁴⁻²²⁶. Bu iki zıt sonuç çalışmaların in vitro ve in vivo olarak yapılmalarına ve çalışma dizaynlarının farklılıklarına bağlanarak açıklanmıştır. Bizim çalışmamızda da L-name kullanılan gruplarda literatüre in vivo yapılan çalışmalara paralel olarak, P-selektin ekspresyonunun belirgin azaldığı saptandı. Sonuçlarda korelasyon grafikleride incelendiğinde (Şekil 28) NO ile P-selektin arasında çok belirgin bir pozitif korelasyon olduğu da görülmektedir. Sonuç olarak NO endotelial hücrelerde adezyon moleküllerinin salınmasında kilit bir role sahip görünmektedir. Ancak literatürde birbirinden farklı sonuçların elde edilmiş olması daha yeni çalışmalara gereksinim olduğunuda göstermektedir.

I/R zedelenmesinde karaciğer hasarına yol açan en önemli faktörlerden birinin sinüzoidlere olan kan akımının azalması olduğu ve bunun da reperfüzyonda oluşan vazokonstriksiyon, endotel hasarı ve artmış intravasküler koagülasyon sonucu olduğu yapılan çalışmalarda

ortaya konmuştur^{72,78}. Reperfüzyon fazında vazokonstruksiyona yol açtığı bilinen en potent ajan endotelinlerdir⁷⁹.

I/R zedelenmesinde vasküler tonus, NO ve ET-1 arasındaki dengeye bağlıdır. Yapılan çalışmalarda vazokonstruksiyonun NO ile ET-1 arasındaki bu kolayca kırılabilen dengenin bozulmasına bağlı olduğu gösterilmiştir^{43,47}. Reperfüzyonun başlangıcında NO seviyeleri azalmakta, ET seviyeleri artmaktadır ve sonuçta mikrosirkülasyonda vazokonstruksiyon oluşmaktadır. Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada pratikte NO konsantrasyon artışının ve ET konsantrasyonunun azalmasının I/R zedelenmesini azalttığı gösterilmiştir⁶³. Bizim çalışmamızda da özellikle I/R grubunda sham grubuyla kıyaslayınca plazma ET-1 konsantrasyonları literatürü destekler şekilde belirgin olarak yükselmiş olarak görülmüştür. Aynı zamanda NO seviyeleri I/R grubunda sham grubuna kıyasla belirgin olarak artış göstermiştir. Trx, L-name ve her ikisinin beraber verildiği gruplarda hem ET-1 seviyeleri hem de NO seviyelerinde belirgin azalmış, en belirgin azalmada Trx ve L-name'in beraber verildiği gruplarda oluşmuştur.

NO düzeylerinin gruplar arası değişimi incelendiğinde, I/R grubunda sham grubuna kıyasla çok belirgin bir artış olduğu, Trx, L-name ve Trx-L-name'in beraber verildiği gruplarda ise NO düzeylerinin sham grubunun altına indiği gözlenebilir. NOS inhibitörü olan L-name verilen gruplarda iNOS düzeylerinde belirgin azalma olması beklenen bir sonuçtur. Trx verilen gruplarda bu değişim Trx'nin ROS'ları azaltmasıyla ve özellikle iNOS aktivasyonunu sağlayan TNF- α üzerine olan etkileriyle açıklanabilir. Trx-1 ve GSH gibi diğer antioksidan sistemlerin aksine Trx-2 özellikle mitokondrilere spesifiktir. Hansen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Trx-2'nin TNF- α 'ya bağlı ROS üretimini düzenlediği gösterilmiştir²²⁷. Ayrıca Welsh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Trx-1'in HIF-1 (hipoksi inducible faktör-1) transaktivasyonunu, HIF-1 proteininin

üretimini azalttığı ve buna bağlı olarak da iNOS geninde baskılanmaya yol açtığı gösterilmiştir²²⁸.

Yapılan çalışmalar düşük miktarlarda NO'nun hücrede fizyolojik olarak önemli olduğunu, ancak yüksek NO düzeylerinin toksik olduğunu göstermiştir^{229,230}. NO'nun hücredeki etkileriyle ilgili çalışmalardan örnekler incelendiğinde, fazla NO'nun hücresel enzim sistemlerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu inhibisyonunun demir-sülfür (Fe-S) merkezlerinin inhibe edilmesiyle²³¹, ADP-ribozilasyonuyla²³², çeşitli proteinlerdeki serbest sülfidril gruplarının nitrosilasyonuyla²³³, çinko-sülfür merkezlerden Zn salınımıyla oluştuğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır²³⁴. Fazla NO'nun elektron transport zinciri kompleks I-II ve mitokondrial membran potansiyelinde hasar oluşturduğu gösterilmiştir²³⁵. Fazla NO, DNA tek zincirinde kırılmalara, mutajenik etkiye ve apoptozda artışa yol açmaktadır²³⁶. Fazla NO üretimi bir çok infeksiyon, inflamasyon ve otoimmün hastalığın etyopatogenezinde de rol oynamaktadır. NO ve peroksinitrit NO'ya bağlı oluşan sitotoksitede major rolü oynamaktadır.

NOS inhibitörlerinin I/R zedelenmesindeki etkileri üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde çok farklı sonuçlar karşımıza çıkmaktadır. Bazı çalışmalarda NOS inhibisyonunun kan akımını azaltarak I/R hasarını artırdığını^{237,238}, bazılarında etkisi olmadığını^{239,240}, bazılarında da iNOS inhibitörlerinin yararlı etkileri olduklarını görmek olasıdır²⁴¹. Bizim çalışmamızda ölçülen parametrelere ait korelasyon grafikleri incelendiğinde NO düzeyleriyle karaciğer hasarının göstergesi olarak da kullanılan ALT, LDH, GGT ve ALP gibi karaciğer enzimleri değerleri arasında anlamlı bir pozitif korelasyon bulunduğu izlenebilir. Ayrıca NO düzeyleriyle P-selektin, ET-1, MDA, HAE ve apoptozis arasında da anlamlı bir pozitif korelasyon bulunmuştur. Bu sonuçlar bize iNOS inhibisyonunun I/R sürecinde oluşacak hasara karşı koruyucu olduğunu

göstermiştir. Bu sonuçta daha önce de vurguladığımız gibi iNOS inhibisyonun, Squadrito ve arkadaşlarının gösterdiği gibi hücresel düzeyde hem peroksinitrit oluşumunu azaltmasına hem de Thiernemann ve arkadaşlarının ifade ettiği gibi oluşacak fazla vazodilatasyonu ve doku kanlanmasıdaki bozulmayı engellemesine bağlı olarak açıklanabilir^{73,74}. NO'nun reaksiyonu sonucu oluşan peroksinitritler, radikal olmamasına rağmen, güçlü okside edici maddelerdir. Yarılanma ömürlerinin öncül moleküllerine (süperoksit ve nitrik oksit) göre uzunluğu ve okside edici özellikleri sayesinde membran lipidleri, tioller, her tür protein (yapısal, enzimatik) ve DNA gibi hücresel makromoleküllerin tamamını hasarlayabilir. Aynı zamanda peroksinitrit artışı beraberinde hidroksil radikalının artışına da yol açmaktadır.

NO ile endotelin arasındaki ilişki incelendiğinde NO'nun vasküler tonusu düzenleyen endotelial kökenli ET-1 gibi mediatörleri düzenlediği anlaşılmaktadır²⁴². I/R zedelenmesinin tam mekanizması bilinmesede NO, ET, artmış inflamatuvar sitokinler (TNF α ve IL-6), ROS ve fagositlerin (makrofaj ve monositler gibi) süreçte rolü olduğu bilinmektedir. NO karaciğerde sinüzoidal ve presinüzoidal alanda vazodilatasyonu sağlayan güçlü bir vazodilatatördür. ET ise vazokonstruksiyon yapan vasküler aktif polipeptiddir. Normal fizyolojik koşullarda NO ve ET vasküler tonusu dengelerler. ET, ET-B reseptörleri aracılığıyla NO salınımını artırır^{243,244} fakat bununla beraber NO cGMP üzerinden ET salınımını azaltmaktadır²⁴⁵. Yapılan birçok çalışmada bu ve benzeri sonuçlar elde edilmiştir²⁴⁶. Bununla beraber NO ile ET arasındaki ilişki kompleksdir ve tam olarakda ortaya konamamıştır²⁴². Bizim çalışmamızda ET seviyelerinin yüksek olduğu gruplarda NO seviyeleride yüksek olarak izlenmektedir. Bu literatüre uyumlu olarak görülmektedir. Ancak NO seviyelerinin baskılandığı gruplarda ET seviyelerinde artma beklenirken bizim çalışmamızda böyle bir korelasyon saptanmamıştır. Ancak biz

çalışmamızda NO ve ET düzeylerini sadece plazmada çalıştık. Doku düzeyinde çalışılısaydı belkide bu korelasyonu göstermek mümkün olabilirdi.

