



**T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**KARACİĞERDE İSKEMİ REPERFÜZYON İLE
İNDÜKLENMİŞ REJENERASYON MODELİNDE
KOMPLEMAN İNHİBİTÖRÜNÜN ROLÜ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. NAZLI YAVUZER**

ANKARA / 2008



T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

KARACİĞERDE İSKEMİ REPERFÜZYON İLE
İNDÜKLENMİŞ REJENERASYON MODELİNDE
KOMPLEMAN İNHİBİTÖRÜNÜN ROLÜ

UZMANLIK TEZİ
Dr. NAZLI YAVUZER

TEZ DANIŞMANI
Doç.Dr. MAHMUT CAN YAĞMURDUR

ANKARA / 2008

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini büyük bir özveri ile aktaran ve yol gösteren başta sayın hocam Prof. Dr. Mehmet HABERAL olmak üzere emeği geçen tüm hocalarıma saygı ve şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Tüm eğitim hayatım süresince bana destek olan ve güvenen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Nazlı YAVUZER

ÖZET

Bu çalışmada; rat karaciğerinde in vivo olarak oluşturulan iskemi/reperfüzyon ile indüklenmiş rejenerasyon modelinde dokuda oluşan hasar ve kompleman inhibitörünün apoptozis ve rejenerasyon üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen 48 adet dişi rat kullanıldı. Ketamin hidroklorür ve ksilazin hidroklorit ile anesteziyi takiben, I. Grup ratlara parsiyel hepatektomi yapıldı. II. Grup ratlarda portal hilusun 45 dakika klemplenmesi ile iskemi ve takiben reperfüzyon oluşturuldu. Ardından parsiyel hepatik rezeksiyon yapıldı. III. Grup ratlara sadece iskemi ve reperfüzyon oluşturuldu. IV. Grup kontrol grubu olarak kabul edildi. V. gruba sadece C1 INH uygulandı. VI. Grup ratlara C1 INH uygulanması takiben iskemi reperfüzyon uygulanıp kısmi karaciğer rezeksiyonu yapıldı. VII. Gruba C1 INH uygulanmasını takiben parsiyel hepatik rezeksiyon yapıldı. V. Gruba C1 INH uygulanmasını takiben parsiyel hepatik rezeksiyon yapıldı. VIII. Grup ratlara intravenöz komplement-1 inhibitörü (C1 INH) verildikten 20 dakika sonra iskemi reperfüzyon uygulandı. Tüm ratlar işlemlerden 5. gün sonra sakrifiye edilip biyokimya, patoloji ve histolojik parametreler için gerekli serum ve karaciğer doku örnekleri alındı.

Karaciğer dokusunda reperfüzyon hasarı GSH ve MDA düzeyleri ile, karaciğer fonksiyonu serumda KCFT tayini ile, apoptozis ve rejenerasyon immun histokimyasal yöntem ve elektron mikroskopisi ile değerlendirildi. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda; C1 INH iskemi-reperfüzyonun indüklediği hepatosit hasarını azaltmış, antiinflamatuvar etki göstermiş ve en önemlisi karaciğer dokusunda apoptozisi baskılamıştır.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iii
ÖZET.....	iv
İÇİNDEKİLER	v-vi
KISALTMALAR	vii-viii
ŞEKİLLER VE RESİMLER	ix-x
TABLolar VE GRAFİKLER DİZİNİ.....	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Karaciğerde İskemi-Reperfüzyon Hasarı	3
2.1.1. Lökositlerin Rolü.....	3
2.1.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü	4
2.1.3. Kompleman Sistemi	5
2.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarında Kompleman Sistemin Rolü	11
2.2.1. C1 İnhibitör (C1 INH).....	11
2.2.2. C3 İnhibitör (sCR1).....	12
2.3. Apoptozis	13
2.4. Glutatyon.....	17
2.5. Malondialdehit	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Deney Hayvanları.....	21
3.2. Anestezi.....	21
3.3. C1 INH'ün Uygulanışı ve Sıvı Replasmanı	22
3.4. Cerrahi Teknik.....	22
3.5. Araştırma Parametreleri	26
3.5.1. İmmunhistokimyasal Analiz	26
3.5.2. KCFT Tayini	27
3.5.3. Elektron Mikroskopik İnceleme.....	27
3.5.4. Karaciğer Dokusunda Reperfüzyonun Değerlendirilmesi	28