Yaptığımız çalışmanın sonuçları incelendiğinde Trx verilen gruplarda ET seviyelerinde de azalma olduğu izlenmektedir (Şekil.19). Literatürde Trx ET ilişkisini inceleyen bir yayın bulunmamaktadır. Bu konudaki bilgilerimiz daha çok eksiktir. Ancak Trx, Ros inhibisyonu ve transkripsiyon faktörlerinin regülasyonu aracılığıyla bunu gerçekleştiriyor olabilir. Cheng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda ET ile ROS arasında ilişki olduğu ve ROS'ların ET sinyal yolunda sekonder mesajcı gibi rol oynadıkları ortaya konmuştur²⁴⁷. Sonuç olarak Trx ET ilişkisi daha fazla ve farklı model araştırmalarla araştırılmalıdır.

I/R patogenezinde reperfüzyon fazında oluşan ROS'lar çok önemlidir. ROS'lar proteinlerin oksidasyonu ve yıkımı, lipid peroksidasyonu ve DNA'nın hasarlanması gibi mekanizmalarla direkt hücre zedelenmesine katılmaktadır. Çalışmamızda antioksidan sistemde yer alan SOD, GPx ve tGSH düzeyleri incelendiğinde hepsinin düzeyinin I/R grubunda sham grubuna göre belirgin olarak azaldığı izlenmiştir. Trx, L-name ve her ikisinin beraber verildiği gruplarda SOD ve GPx aktivitelerinde sham grubunda üzerinde bir artış saptanırken, tGSH düzeyleri artmış ancak elde edilen değerler sham grubunda altında olmuştur. Trx aktif merkezinde iki sistein rezidüsü taşıyan önemli bir antioksidan moleküldür. Trx'nin, metionin sülfoksid redüktaz veya tiyoredoksin peroksidaz varlığında ortamdan H₂O₂'yi yok ettiği gösterilmiştir²⁴⁸. Bu nedenden dolayı Trx verilen gruplarda Trx'in H₂O₂'i yok etmesine bağlı olarak, H₂O₂'i yok eden diğer sistemlerde (GPx ve tGSH) artış olması kaçınılmazdır. Trx sistemin nitrozatif ve oksidatif strese karşı koruyucu etkileri bir çok yolla açıklanabilir. Bunlardan birincisi çok iyi dökümanite edilmiş olan Trx redüktaz ve NADPH'la beraber Okside Trx'i

(Trx S-S) redükte Trx'e çevirmeleri (Trx-SH) ve proton kaynağı olarak reaksiyonlarda kullanılmalarıdır. Sistemin thiol tamponlama aktivitesiyle ilgili herhamgi bir sınırlama ve limit yoktur²⁴⁹. Sistem dar bir spektrumda thiol taşıyan proteinler için –SH grubu üretmekte ve bu proteinlerle beraber ROS tamponlayıcı aktivitesini göstermekte ve hücreleri nitrözatif ve oksidatif strese karşı korumaktadır. Bunu dışında Trx'nin MnSOD'u (mitokondrial) uyardığı ve buna bağlı olarak da bir çok hücre tipinde NO'nun yarattığı hasara karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir²⁴⁹.

L-name'le NOS inhibisyonunun fazla NO üretimini azalttığı ve buna bağlı olarakda hücreyi oluşacak peroksinitrit ve hidroksil radikallerine karşı koruduğu bir çok araştırmacının yaptığı çalışmalarla kanıtlanmıştır^{73,74}. Sonuç olarak iNOS inhibisyonu I/R sürecinde fazla NO üretimini azaltarak hücrenin antioksidan savunma sistemine belirgin bir destek vermektedir.

Hücrede ROS'ların düzeyi hücresel antioksidan sistemler tarafından kontrol edilmektedir. Hücresel redoks kontrolünü sağlayan en önemli antioksidanlar SOD ve GPx'dir. Yapılan çalışmalarda iNOS'un uyarılması ve NO'düzeylerinin artışıyla hücrede katalaz, GPx, Mn-SOD aktivitelerinde azalma olduğu net bir şekilde ortaya konmuştur. Bu bulgulara NO'nun hücrenin redoks kontrolünde kritik molekül olabileceğini düşündürmektedir²⁵⁰. Fakat NO'nun endojen antioksidanları nasıl düzenlediği tam anlaşılamamıştır. Asahi ve arkadaşları NO'nun sadece GPx'ı sistein rezidülerini modifiye ederek inhibe ettiğini fakat diğer antioksidan enzimlere etkileri olmadığını söylemiştir²⁵¹. Diğer yandan Brown ve arkadaşları NO'nun H₂O₂'yle yarışarak katalaza bağlandığını ve enzimi degrade ettiklerini göstermiştir²⁵². Ischiropoulos ve arkadaşları peroksinitritin tirozin rezidülerinin nitrasyonu yolu ile SOD'u inhibe ettiğini göstermişlerdir²⁵³. Dobashi ve arkadaşları ise açık bir şekilde NO'nun katalaz ve SOD'u mRNA ekspresyonunu azaltarak inhibe ettiklerini göstermişlerdir²⁵⁰.

Çalışmamızda elde edilen SOD, GPx, tGSH ve NO değerleri incelendiği zaman elde edilen değerlerin literatüre paralel olduğu izlenmektedir. Hem Trx, hem L-name gruplarında hem de ikisinin beraber uygulandığı grupta I/R grubuna göre SOD, GPx ve tGSH düzeyleri anlamlı olarak yükselmiş olarak saptanmıştır. Ayrıca korelasyon sonuçları da incelenince (Tablo 7, Şekil 30-31) NO düzeyleri ile GPx, SOD ve tGSH arasında da anlamlı bir negatif korelasyon olduğu izlenmektedir.

Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ($L\cdot$) ve lipid peroksit radikallerinin ($LOO\cdot$) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna **"nonenzimatik lipid peroksidasyonu"** denir^{11,13,25}.

Lipid peroksidasyon ürünleri olan MDA ve HAE hücrede oksidatif stres düzeyini göstermek için kullanılan ürünlerdir. Çalışmamızda MDA ve HAE değerleri incelendiğinde I/R grubunda her ikisinin de değerinin sham grubuna göre yüksek olduğu izlenmektedir. Sonuçta I/R oksidatif stresi artırıcı süreç olduğu için bu beklediğimiz bir sonuçtur. Trx, L-name ve her ikisinin de beraber verdiği gruplarda ise MDA ve HAE değerlerinin I/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeylerde azaldığı izlenmektedir. Tioredoksin ve lipid peroksidasyon ürünlerinin ilişkisini inceleyen çalışmalar incelendiğinde, Trx'nin çeşitli çalışmalarda MDA ve HAE düzeylerini azaltıcı etkiler gösterdiği izlenebilir. Örneğin Xiao-wei ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi I/R sonrası 2. Saatte Trx verilen grupta MDA konsantrasyon I/R grubuna göre %24.8 (6.32 ± 0.83 , $p < 0.05$) oranında daha düşük olarak saptanmıştır²⁵⁴. Yomamoto ve arkadaşları DN-hTrx1 ratlarda (hTrx1'in

32Cys ve 35Cys mutasyon, Stratagene, La Jolla, California, USA) yaptıkları çalışmalarda, DN-hTrx1 ratlarda normal ratlara göre MDA ve HAE seviyelerini belirgin olarak yüksek bulmuşlardır²⁵⁵. NO'nun lipid peroksidasyonuna etkisi bir çok çalışmada çalışılmıştır^{256,257}. NO I/R zedelenmelerinde hem sitoprotektif hemde sitotoksik etki göstermektedir²⁵⁸. Demir ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda E.coli verilen hastalarda MDA değerlerini yüksek olarak bulurken, L-name verilenlerde MDA değerlerinin belirgin olarak azaldığını göstermişlerdir²⁵⁸. Bizim çalışmamızda incelendiğinde, hem Trx hemde L-name verilen gruplarda MDA ve HAE değerlerinin I/R grubuna göre azaldığı izlenebilir. Ayrıca korelasyon sonuçları incelendiğinde NO düzeyleriyle MDA ve HAE düzeyleri arasında anlamlı bir pozitif korelasyon olduğu izlenebilir.