3.6. İstatistiksel Analiz	28
4. SONUÇLAR	29
4.1. Patoloji Sonuçları	29
4.2. Biyokimyasal Analiz	38
4.3. Dokuda MDA-GSH Analizi	40
4.4. Elektron Mikroskopi Bulguları	42
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇLAR	59
7. KAYNAKLAR	60

KISALTMALAR

- ALT:** Alanin aminotransferaz
AST: Aspartat aminotransferaz
ATP: Adenozin Tri Fosfat
C1: Kompleman 1
C2: Kompleman 2
C3: Kompleman 3
C5a R: Kompleman 5a Reseptörü
C5b-9 (=MAK): Membran Atak Kompleks
DNA: Deoksiribonükleik Asit
GSH: Glutasyon
HCl: Hidrojen Klorür
ICAM: İntersellüler Adezyon Molekülü
IF: İmmunfloresan
Ig: İmmunglobulin
IL: İnterlökin
İR: İskemi Reperfüzyon
KCFT: Karaciğer Fonksiyon Testleri
KCl: Potasyum Klorür
LAM: Lökosit Adezyon Molekülü
LT: Lökotrien
MBL: Mannoz Bağlayıcı Lektin
MDA: Malondialdehit
MODS: Multiple Organ Yetmezliği Sendromu
MPO: Myeloperoksidaz
PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen
PG: Prostaglandin
PHR: Parsiyel Hepatik Rezeksiyon
PMNL: Polimorfonükleer Lökosit
PSGL: P-Selektin Adezyon Molekülü
SOR: Serbest Oksijen Radikalleri

TBS: Tris Buffer Saline

TNF – α : Tumor nekroz faktör -alfa

TUNNEL: Terminal-Deoksi Nükleotidil Transferaz Nick End-Labeling

(Terminal deoksi nükleotidil aracılı dUTP-biyotin işaretleme)

ŞEKİLLER

Şekil 1: Kompleman Sistem Aktivasyonu

Şekil 2: Kompleman Sistem Etkileri

Şekil 3: Kompleman Sistem Fonksiyonları

Şekil 4: Apoptotik ve Nekrotik Hücre Ölümü

RESİMLER

Resim 1: C1 İnhibitör (Cetor)

Resim2: Kuyruk Veninden C1 Inh Verilmesi İçin Damar Yolu Açılması

Resim 3: Orta Hattan Laparotomiye Başlanması

Resim 4: Portal Pedikül Diseksiyonu

Resim 5: Portal Pedikül

Resim 6: Vena Kava İnferiordan Kan Örneklerinin Alınması

Resim 7: Kısmi Karaciğer Rezeksiyonu

Resim 8: Gruplara Göre PCNA Boyamaları

Resim 9: Gruplara Göre TUNEL Boyamaları

Resim 10: Kısmi Karaciğer Rezeksiyonu (Elektron Mikroskopi Görüntüsü)

Resim 11:C1 INH + Kısmi Karaciğer Rezeksiyonu (Elektron Mikroskopi Görüntüsü)

Resim 12-13-14: İskemi-Reperfüzyon + Kısmi Karaciğer Rezeksiyonu (Elektron Mikroskopi Görüntüsü)

Resim 15: C1 INH + İskemi-Reperfüzyon + Kısmi Karaciğer Rezeksiyonu (Elektron Mikroskopi Görüntüsü)

Resim 16-17-18: İskemi-Reperfüzyon (Elektron Mikroskopi Görüntüsü)

Resim 19: C1 INH +İskemi-Reperfüzyon (Elektron Mikroskopi Görüntüsü)

Resim 20: Kontrol Grubu (Elektron Mikroskopi Görüntüsü)

Resim 21: Sadece C1 INH Verilen Denek Grubu (Elektron Mikroskopi Görüntüsü)

TABLÖLAR

Tablo 1: PCNA İçin Ortalama Değerler ve Ortalama Standart Hata Değerleri

Tablo 2: Apoptozis İçin Ortalama Değerler ve Ortalama Standart Hata Değerleri

Tablo 3: AST İçin Ortalama Değerler ve Ortalama Standart Hata Değerleri

Tablo 4: ALT İçin Ortalama Değerler ve Ortalama Standart Hata Değerleri

Tablo 5: Doku MDA Düzeyi İçin Ortalama Değerler ve Ortalama Standart Hata Değerleri

Tablo 6: Doku GSH Düzeyi İçin Ortalama Değerler ve Ortalama Standart Hata Değerleri

GRAFİKLER

Grafik 1: PCNA İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı

Grafik 2: Apoptozis İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı

Grafik 3: AST İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı

Grafik 4: ALT İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı

Grafik 5: Doku MDA İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı

Grafik 6: Doku GSH İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının dolaşım tarafından sağlanamaması ve oluşan artık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması olarak tanımlanır(1). Reperfüzyon ise bu iskemik dokudaki kan dolaşımının yeniden sağlanmasıdır. İskemik bir dokunun reperfüzyonu dokunun oksijen ve diğer metabolik ihtiyaçlarını karşılarken paradoksal olarak dokularda hasar oluşturur(2). Bir dokudaki iskemi ve reperfüzyon (I/R) sonucu oluşan hasar, dokunun aynı sürede sadece iskemiye maruz kalması sonucu oluşan hasardan daha fazladır(3).

İskemik dokunun reperfüzyonu sonrası gördüğü hasar akciğer, karaciğer, kalp, beyin ve barsaklar gibi pek çok organda ayrıntılı olarak araştırılmıştır (4-7). Ancak yine de İ/R hasarının fizyopatolojisi tam olarak aydınlatılmış değildir. I/R hasarında serbest radikallerin oluşumu, polimorf nüveli lökositlerin aktivasyonu, endotel ve kompleman sistemi gibi major komponentlerin rol oynadığı bilinmektedir(8,9). Bu tablo lokal ve sistemik inflamatuvar cevabın başlamasına yol açarak lokal ve uzak organlarda da hasar oluşturmaktadır.

İskemi; arteriyel ve/veya venöz tıkanıklık sonucu meydana gelir. Sonrasında etkilenen vasküler yatakta staz oluşur. Şok, transplantasyon, myokard infarktüsü, serebrovasküler olaylar sonrasında iskemi görülebilir. Bunun dışında karaciğerde iskemiye neden olan olayların başında; karaciğer rezeksiyonu, hemorajik şok, travmaya bağlı karaciğer hasarı gelir. İskemi ve reperfüzyonun primer sonucu gelişen iltihabi yanıt, primer olarak iskemi gelişmeyen organlarda da inflamatuvar hasarı hızlandırabilir. Bu durumda çoklu organ yetmezliği (MODS) meydana gelebilir ve bazı hastalarda ölüme sebebiyet verebilir. İ/R nötrofillerin aktivasyonuna, adezyonuna ve migrasyonuna, sayısız inflamatuvar mediatör salımına neden olur. Bu mediatörler o dokuda hasar meydana getirir. İ/R hasarında özellikle polimorf nüveli lökositlerin (PMNL) aktivasyonu, serbest oksijen radikallerinin (SOR) oluşumu, sitokin salınımı, kompleman aktivasyonu ve eikosanoid yapımı meydana gelir. İ/R hasarı gelişen hastalarda bu mediatörler dolaşımında anormal derecede yüksek seviyede tesbit edilmiş olup, bunların varlığı klinik belirti ve bulguların ortaya çıkmasına neden olmaktadır(10).

IR hasarında kompleman sisteminin her 3 yolu da aktive olmaktadır. Normal şartlar altında hücre membranlarında özellikle de endotel hücre membranında bulunan “decay accelerating faktör” ve membran kofaktör protein hücreyi kompleman saldırısına

karşı korur(10,11). Reperfüzyon sırasında kompleman bağımlı proinflamatuvar peptidler (C3a ve C5a) salınır. Bu peptidler; nötrofil aktivasyonuna, düz kas hücrelerinde kasılmaya, vasküler permeabilitede artışa, makrofaj aktivasyonunda artışa, C5b-9 polimerizasyonu ile saldırgan yabancı hücre lizisine, fosfolipid tabakasının bütünlüğünün bozulmasına, C3b opsonizasyonuna, anaflatoksinlerin aktivasyonuna, endotel hücrelerinde fibrin depositlerinin birikimine ve trombosit agregasyonuna neden olur(12-15).