Apoptoz değerlendirme sonuçlarımız incelendiğinde elde edilen apoptotik hücre sayımlarının gruplar içinde homojen, ancak gruplar arasında heterojen dağıldığı ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlenmektedir. Sham grubuyla I/R grubu kıyaslandığında, apoptoz oranlarının I/R grubunda daha yüksek olduğu izlenmektedir. Trx hücre proliferasyonunu ve kanser hücre gelişimini uyarmaktadır. Ayrıca Trx ROS'lar gibi maddelerin uyardığı apoptozise karşıda korucu etkiler göstermektedir²⁵⁹. Fakat Trx'in apoptozu nasıl engellediği tam olarak anlaşılamamıştır. Trx peroksidazın oksidatif stresin uyardığı apoptozisi engellediği gösterilmiştir. Ayrıca redükte Trx apoptozis sinyal-düzenleyici kinaz-1 (ASK-1) ile stabil bir kompleks oluşturup, ASK-1'in inhibisyonunu gerçekleştirerek hücreyi apoptozdan korumaktadır. Bizim bulduğumuz sonuçlarda da Trx verilen grupta apoptoz oranı, I/R grubuna göre düşük olarak saptanmıştır. NO düşük miktarlarda sitoprotektif, yüksek miktarlarda ise sitotoksik etki gösteren bir moleküldür²⁵⁸. Yapılan çalışmalarda NO hem kendisinin radikal gibi davrandığı hem de süperoksid gibi ROS'larla reaksiyona girerek NO'e göre çok daha potent etkili olan peroksinitrit radikaline dönüştüğü gösterilmiştir. Bunun yanında NO pro-apoptotic

tümör supresyon proteini p53'ün de novo transkripsiyonunu artırarak apopiozu uyarmaktadır²⁶⁰. Sandau ve arkadaşları siklosporin verilerek NOS aktivitesi artırılan hücre kültür ortamına L-name eklenmesiyle apopitoz oranının belirgin şekilde azaldığını göstermişlerdir²⁶⁰. Bu ve benzeri bir çok çalışma NO'nun pankreas β hücreleri ve vasküler düz kas ücreleri gibi bir çok hücre tipinde apopitozu artırdığı gösterilmiştir²⁶¹⁻²⁶⁴. Bizim çalışmamızda da, literatürde NO apopitoz ilişkisini inceleyen çalışmalarda elde edilen sonuçlara paralel olarak, L-name ve L-name ile Trx'nin beraber verildiği gruplarda apopitoz oranlarını I/R grubuna göre belirgin olarak düşük olduğu gösterilmiştir. 47

Tüm elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde bir antioksidan peptid olan Trx'in karaciğer I/R modelinde koruyucu etkiler gösterdiğini söylemek olasıdır. Aynı şekilde NO'nin koruyucu etkileri bulunsa da, yüksek miktarda NO oluşumunun engellenmesinde I/R'da koruyucu etkiler gösterdiği söylenebilir.

6. SONUÇ

I/R zedelenmesi hücre ve doku hasarına yol açan kompleks bir olaylar dizisidir. Bu güne kadar yapılan çalışmalarla I/R zedelenmesinin fizyopatolojisi tam olarak ortaya konamamıştır. Bizde çalışmamızda I/R zedelenmesinde tioredoksinin ve NO'nun rollerini araştırmaya çalıştık.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, rekombinant Trx uygulanması I/R sürecinde karaciğer hücre zedelenmesini azaltmaktadır. Bunun kanıtı olarak da Trx'in uygulanması sonucu ALP, ALT, AST, LDH ve GGT düzeylerinde belirgin azalma izlenmiştir. Ayrıca Trx uygulanmasının MDA ve HAE gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşumunu, adezyon moleküllerinin salınımını ve apoptoz oranlarını da azalttığı çalışmadan elde edilen sonuçlardan rahatlıkla izlenebilir. Aynı zamanda Trx uygulanması karaciğerde hücresel düzeyde SOD, GPx ve tGSH gibi antioksidan enzim ve maddelerde artış yaratmıştır.

NO ile ilgili bulgular incelendiğinde, üretilen NO miktarına göre etkilerinin de değiştiği izlenebilir. NO sayesinde doku, kan akımının devamını sağlamaktadır. Ancak NO kontrolsüz şekilde yüksek miktarlarda üretildiği zaman, fazla vazodilatasyon oluşumu ve buna bağlı kan akımının bozulması ve fazla miktarda peroksinitrit oluşumu gibi mekanizmalarla hasarı da artırmaktadır. Bizim yaptığımız çalışmada NOS enziminin L-name ile inhibisyonu sonucu ALP, ALT, AST ve P-selektin düzeylerinin I/R grubuna göre belirgin azaldığı, ancak azalmanın Trx verilen gruba göre daha az olduğu izlenmektedir. Bunun yanında L-name verilen grupta LDH, ET-1, NO, MDA düzeyleri ve apoptoz oranları I/R grubuna göre anlamlı olarak azalmış ve buradaki azalmanın Trx verilen gruba göre de belirgin olarak fazla olduğu izlenmiştir. SOD, GPx ve tGSH düzeylerinde L-name verilen grupta I/R grubuna göre artış olduğu izlenmektedir. SOD düzeylerindeki artışın Trx verilen gruptan daha fazla olduğu, GPx ve

tGSH düzeylerindeki artışın ise Trx grubuna göre daha düşük olduğu izlenebilir.

Trx ve L-name'in beraber verildiği grupta hem ALP, ALT, LDH, GGT enzimlerde hem de ET-1 ve P-selektin gibi moleküllerde en belirgin azalmalar izlenmiştir. Ayrıca SOD, GPx ve tGSH düzeylerindeki en yüksek artışların ve apoptozisde en belirgin azalmanında Trx ve L-name'in beraber verildiği gruplarda olduğu izlenebilir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde tek başına Trx veya L-name uygulamakla, her iki maddenin beraber verilmesi arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Trx'in I/R zedelenmesinde, hasarı azaltmada önemli antioksidanlardan biri olduğunu ve fazla NO'nun baskılanmasında koruyucu etkiler ortaya çıkaracağını düşünmekteyiz.

9. KAYNAKLAR

1. Majino G, Jorris I. Apopitosis, oncosis, and necrosis. An overview of the cell death. *Am J Pathol* 1995; 146:3-9.
2. Zimmerman BJ, Granger N. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992; 72:65-83.
3. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986; 250:G749-753.
4. Horton JW, Walker PB. Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. *J Appl* 1993; 74:1515-1520.
5. Jaeschke H, Smith CV, Mitchell JR. Reactive oxygen species during ischemia-reflow injury in isolated perfused rat liver. *J Clin Invest* 1988; 81:1240-46.
6. Bilboa G, Contreras JL, Eckhoff DE. Reduction of ischemia-reperfusion injury of the liver by in vivo Adenovirus-mediated gene transfer of the antiapoptotic Bcl-2 gene. *Ann Surg* 1996; 83:162-170.
7. Weight SC, Bell PRF, Nicholson ML. Renal ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1996; 83:162-170.
8. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anest* 2001; 94:1133-1138.
9. Zhang W, Wang M, Xie HY, Zhou L, Meng XQ, Shi J, et al. Role of Reactive Oxygen species in mediating hepatic ischemia-reperfusion injury and its therapeutic applications in liver transplantation. *Transplant proceed* 2007; 39:1332-37.
10. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine, 2nd ed. Oxford, UK: Oxford University Press 1989:543pp.
11. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41/12:1819-1828.