Kompleman kaskadının inhibisyonu karaciğer hasarını minimize etmek ve fatal organ hasarını önlemek için bir tedavi yöntemi olabilir.

Kompleman sisteminin baskılandığı hayvanlar; soluble kompleman reseptör 1 (sCR1) ve C5aR inhibitörü ile tedavi edildiğinde iskemi sonrası karaciğerde uzun reperfüzyon süresi (24 saat) boyunca çok az miktarda nötrofil birikimi saptanmıştır ve hasar anlamlı derecede az olarak tesbit edilmiştir.

Kompleman-1 inhibitörü (C1 INH); serin proteaz inhibitör ailesinden olup komplemanın klasik yolunun major inhibitörüdür(16). Yapılan birçok çalışmada C1 INH'ün reperfüzyon ilişkili mikrosirkülatuar düzensizlikleri en aza indirdiğini göstermektedir. Antiinflamatuvar özelliğinden dolayı C1 INH sepsis, myokard infarktüsü gibi çeşitli hastalıklarda hayvan deneylerinde kullanılmıştır(16,17). Yapılan birçok çalışmada C1 INH'ün reperfüzyon ilişkili mikrosirkülatuar düzensizlikleri en aza indirdiğini göstermektedir. Karaciğer IR hasarında hayvanlar C1 INH ile tedavi edildiğinde karaciğerde uzun reperfüzyon periyodunda (24 saat) PMNL birikiminde anlamlı derecede azalma saptanmış ve karaciğer nekrozunun azaldığı görülmüştür. Ayrıca C1 INH oksidatif stresin indüklediği kuppfer hücrelerini bloke ederek koruyucu etki göstermiştir. Karaciğerde parankimal hücre hasarını azaltmış, karaciğer fonksiyonlarını ve mikrovasküler perfüzyonu iyileştirmiştir.

AMAÇ:

Bu çalışmada IR hasarı sonrası kompleman inhibitörünün apoptozis ve rejenerasyon üzerine olan rolü ve tedavideki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda karaciğer transplantasyonu ve karaciğer rezeksiyonu sonrasında kompleman inhibitörünün pratik kullanımı hakkında bilgi edinileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KARACİĞERDE İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI

Karaciğer tarafından tolere edilebilen normotermik iskeminin süresi tam olarak bilinmemektedir. Günümüzde elektif şartlarda yapılan karaciğer rezeksiyonlarında, portal triad klemleme süresinin 90 dakikaya kadar uzatılabileceği kabul edilir. İskeminin 90. dakikasından sonra karaciğerde geri dönüşümsüz değişikliklerin meydana geldiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir(16).

IR hasarı; dokunun geçici olarak kan akımından yoksun bırakılması ve kan akımının geri dönmesi sonucu ciddi bir inflamatuvar cevabın başlaması ile karakterizedir. İskemi arteriyel ve/veya venöz tıkanıklık sonucu meydana gelir. Sonrasında etkilenen yatakta staz gelişir. Şok, transplantasyon, myokard enfarktüsü sonrasında iskemi görülebilir. Bunun dışında karaciğerde iskemiye neden olan olayların başında; karaciğer rezeksiyonu, hemorajik şok, travma gelmektedir(16-19). Kan akımının kesilmesini takiben ortaya çıkan organ disfonksiyonunun nedeni reperfüzyon sonrası meydana gelen hücre hasarı ve organ hassasiyetinin artmasıdır.

IR hasarı karakteristik olarak;

- PMNL 'nin aktivasyonuna (20)
- Serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına (21)
- Sitokinlerinin salınımında artışa (22)
- Eikasonoidlerin üretiminde artışa (23)
- Kompleman sistemin aktivasyonuna neden olur. (24)

2.1.1. Lökositlerin Rolü

İskemi/Reperfüzyon lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonuna yol açar. Polimorf nüveli lökositler de, endotel hücreleri gibi SOR üretme kapasitesine sahiptir. İ/R hasarında PMNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bunlar;

1. Mikrovasküler oklüzyon
2. Serbest oksijen radikallerinin salınması
3. Sitotoksik enzim salınması

4. Vasküler permeabilite artışı
5. Sitokin salınımında artıştır.

Polimorf nüveli lökositlerin başlangıçtaki kemoatraksiyonları endotel hücreleri ve ksantin oksidaz aracılığı ile olur. Aktivasyon ve migrasyonları ise endotel hücrelerde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığı ile olur. Lökosit adhezyon molekülleri (LAM) lökositlerde ve diğer başka hücrelerde de bulunan ve gelişme, haberleşme, inflamasyon ve apoptosiz gibi pek çok biyolojik olaylarda rol alan yapılardır. Selektin grubu adhezyon molekülleri, doku hasarı olan bölgede aktive olmuş endotele, PMNL'lerin başlangıçtaki adhezyonunda rol alırlar. L, P ve E selektin olmak üzere bilinen üç üyesi vardır.

İ/R, endotelde P-selektin ekskresyonunu artırır. Bu molekül, PMNL'lerde bulunan P-selektin glikoprotein 1 (PSGL-1) adlı reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteli lökosit endotel bağlantısını oluşturur. İkinci aşamada lökosit Beta-2 integrinler ile endotelial intersellüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1) arasında etkileşim ile lökosit adhezyon ve agregasyonu gelişir. Üçüncü aşamada platelet endotelial hücre adhezyon molekül 1 ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim ile lökosit transmigrasyonu gelişir. Aktive lökositler ekstrasvasküler kompartmana ulaşınca hasar bölgesine doğru göç etmeye başlarlar (kemotaksis). Burada aktive lökosit cevabı şu mekanizmalarca gerçekleştirilir;

1. Fosfolipaz A2 aktivasyonu sonucu araşidonik asit metabolitleri (prostoglandin ve lökotrienler) üretilir
2. Degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır,
3. Serbest oksijen radikallerinin üretimi gerçekleşir. Bu ürünler endotel hasarı ve doku zedelenmesinin güçlü mediyatörleridir ve başlangıçtaki inflamatuvar uyarının etkisini güçlendirir. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya dilüe etmeye yönelik bu inflamatuvar cevap sonucu mikrovasküler permeabilite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümüne uğrarlar ve lenfatik dolaşım ile ortamdaki uzaklaştırılırlar.

2.1.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü

IR hasarı serbest oksijen radikallerinin oluşumu ile başlar. İlk basamak hipoksi nedeniyle ATP yapımının durması ve kullanımının devam etmesi, yıkım sırasında açığa

çıkan hipoksantin ürik aside oksijen olmadığı için indirgenememesi ve hücrede ksantin birikimidir. İkinci basamak iskemi esnasında büyük orandaki ksantin dehidrogenaz enzimin ksantin oksidaza çevrilmesidir. Ksantin oksidaz enzimi oksijene direkt olarak elektron transferi yaparak süperoksitleri meydana getirir. Fazla miktardaki bu serbest oksijen radikalleri bütün hücrel makromoleküllerle reaksiyona girebilirler. Hücrel hasar oluşumunda özellikle üç tip reaksiyon önemlidir;

Lipid Peroksidasyonu: Serbest oksijen radikalleri, plazma ve organel membranlarında lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Hidroksil radikali membran lipidleri ile çift bağ yapar ve böylece lipid-radikal etkileşimi ile zincirleme reaksiyon sonucu pek çok lipid peroksidasyon ürünü (malondialdehit, dien konjugatları gibi) oluşur. Eritrosit membranlarının, lipozomal membranların (özellikle hücre ve mitokondri) okside olması ile bu yapıların fiziksel ve kimyasal özellikleri değişir. Membranın iyon geçirgenliği bozulur. Eritrositlerde hemoliz olur. Böylece yaygın membran, organel ve hücre hasarı ortaya çıkar.