12. Altınışık M. Serbest radikaller (belge) 2000-2001 Yılı anabilimdalı seminerleri. Available from: URL: www.mustafaaltinisik.org.uk/sunumlarim.htm
13. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper Biyokimya. Dikmen N, Özgüven T (Çev). Asım, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 2004.
14. Free oxygen and Thiyl radicals (online).2006 (cited 03.09.2008). Available from:URL: <http://www.cyberlipid.org/perox/oxid0003.htm>.
15. Christophersen AG, Jun H, Jørgensen K, Skibsted LH. Photobleaching of astaxanthin and canthaxanthin: quantum-yields dependence of solvent, temperature, and wavelength of irradiation in relation to packaging and storage of carotenoid pigmented salmonoids. Z. Lebensm. Unters Forsch 1991; 192:433-439.
16. Deby C, Goutier R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. Biochem Pharmacol 1990; 39:399-405.
17. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. Science 1978; 201:875-880.
18. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. Clin Chem 2006; 52:4:601-623.
19. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase, an enzymic function of erythrocyte (hemocuprein). J Biol Chem 1969; 244:6049-55.
20. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev 1979; 59: 527-605.
21. Moshage H. Nitric oxide determinations: Much ado about NO^{*}-Thing? Clin Chem 1997; 43:4:553-556.
22. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J 1994; 298:249-58.

23. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-42.
24. Candieias LP, Stradford MRL, Wardman P. Free hydroxyl radicals are formed as reaction of hypochlorous acid with ferrocyanide, a model iron (II) kompleks. *Free Radic Res Commun* 1994; 20:241-9.
25. Burtis CA, Ashwood ER, Burns DE. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania; 2006.
26. Alan H.B . *Clinical Guide to Laboratory Tests*. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania; 2006.
27. Akkuş İ. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*. Mimoza Yayınları. Konya; 1995.
28. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Brit J Surg* 1994; 81:637-47.
29. Aktan S, Aykut C, Yegen BÇ Özkutlu, Okar I, Ercan S. Prostaglandin E2 and leukotriene C4 levels following different reperfusion periods in rat brain correlated with morphological changes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1992; 46:287-90.
30. Gutteridge JMC. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun* 1993;19:141-158.
31. Gutteridge JMC. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett* 1986; 20:291-295.
32. Vardanian AJ, Busuttil RW, Kepiec-Weglinski J. Molecular mediators of liver Ischemia and Reperfusion Injury: A Brief Review. *Mol Med* 2008; 14(5-6):337-345.
33. Chervu A, Homsher E, Moore WS, Quinones-Baldrich WJ. Differential recovery of skeletal muscle and peripheral nerve function after ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 1989; 47:12-19.

34. Deitch EA. Multiple organ failure. *Ann Surg* 1992; 216:117-34.
35. Bengisun U, Köksoy C, Bengisun JS, Bayraktaroglu G, Çamur A, Aras N. Ischemia and reperfusion injury: prevention of pulmonary hypertension and leukosequestration following lower limb ischemia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997; 56:117-20.
36. Taneri F, Ersoy E, Tekin EH, Bozkurt S, Kantarcı S, Yavuzer R. Serbest oksijen radikallerinin ince barsak anastomozlarına etkileri. *Klin Deney Cerrah Derg* 1996; 4:142-146.
37. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986; 250:G749-53.
38. Huguet C, Addario-Chieco P, Gavelli A, Arrigo E, Harb J, Clement RR. Technique of hepatic vascular exclusion for extensive liver resection. *Am J Surg* 1992; 163:602-5.
39. Delva E, Camus Y, Nordlinger B, Hannoun L, Parc R, Deriaz H, et al. Vascular occlusions for liver resections. Operative management and tolerance to hepatic ischemia: 142 cases. *Ann Surg* 1989; 209:211-8.
40. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284:G15-G26.
41. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2002;105:248-58.
42. Toledo-Pereyra LH, Toledo AH, Walsh J, Lopez-Neblina F. Molecular signaling pathways in ischemia/reperfusion. *Exp Clin Transplant* 2004; 2:174-7.
43. Videla LA, Fernandez V. Biochemical aspects of cellular oxidative stress. *Arch Biol Med Exp (Santiago)* 1988; 21:85-92.
44. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci* 1990; USA 87:1620-4.

45. Glantzounis GK, Yang W, Koti RS, Mikhailidis DP, Seifalian AM, Davidson BR. The role of thiols in liver ischemia-reperfusion injury. *Current Pharmaceutical Design* 2006; 12:2891-2901.
46. McCord JM. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312:159-63.
47. Mosher B, Dean R, Harkeman J, Remick D, Palma J, Crockett E. Inhibition of chemokines production by Kupffer cells decreased hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *J Surg Res* 2001; 992:201.
48. Zhang W, Wang M, Xie HY, Zhou L, Meng XQ, Shi J, et al. Role of reactive oxygen species in mediating hepatic ischemia-reperfusion injury and its therapeutic applications in liver transplantation. *Transplant Proceed* 2007; 39:1332-1337
49. Poli G, Cutrin JC, Biasi F. Lipid peroxidation in the reperfusion injury of the liver. *Free Radic Res* 1998; 28:547-51.
50. Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *J Mol Med* 1999; 77: 577-592.
51. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 718-724.
52. Jaeschke H, Ho YS, Fisher MA, Lawson JA, Farhood A. Glutathione peroxidase deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress. *Hepatology* 1999; 29: 443-450.
53. Bautista AP, Spitzer JJ. Platelet activating factor stimulates and primes the liver, Kupffer cells and neutrophils to release superoxide anion. *Free Radic Res Commun* 1992; 17:195-209.
54. Essani NA, Fisher MA, Jaeschke H. B by dimethyl sulfoxide correlates with suppression of TNF- α Inhibition of NF- formation, reduced ICAM-1 gene transcription, and protection against endotoxin-induced liver injury. *Shock* 1997; 7:90-96.

55. Rensing H, Jaeschke H, Bauer I, Patau C, Datene V, Pannen BH, et al. Differential activation pattern of redox-sensitive transcription factors and stress-inducible dilator systems heme oxygenase-1 and inducible nitric oxide synthase in hemorrhagic and endotoxic shock. *Crit Care Med* 2001; 29:1962-1971.
56. Zwacka RM, Zhou W, Zhang Y, Darby CJ, Dudus L, Halldorson J, et al. Redox gene therapy for ischemia/reperfusion injury of the liver reduces AP1 and NF-kappaB activation. *Nat Med* 1998; 4: 698-704.
57. Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species. *Am J Physiol Cell Physiol* 1997; 272: C1286-C1294.
58. Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B, Lemasters JJ. Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochem J* 1995; 307: 99-106.
59. Elimadi A, Sapena R, Settaf A, Le Louet H, Tillement J, Morin D. Attenuation of liver normothermic ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial functions with S-15176, a potent trimetazidine derivative. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 509-516.
60. Leducq N, Delmas-Beauvieux MC, Bourdel-Marchasson I, Dufour S, Gallis JL, Canioni P, et al. Mitochondrial and energetic dysfunctions of the liver during normothermic reperfusion: protective effect of cyclosporine and role of the mitochondrial permeability transition pore. *Transplant Proc* 2000; 32: 479-480.
61. Grattagliano I, Vendemiale G, Lauterburg BH. Reperfusion injury of the liver: role of mitochondria and protection by glutathione ester. *J Surg Res* 1999; 86: 2-8.
62. Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DD, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplant* 2002; 73: 493-499.
63. Mavrier P, Preaux AM, Guigui B, Lescs MC, Zafrani ES, Dhumeaux D. In vitro toxicity of polymorphonuclear neutrophils to rat

hepatocytes: evidence for a proteinase-mediated mechanism. *Hepatology* 1988; 8: 254-258.