Proteinlerin oksidatif modifikasyonu: Serbest oksijen radikalleri, aminoasit yan zincirleri oksidasyonuna neden olarak protein-protein bağlarının oluşmasına yol açarlar. Ayrıca protein yapısında, ana zinciri okside ederek proteinlerin parçalanmasına neden olurlar. Böylece hücrede fonksiyonel önemi olan enzimlerde bozulmalar ortaya çıkar.

DNA hasarı: Serbest oksijen radikalleri, nükleer ve mitokondrial DNA'da timin ile reaksiyona girerek tek zincir kırılmaları oluşturur. Sonuçta hücrelerin enerji kaybetmeleriyle nekrotik tipte hücre ölümü olur.

2.1.3. Kompleman Sistemi

Kompleman sistemi plazmada inaktif olarak bulunan enzimlerin kademeli aktivasyonu ile inflamatuvar peptidlerin, opsoninlerin ve hücre zarı saldırı kompleksinin olduğu bir yoldur. Bu yolda oluşan proteinler anafilatoksik, inflamasyon bölgelerinde vazodilatasyon, vasküler permeabiliteyi artıran (C3a, C4a, C5a) ve fagositlerin endotele yapışmasını uyaran etkiler gösterirler. Kompleman sistemi klasik ve alternatif yol (properdin yolu) ve bu iki yolun birleşerek terminal yol ve sonucunda oluşan hücre zarı saldırı kompleksini kapsamaktadır. Mannoza bağlayıcı lektinin (MBL) rol aldığı lektin yolu da klasik yolla birleşmektedir. Hepatositler, monositler, makrofajlar, böbreğin tübül ve glomerüler hücreleri kompleman komponentlerinin sentez yerlerindedir. Kompleman sistemi proteinleri, serum total proteinin %10'unu oluşturur, beyin omurilik sıvısında ise kompleman düzeyleri çok düşüktür.

Kompleman sistemi yaklaşık olarak 35 proteine sahip olup bazı enzimler (C1r, C1s, C2, Faktör B, Faktör D) , kofaktörler, inhibitör veya inaktivatörler, membran ilişkili protein ve reseptörler (C1q, C3a, C4a, C5a, CR1,CR2, CR3) içerir. Bunlara ek olarak; CD55-CD59 gibi membran bileşenleri ve C8 ve C9 gibi membran inhibitörleri de kompleman sisteminin önemli düzenleyici proteinleridir(26-29).

Aktivasyon sırasında kompleman komponentlerinin çoğu enzimatik olarak, biri daha büyük olmak üzere, 2 parçaya ayrılır. Küçük parça anafilatoksik, kemotaksik ve vasküler geçirgenliği artırıcı özellikler gösterirken, büyük fragman bakteri zarları veya immunkompleks gibi farklı yüzeylere bağlanma ve bir sonraki komponenti aktive eden enzimatik bölgeye sahiptirler.

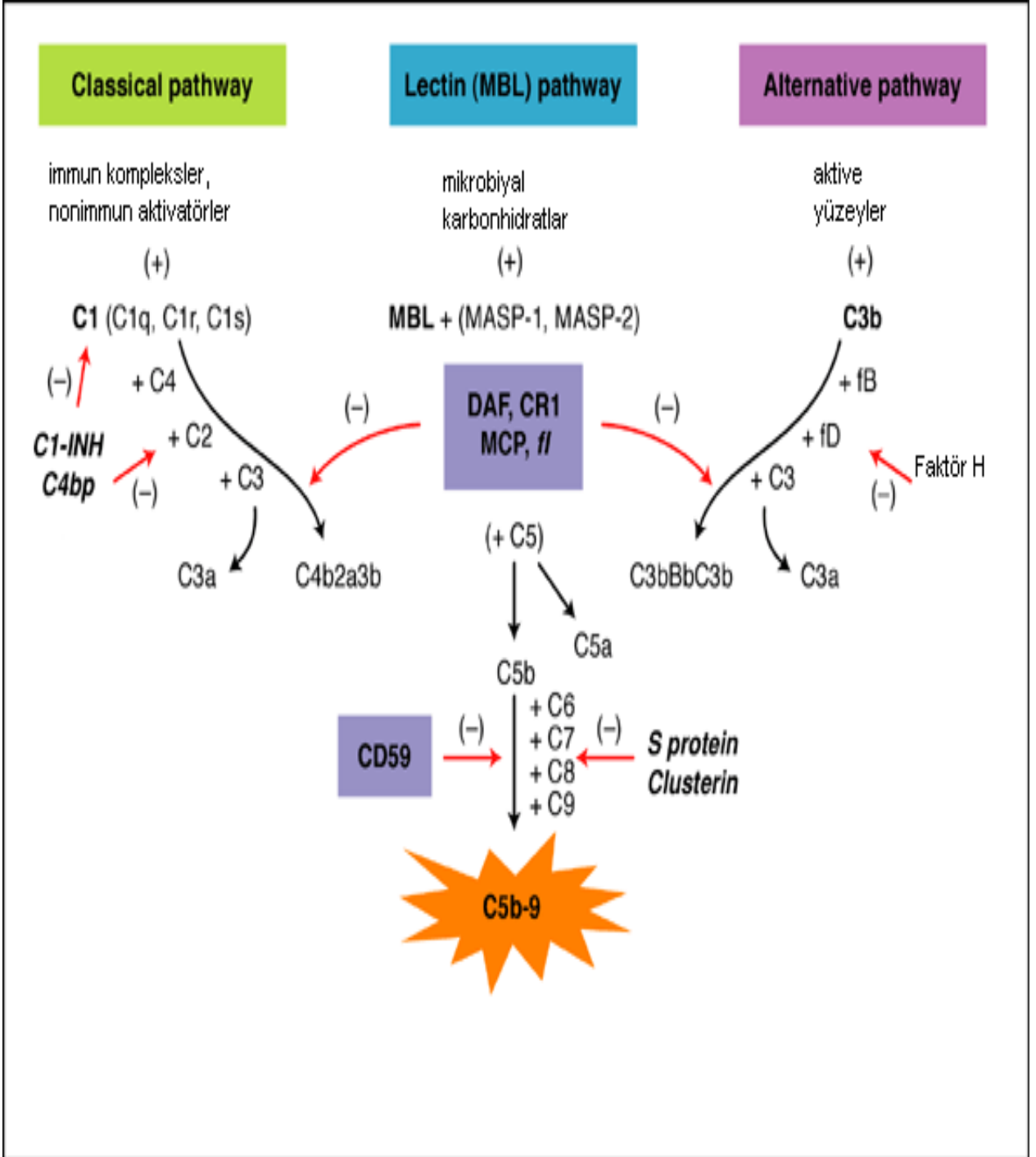
Kompleman sistemi üç yol ile aktive olur.

- 1- Antikor bağımlı klasik yol
- 2- Antikor bağımsız alternatif yol
- 3- MBL-MASP yolu