64. Kim YI, Hwang YJ, Song KE, Yun YK, Lee JW, Chun BY. Hepatocyte protection by a protease inhibitor against ischemia/reperfusion injury of human liver. *J Am Coll Surg* 2002; 195:41-50.
65. Kushimoto S, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Harada N, Okabe H, et al. Role of granulocyte elastase in ischemia/reperfusion injury of rat liver. *Crit CareMed* 1996; 24: 1908-1912.
66. Li XK, Matin AFM, Suzuki H, Uno T, Yamaguchi T, Harada Y. Effect of protease inhibitor on ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Transplantation* 1993; 56: 1331-1336
67. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989; 320: 365-376.
68. Bilzer M, Jaeschke H, Vollmar AM, Paumgartner G, Gerbes AL. Prevention of Kupffer cell-induced injury in rat liver by atrial natriuretic peptide (ANP): A novel endogenous defense mechanism against oxidant injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1999; 276: G1137-G1144.
69. Zhang B, Borderie D, Sogni P, Soubrane O, Houssin D, Calmus Y. NO-mediated vasodilation in the rat liver. Role of hepatocytes and liver endothelial cells. *J Hepatol* 1997; 26:1348-1355.
70. Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002; 35: 478-491.
71. Ming Z, Han C, Lautt WW. Nitric oxide mediates hepatic arterial vascular escape from norepinephrine-induced constriction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1999; 277: G1200-G1206.
72. McCuskey RS. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. *Liver* 2000; 20: 3-7.

73. Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: The role of superoxide, peroxynitrite and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25:392-403.
74. Thiemermann C, Ruetten H, Wu CC, Vane JR. The multiple organ dysfunction syndrome caused by endotoxin in the rat: attenuation of liver dysfunction by inhibitors of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 1995; 116:2845-2851
75. Chun K, Zhang J, Biewer J, Ferguson D, Clemens MG. Microcirculatory failure determines lethal hepatocyte injury in ischemic/reperfused rat livers. *Shock* 1994; 1:3-9.
76. Koo A, Komatsu H, Tao G, Inoue M, Guth PH, Kaplowitz N. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology* 1991; 15:507-514.
77. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 1994; 145: 1421-1431.
78. McCuskey RS, Urbaschek R, Urbaschek B. The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovasc Res* 1996; 32: 752-763.
79. Yokoyama Y, Baveja R, Sonin N, Nakanishi K, Zhang JX, Clemens MG. Altered endothelin receptor subtype expression in hepatic injury after ischemia/reperfusion. *Shock* 2000; 13:72-78.
80. Wang Y, Mathews WR, Guido DM, Farhood A, Jaeschke H. Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates reperfusion injury after hepatic ischemia and endotoxemia. *Shock* 1995; 4: 282-288.
81. Harbrecht BG, Wu B, Watkins SC, Marshall HP Jr, Peitzman AB, Billiar TR. Inhibition of nitric oxide synthase during hemorrhagic shock increases hepatic injury. *Shock* 1995; 4:332-337.
82. Ulukaya-Durakbasa Ç, Daglı TE, Mouni H, Haklar G, Aktan AÖ, Bilsel AS, ve ark. Nitric oxide and endothelial relationship in intestinal ischemiareperfusion injury. XLIV. Annual International Congress of Pediatric Surgery 22-25 July 1997, Istanbul.

83. Ignarro LJ. Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int Suppl* 1996; 55:S2-5.
84. Clemens MG. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology* 1999; 30:1-5.
85. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298:249-58.
86. Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, Seok JH, et al. Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kappa B. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261:917-22.
87. Yagnik GP, Takahashi Y, Tsoulfas G, Reid K, Murase N, Geller DA. Blockade of the L-arginine/NO synthase pathway worsens hepatic apoptosis and liver transplant preservation injury. *Hepatology* 2002; 36:573-81.
88. Kaizu T, Ikeda A, Nakao A, Takahashi Y, Tsung A, Kohmoto J, et al. Donor graft adenoviral iNOS gene transfer ameliorates rat liver transplant preservation injury and improves survival. *Hepatology* 2006; 43:464-73.
89. Scommotau S, Uhlmann D, Loffler BM, Breu V, Spiegel HU. Involvement of endothelin/nitric oxide balance in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Langenbecks Arch Surg* 1999; 384:65-70.
90. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia-reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 1990; 4: 3355-3359.
91. Del Zoppo GJ, Schmid-Schonbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 1991; 22:1276-1283.
92. Murota S, Fujita H, Wakabayashi Y, Morita I. Cell adhesion molecule mediates endothelial cell injury caused by activated neutrophils. *Keio Journal of Medicine* 1996; 45:207-212.

93. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *New Engl J Med* 1989; 320:365-376.
94. Bjork J, Hedqvist P, Arfors KE. Increase in vascular permeability induced by leukotriene B₄ and the role of polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* 1982; 6:189-200.
95. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 1994; 55:662-675.
96. Griffin JD, Spertini O, Ernst TJ, Belvin MP, Levine HB, Kanakura Y, et al. Granulocytemacrophage colony-stimulation factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors. *J Immunol* 1990; 145:576-584.
97. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* 1993; 91: 379-387.
98. Lasky LA. Selectin carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Ann Rev Biochem* 1995; 64:113-139.
99. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 9 1995; 866-873.
100. Kubes P, Jutila M, Payne D. Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* 1995; 95: 2510-2519.
101. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone Jr MA, Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecules: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 1989; 243:1160-1165.
102. Anrather J, Csizmadia V, Brostjan C, Soares MP, Bach FH, Winkler H. Inhibition of bovine endothelial cell activation in vitro by regulated expression of a transdominant inhibitor of NF-kappa B. *J Clin Invest* 1997; 99:763-772.
103. Lasky LA. Selectin carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Ann Rev Biochem* 1995; 64:113-139.

104. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone Jr. MA, Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecules: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 1989; 243:1160-1165.
105. Griffin JD, Spertini O, Ernst TJ, Belvin MP, Levine HB, Kanakura Y, et al. Granulocytemacrophage colony-stimulation factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors. *J Immunol* 1990; 145:576-584
106. Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. Impact of leukocyte-endothelial interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1994; 267:G786-G783.
107. Sawaya DE, Zibari GB, Minardi A, Bilton B, Burney D, Granger DN, et al. P-selectin contributes to the initial recruitment of rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia/reperfusion. *Shock* 1999;12: 227-232.
108. Jaeschke H. Cellular adhesion molecules: regulation and functional significance in the pathogenesis of liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1997;273:G602-G611.
109. Rentsch M, Post S, Palma P, Lang G, Menger MD, Messmer K. Anti-ICAM-1 blockade reduces postsinusoidal WBC adherence following cold ischemia and reperfusion, but does not improve early graft function in rat liver transplantation. *J Hepatol* 2000; 32: 821-828.
110. Vollmar B, Glasz J, Menger MD, and Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery* 1995; 117: 195-200.
111. Chosay JG, Essani NA, Dunn CJ, Jaeschke H. Neutrophil margination and extravasation in sinusoids and venules of the liver during endotoxin-induced injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1997; 272: G1195-G1200.

112. Essani NA, Fisher MA, Farhood A, Manning AM, Smith CW, Jaeschke H. Cytokine-induced hepatic intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) mRNA expression and its role in the pathophysiology of murine endotoxin shock and acute liver failure. *Hepatology* 1995; 21:1632-1639.
113. Farhood A, McGuire GM, Manning AM, Miyasaka M, Smith CW, Jaeschke H. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in the liver. *J Leukoc Biol* 1995; 57: 368-374.
114. Fox-Robichaud A, Kubes P. Molecular-stimulated leukocyte recruitment into the mechanisms of tumor necrosis factor murine hepatic circulation. *Hepatology* 2000; 31: 1123-1127.
115. Jaeschke H, Farhood A, Fisher MA, Smith CW. Sequestration of neutrophils in the hepatic vasculature during endotoxemia 2 integrins and intercellular adhesion molecule-1. *Shock* 1996; 6:345-350.
116. Wong J, Johnston B, Lee SS, Bullard DC, Smith CW, Beaudet AL, et al. A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature. *J Clin Invest* 1997; 99: 2782-2790.
117. Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1996; 270:G798-G803.
118. Lawson JA, Burns AR, Farhood A, Bajt ML, Collins RG, Smith CW, et al. Pathophysiological importance of E- and L-selectin for neutrophil-induced liver injury during endotoxemia in mice. *Hepatology* 2000;32: 990-998.
119. Nagendra AR, Mickelson JK, Smith CW. CD18 integrin and CD54-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated human hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1997; 272:G408-G416.

120. Maroushek-Boury N, Czyprynski CJ. *Listeria monocytogenes* infection increases neutrophil adhesion and damage to a murine hepatocyte cell line in vitro. *Immunol Lett* 1995; 46:111-116.
121. Shappell SB, Toman C, Anderson DC, Taylor AA, Entman ML, Smith CW. Mac-1 (CD11b/CD18) mediates adherence-dependent hydrogen peroxide production by human and canine neutrophils. *J Immunol* 1990; 144:2702-2711.
122. Bell FP, Essani NA, Manning AM, Jaeschke B. Ischemia-reperfusion activates the nuclear transcription factor NF-KB upregulates messenger RNA synthesis of adhesion molecules in the liver in vivo. *Hepatol Res* 1997; 8:178-188.
123. Essani NA, Fisher MA, Simmons CA, Hoover JL, Farhood A, Jaeschke H. Increased P-selectin gene expression in the liver vasculature and its role in the pathophysiology of neutrophil-induced liver injury in murine endotoxin shock. *J Leukoc Biol* 1998; 63:288-296.
124. Yadav SS, Howell DN, Steeber DA, Harland RC, Tedder TF, Clavien PA. P-selectin mediates reperfusion injury through neutrophil and platelet sequestration in the warm ischemic mouse liver. *Hepatology* 1999; 29:1494-1502.
125. Sawaya Jr DE, Zibari GB, Minardi A, Bilton B, Burney D, Granger DN, et al. P-selectin contributes to the initial recruitment of rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia/reperfusion. *Shock* 1999; 12:227-232.
126. Rivera-Chavez F, Toledo-Pereyra LH, Nora DT, Bachulis B, Ilgenfritz F, Dean RE. P-selectin blockade is beneficial after uncontrolled hemorrhagic shock. *J Trauma* 1998; 45:440-445.
127. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1993; 264:G801-G809.
128. Straatsburg IH, Boermeester MA, Wolbink GJ, vanGulik TM, Gouma DJ, Frederiks WM, Hack CE. Complement activation

induced by ischemia-reperfusion in humans: a study in patients undergoing partial hepatectomy. *J Hepatol* 2000; 32:783-791.

129. Bajt ML, Farhood A, Jaeschke H. Effects of CXC chemokines on neutrophil activation and sequestration in the hepatic vasculature. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281:G1188-G1195.
130. Witthaut R, Farhood A, Smith CW, Jaeschke H. Complement and tumor necrosis factor- upregulation and systemic neutrophil activation during endotoxemia in vivo. *J Leukoc Biol* 1994;55:105-111.
131. Chavez-Cartaya RE, DeSola GP, Wright L, Jamieson NV, White DJ. Regulation of the complement cascade by soluble complement receptor type 1. Protective effect in experimental liver ischemia and reperfusion. *Transplantation* 1995; 59:1047-1052.
132. Scoazec JY, Borghi-Scoazec G, Durand F, Bernuau J, Pham BN, Belghiti J, et al. Complement activation after ischemia-reperfusion in human liver allografts: incidence and pathophysiological relevance. *Gastroenterology* 1997; 112:908-918.
133. Klar E, Post S. Impact of inhibition of complement by sCR1 on hepatic microcirculation after warm ischemia. *Microvasc Res* 2001; 62:284-292.
134. Fong Y, Moldawer LL, Shires GT, Lowry SF. The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical injury. *Surg Gynecol Obstet* 1990; 170:363-78.
135. Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. *Crit Care Med* 1993; 21:S447-63.
136. Thornton AJ, Strieter RM, Lindley I, Baggiolini M, Kunkel SL. Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes. *J Immunol* 1990; 144:2609-13.
137. Morariu AM, Loeff BG, Aarts LP, Rietman GW, Rakhorst G, van Oeveren W, et al. Dexamethasone: benefit and prejudice for patients undergoing on-pump coronary artery bypass grafting: a

study on myocardial, pulmonary, renal, intestinal, and hepatic injury. *Chest* 2005; 128:2677-87.

138. Chen X, Kidder LS, Schmidt AH, Lew WD. Osteogenic protein-1 induces bone formation in the presence of bacterial infection in a rat intramuscular osteoinduction model. *J Orthop Trauma* 2004; 18:436-42.
139. Lichtman SN, Lemasters JJ. Role of cytokines and cytokine-producing cells in reperfusion injury to the liver. *Semin Liver Dis* 1999; 19:171-87.
140. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, et al. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 1996; 23:506-14.
141. Shibuya H, Ohkohchi N, Tsukamoto S, Satomi S. Tumor necrosis factor-induced, superoxidemediated neutrophil accumulation in cold ischemic/reperfused rat liver. *Hepatology* 1997; 26:113-20.
142. Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M, Oshima A, Shito M, Kawachi S, et al. Up-regulation of oxygen-derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 1997; 64:1398-403.
143. Arii S, Monden K, Adachi Y, Zhang W, Higashitsuji H, Furutani M, et al. Pathogenic role of Kupffer cell activation in the reperfusion injury of cold-preserved liver. *Transplantation* 1994; 58:1072-7.
144. Kiuchi T, Oldhafer KJ, Schlitt HJ, Nashan B, Deiwick A, Wonigeit K, et al. Background and prognostic implications of perireperfusion tissue injuries in human liver transplants: a panel histochemical study. *Transplantation* 1998;66:737-47.
145. Shito M, Wakabayashi G, Ueda M, Shimazu M, Shirasugi N, Endo M, et al. Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation* 1997; 63:143-8.
146. Hines IN, Harada H, Bharwani S, Pavlick KP, Hoffman JM, Grisham MB. Enhanced post-ischemic liver injury in iNOS-deficient mice: a

cautionary note. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284:972-976.

147. Zhou W, McCollum MO, Levine BA, Olson MS. Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology* 1992;16: 1236-1240.
148. Curzio M, Esterbauer H, Di Mauro C, Cecchini G, Dianzani MU. Chemotactic activity of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and homologous hydroxyalkenals. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1986; 367:321-329.
149. Hughes H, Farhood A, Jaeschke H. The role of leukotriene B₄ in the pathogenesis of hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1992; 45:113-119.
150. Schultz RM, Marder P, Spaethe SM, Herron DK, Sofia MJ. Effects of two leukotriene B₄ (LTB₄) receptor antagonists (LY255283 and SC-41930) on LTB₄-induced human neutrophil adhesion and superoxide production. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1991; 43:267-271.
151. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37:517-54.
152. Tsuchihashi S, Fondevila C, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase system in ischemia and reperfusion injury. *Annals of Transplant* 2004; 9(1):84-87.
153. Fondevila C, Shen XD, Tsuchiyashi S, Yamashita K, Csizmadia E, Lassman C et al. Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury. *Hepatology (Baltimore)* 2004; 40:1333-41.
154. Fondevila C, Ghobrial RM, Fuster J, Bombay E, García-Valdecasas JC, Busuttil RW. Biliary complications after adult living donor liver transplantation. *Transplant Proc* 2003; 35:1798-9.
155. Kato Y, Shimazu M, Kondo M, Uchida K, Kumamoto Y, Wakabayashi G, et al. Bilirubin rinse: a simple protectant against the rat liver graft injury mimicking heme oxygenase-1 preconditioning. *Hepatology (Baltimore)* 2003;38:364-73.

156. Tang LM, Wang YP, Wang K, Pu LY, Zhang F, Li XC, et al. Exogenous biliverdin ameliorates ischemia-reperfusion injury in small-for-size rat liver grafts. *Transplant Proc* 2007; 39:1338-44.
157. Kaizu T, Nakao A, Tsung A, Toyokawa H, Sahai R, Geller DA, et al. Carbon monoxide inhalation ameliorates cold ischemia/reperfusion injury after rat liver transplantation. *Surgery* 2005; 138:229-35.
158. Amersi F, Shen XD, Anselmo D, Melinek J, Iyer S, Southard DJ, et al. Ex vivo exposure to carbon monoxide prevents hepatic ischemia/reperfusion injury through p38 MAP kinase pathway. *Hepatology (Baltimore)* 2002; 35:815-23.
159. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology* 2001; 33: 397-405.
160. Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, Crenesse D, Rostagno P, Maulon L, et al. A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *FASEB J* 1999; 13:253-261.
161. Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation* 1999; 67:1099-1105.
162. Sies H. Physiological society symposium: Impaired endothelial and smooth muscle Cell function in oxidative stress. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol* 1997; 82 (2):291-5.
163. Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des* 2004; 10(14):1677-94.
164. Chaudière J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* 1999; 37(9-10):949 - 62.
165. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993; 215(2):213 - 9.

166. Zelko I, Mariani T, Folz R. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(3):337-49.
167. Bannister J, Bannister W, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 1987; 22(2):111-80.
168. Nozik-Grayck E, Suliman H, Piantadosi C. Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(12):2466-71.
169. Meister A, Anderson M. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52:711- 60.
170. Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(9-10):951-65.
171. Ho Y, Magnenat J, Bronson R, Cao J, Gargano M, Sugawara M, Funk C. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem* 1997; 272 (26):16644-51.
172. Hayes J, Flanagan J, Jowsey I. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45:51-88.
173. Sharma R, Yang Y, Sharma A, Awasthi S, Awasthi Y. Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6(2):289-300.
174. Chelikani P, Fita I, Loewen P. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(2):192-208.
175. Zámocki M, Koller F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Prog Biophys Mol Biol* 1999; 72(1):19-66.
176. del Río L, Sandalio L, Palma J, Bueno P, Corpas F. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radic Biol Med* 1992; 13(5):557-80.

177. Smirnoff N. L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitam Horm* 2001; 61:241-66.
178. Padayatty S, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J, et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 2003; 22(1):18 - 35.
179. Herrera E, Barbas C. Vitamin E action, metabolism and perspectives. *J Physiol Biochem* 2001; 57(2):43-56.
180. Packer L, Weber SU, Rimbach G. Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J Nutr* 2001; 131(2):369S-73S.
181. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 2007; 43(1):4-15.
182. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 1997; 29(8):363-72.
183. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M, Calvo JR. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biological signals and receptors* 2000; 9(3-4):137-59.
184. Meister A, Anderson M. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52:71-60.
185. Laurent TC, Moore EC, Reichard P. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. Iv. Isolations and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia Coli*. *B J Biol Chem* 1964; 239:3436-3444.
186. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 1989; 264:13963-13966
187. Holmgren A. Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* 1995; 3:239-243

188. Jacquot JP, Rivera-Madrid R, Marinho P, Kollarova M, Le Marechal P, Migniac-Maslow M, et al. Arabidopsis thaliana NADPH thioredoxin reductase: cDNA characterization and expression of the recombinant protein in Escherichia coli. J Mol Biol 1994; 235:1357-1363
189. Fujii S, Nanbu Y, Nonogaki H, Konishi I, Mori T, Masutani H, et al. Coexpression of adult T-cell leukemia-derived factor, a human thioredoxin homologue, and human papillomavirus DNA in neoplastic cervical squamous epithelium. Cancer 1991; 68:1583-1591.
190. Gasdaska JR, Berggren M, Powis G. Cell growth stimulation by the redox protein thioredoxin occurs by novel helper mechanism. Cell Growth Differ 1995; 6:1643-1650.
191. Katti SK, LeMaster DM, Eclund H. Crystal structure of thioredoxin from E. coli at 1.68 Å resolution. J Mol Biol 1990; 212:167-184.
192. Tagaya Y, Maeda Y, Mitsui A, Kondo N, Matsui H, Hamuro J, et al. ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. EMBO J 1989; 8:757-764.
193. Clarke FM, Orozco C, Perkins AV, Cock I, Tonissen KF, Robins AJ, et al. Identification of molecules involved in the 'early pregnancy factor' phenomenon. J Reprod Fertil 1991; 93:525-539.
194. Gasdaska PY, Oblong JE, Cotgreave IA, Powis G. The predicted amino acid sequence of human thioredoxin is identical to that of the autocrine growth factor human adult T-cell derived factor (ADF): thioredoxin mRNA is elevated in some human tumors. Biochim Biophys Acta 1994; 1218:292-296.
195. Weichsel A, Gasdaska JR, Powis G, Montfort WR. Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer. Structure 1996; 4:735-751
196. Bodenstein J, Follmann H. Characterization of two thioredoxins in pig heart including a new mitochondrial protein. Z Naturforsch 1991; 46:270-9.

197. Stefankova P, Kollarova M, Barak I. Thioredoxin-Structural and functional complexity. *Gen Physiol Biophys* 2005; 24:3-11.
198. Holmgren A. Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 1985; 54:237-271.
199. Martin JL. Thioredoxin—a fold for all reasons. *Structure* 1995; 3:245-250.
200. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001; 30:1191-1212.
201. Arner ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000; 267:6102-6109.
202. Mitsui A, Hirakawa T, Yodoi J. Reactive oxygen-reducing and protein-refolding activities of adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186:1220-1226.
203. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31:1287-1312.
204. Baker A, Payne CM, Briehl MM, Powis G. Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer, inhibits apoptosis in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1997; 57:5162-5167.
205. Berggren M, Gallegos A, Gasdaska JR, Gasdaska PY, Warneke J, Powis G. Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia. *Anticancer Res* 1996; 16:3459-3466.
206. Gasdaska PY, Oblong JE, Cotgreave IA, Powis G. The predicted amino acid sequence of human thioredoxin is identical to that of the autocrine growth factor human adult T-cell derived factor (ADF): thioredoxin mRNA is elevated in some human tumors. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1218:292-296.
207. Kawahara N, Tanaka T, Yokomizo A, Nanri H, Ono M, Wada M et al. Enhanced coexpression of thioredoxin and high mobility group protein 1 genes in human hepatocellular carcinoma and the

possible association with decreased sensitivity to cisplatin. *Cancer Res* 1996; 56:5330-5333.

208. Powis G, Mustacich D, Coon A. The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radic Biol Med* 2000; 29:312-322
209. Soini Y, Kahlos K, Napankangas U, Kaarteenaho-Wiik R, Saily M, Koistinen P et al. Widespread expression of thioredoxin and thioredoxin reductase in non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1750-1757
210. Haapasalo H, Kylaniemi M, Paunul N, Kinnula VL, Soini Y. Expression of antioxidant enzymes in astrocytic brain tumors. *Brain Pathol* 2003; 13:155-164.
211. Williams JrCH. Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *FASEB J* 1995; Oct 9(13):1267-76.
212. Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem J* 2000; 346:1-8.
213. Casso D, Beach D. A mutation in a thioredoxin reductase homolog suppresses p53-induced growth inhibition in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 1996; Oct16;252(5):518-29.
214. Lane DP. p53 and human cancers *Br Med Bull* 1994; 50, 582-599.
215. Powis G, Mustacich D, and Coon A. The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radic Biol Med* 2000; 29:312-322.
216. Soini Y, Kahlos K, Napankangas U, Kaarteenaho-Wiik R, Saily M, Koistinen P et al. Widespread expression of thioredoxin and thioredoxin reductase in non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1750-1757.
217. Haapasalo H, Kylaniemi M, Paunul N, Kinnula VL And Soini Y. Expression of antioxidant enzymes in astrocytic brain tumors. *Brain Pathol* 2003; 13:155-164.

218. Katti SK, LeMaster DM, Eclund H. Crystal structure of thioredoxin from *E. coli* at 1.68 Å resolution. *J Mol Biol* 1990; 212:167-184.
219. Almond NE, Wheatley AM. Measurement of hepatic perfusion in rats by laser Doppler flowmetry. *Am J physiol* 1992; 262:203.
220. Cotran RS, Kumar V, Collins T, eds. *Robbins Pathologic Basis of Disease*, 6th ed, Philadelphia, Pa: WB Saunders Co; 1999.
221. Dulkanchainun TS, Goss JA, Imagawa DK, Shaw GD, Anselmo DM, Kaldas F, et al. Reduction of hepatic ischemia/reperfusion injury by a soluble P-selectin glycoprotein ligand-1. *Ann Surg* 1998; 227:832-840.
222. Nakamura H, Herzenberg AL, Bai J, Araya S, Kondo N, Nishinaka Y, et al. Circulating thioredoxin suppresses lipopolysaccharide induced neutrophil chemotaxis. *PNAS* 2001; vol. 98,26:15143-15148.
223. Lush CW, Cepinskas G, Sibbald WJ, Kvietys RP. Endothelial E- and P-selectin expression in iNOS-deficient mice exposed to polymicrobial sepsis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280:G291-G297.
224. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995; 96:60-68.
225. Spiecker M, Darius H, Kaboth K, Hubner F, Liao JK. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *J Leukoc Biol* 1998; 63:732-739.
226. Takahashi M, Ikeda U, Masuyama J, Funayama H, Kano S, Shimada K. Nitric oxide attenuates adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Cytokine* 1996; 8:817-821.
227. Hansen JM, Zhang H, Jones DP. Mitochondrial Thioredoxin-2 Has a Key Role in Determining Tumor Necrosis Factor- α -Induced Reactive Oxygen Species Generation, NF- κ B Activation, and Apoptosis *Toxicological Sciences* 2006; 91(2):643-650.

228. Welsh SJ, Bellamy WT, Briehl M, Powis G. The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor-1 protein expression: Trx-1 over-expression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced angiogenesis. *Cancer Res* 2002; 62:5089-5095.
229. Nathan C, Xie Q. Nitric oxide synthesis: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78:915-918.
230. Jaffrey SR, Snyder SH Nitric oxide: a neural messenger. *Annu Rev Cell Biol* 1995; 11:417-440.
231. Henry Y, Lepoivre M, Drapier JC, Ducrocq C, Boucher JL, Gussani A. EPR characterization of molecular targets for J Neuro Chem 1993; 68(5):1896-99.
232. Brune B, Dimmeler S, Molina Vedia L, Lapetina EG. Nitric oxide: a signal expression in response to endotoxin. *Free Radic Biol Med* 1994; 21:533-540.
233. Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 1994; 78:913-936.
234. Kröncke KD, Fehsel K, Schmidt T, Zenke FT, Dasting I, Wesener JR, et al. Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. *Biochem. Biophys Res Commun* 1994; 200:1105-1110.
235. Ribeiro JMC, Hazzard JMH, Nussenzveig RH, Champagne DE, Walker FA. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. *Science* 1993; 260:539-541.
236. Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factor: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res* 1994; 305:253-264.
237. Hsu CM, Wang JS, Liu CH, Chen LW. Kupffer cells protect liver from ischemia-reperfusion injury by an inducible nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Shock* 2002; 17:280-285.

238. Wang Y, Lawson JA, Jaeschke H. Differential effect of 2-aminoethyl-isothiourea, an inhibitor of the inducible nitric oxide synthase, on microvascular blood flow and organ injury in models of hepatic ischemia-reperfusion injury and endotoxemia. *Shock* 1998; 10:20-25.
239. Rivera-Chavez FA, Toledo-Pereyra LH, Dean RE, Crouch L, Ward PA. Exogenous and endogenous nitric oxide but not iNOS inhibition improves function and survival of ischemically injured livers. *J Invest Surg* 2001; 14:267-273.
240. Hines IN, Kawachi S, Harada H, Pavlick KP, Hoffman JM, Bharwani S, et al. Role of nitric oxide in liver ischemia and reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 2002; 234-235.
241. Meguro M, Katsuramaki T, Nagayama M, Kimura H, Isobe M, Kimura Y, et al. A novel inhibitor of inducible nitric oxide synthase (ONO-1714) prevents critical warm ischemia-reperfusion injury in the pig liver. *Transplantation* 2002; 73:1439-1446.
242. Kelly LK, Wedgwood S, Steinhorn RH, Black SM. Nitric oxide decreases endothelin-1 secretion through the activation of soluble guanylate cyclase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; May 286(5):53-55
243. Fernández N, Martínez MA, Climent B, García-Villalón AL, Monge L, Sanz E, et al. In vivo coronary effects of endothelin-1 after ischemia-reperfusion. Role of nitric oxide and prostanoids. *Eur J Pharmacol* 2003; 481:109-117.
244. Kukreja RC. Cardiovascular protection with sildenafil following chronic inhibition of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 2007; 150:538-540.
245. Symons JD, Hayashi Y, Ensunsa JL. Improved coronary vascular function evoked by high-intensity treadmill training is maintained in arteries exposed to ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 2003; 95:1638-1647.
246. Gong J, Lao XJ, Zhang SJ, Chen S. Protective effects of L-arginine against ischemia-reperfusion injury in non-heart beating rat liver graft. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008; 7(5):481-4

247. Cheng TH, Shih NL, Chen SY, Wang DL, Chen JJ. Reactive oxygen species modulate endothelin-I-induced c-fos gene expression in cardiomyocytes. Cardiovasc Res 1999 Mar; 41(3):654-62.
248. Kameyama YU, Tsuda M, Ohkura C, Takashi M, Nambo Y, Ohuchi Y ve Aigaki T. Thioredoxin supresses Parkin-associated endothelin like reseptor-like reseptor-induced neurotoxicity and extends longevity in Drosophila. *J Biolog Chem* 2007; 282:15:11180-87.
249. Ferret PJ, Soum E, Negre O, Wollman E E and Fradelizi O. Protective effect of thioredoxin upon NO-mediated cell injury in THP1 monocytic human cells *Biochem J* 2000; 346:759-765
250. Dobashi K, Pahan K, Chahal A, and Singh I. Modulation of Endogenous Antioxidant Enzymes by Nitric Oxide in Rat C6 Glial Cells. NO production. *J Neurochem* 1997; 68:1896-1903.
251. Asahi M, Fujii J, Suzuki K, Seo HG, Kuzuya T, Hon M, et al. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide: implication for cytotoxicity. *J Biol Chem* 1995; 270:21035-9.
252. Brown GC. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur J Biochem* 1995; 232:188-191.
253. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298:431-437.
254. Xiao-wei W, Zong-yan T, Li-hong J, Ying F, Yu-hua Z, Xiu-rong L, Yi-na Z. Human thioredoxin exerts cardioprotective effect and attenuates reperfusion injury in rats partially via inhibiting apoptosis. *Chinese Medical Journal* 2008; 121(9):819-826
255. Yamamoto M, Yang G, Hong C, Liu J, Holle E, Yu X, et al. Inhibition of endogenous thioredoxin in the heart increases oxidative stress and cardiac hypertrophy *J. Clin Invest* 2003; 112:1395-1406.
256. Ozakyol AH, Tuncel N, Saricam T. Effect of nitric oxide inhibition on rat liver ischemia reperfusion injury. *Pathophysiology* 2000; 7:183-88.

257. Zhang C, Walker LM, Hinson JA, Mayeux PR: Oxidant stress in rat liver after lipopolysaccharide administration: Effect of inducible nitric-oxide synthase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293(3): 968-72.
258. Demir M, Kaleli I, Demir S, Sert S, Cevahir N, YildirimT, Sahin B. Liver lipid peroxidation in experimental *Escherichia coli* peritonitis: The role of myeloperoxidase and nitric oxide inhibition. *Med Sci Monit*, 2007; 13(10):225-229.
259. Andoh T, Chock PB, Chiueh CC. The Roles of Thioredoxin in Protection against Oxidative Stress-induced Apoptosis in SH-SY5Y Cells. *The journal of biological chemistry* 2002; 277,12, Issue of March 22: 9655-9660,
260. Sandau K, Pfeilschifter J, Brune B: Nitric oxide and superoxide induced p53 and Bax accumulation during mesangial cell apoptosis. *Kidney Int* 1997; 52:378-386.
261. Kaneto H, Fujii J, Seo HG, Suzuki K, Matsuoka T, Nakamura M, et al. Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 1995; 44:733-738.
262. Nishio E, Watanabe Y. Nitric oxide donor-induced apoptosis in smooth muscle cells is modulated by protein kinase A *Eur J Pharmacol* 1997; 339:245-251.
263. Amore A, Emancipator SE, Cirina P, Conti G, Ricotti E, Bagheri N , and Coppo R. Nitric oxide mediates cyclosporine-induced apoptosis in cultured renal cells *Kidney International* 2000; 57:1549-1559
264. Masakazu Hirakawa, Masahiro Oike, Kouji Masuda, Yushi Ito Tumor Cell Apoptosis by Irradiation-induced Nitric Oxide Production inVascular Endothelium1 *Cancer Research* 2000; 62, 1450-1457.