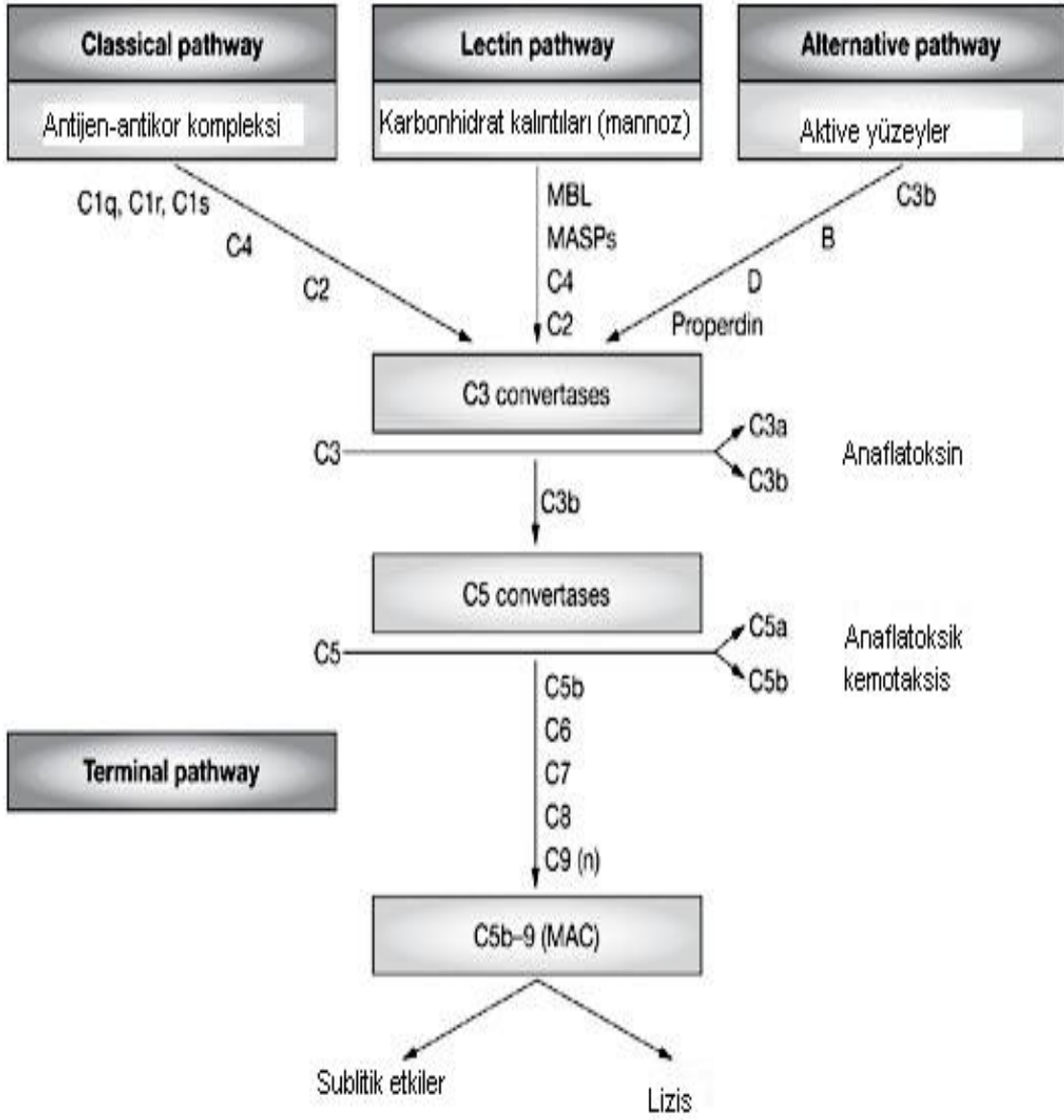
Klasik Yol: Antijen-antikor immun kompleksler, CRP, fibronektin ve fibrinojen klasik yolun aktivatörleridir. E. koli ve Salmonella gibi düşük virulanslı bazı bakteriler, gram negatif bakteriler, parainfluenza virüs gibi virüsler C1q ile direkt olarak etkileşime girerek klasik yolu antikor yokluğunda aktive edebilir. Klasik yolun immunolojik olmayan aktivatörleri de bulunmaktadır. Ürat kristalleri, denatüre DNA, RNA tümör virusleri, bakteri endotoksini, bazı polianyonlar, eş-molar heparin:protamin klasik yolu dolaysız olarak aktive edebilirler. IgG ve alt grupları, IgM grubu immunoglobulinler de klasik yolu aktive edebilir. Bir tek IgM veya iki IgG'nin bakteri veya virüsle enfekte olmuş host hücresi yüzeyine bağlanması, aktivasyon için yeterlidir. Çözünür antijenler ise ancak büyük multimoleküler antijen-antikor kompleksleri (immunkompleks) halinde kompleman sistemini aktifleştirirler. Sistem aktivasyonu C1 proteininin bu maddelerden birine direkt bağlanması ile veya plazmin gibi bazı fibrinolitik enzimlerin C1 üzerine direkt enzimatik atakları ile başlar. Antikorum C1'e bağlanması ile serin proteaz aktive olur. C4C2' nin C4bC2a 'ya dönüşümünü sağlar. C4bC2a ise C3'ün C3a ve C3b dönüşümünü sağlar. C3b fagositler için opsonin görevi yapar. Ayrıca C3b, C5 'in bağlanması için yer oluşturur. C5 membran atak kompleksin oluşumunu başlatır. MAK hücre zarında porlar meydana getirerek hücre lizisine neden olur. (Resim 1-2)

MBL_MASP (Lektin Yolu): Doğal bağışıklıkta, henüz kazanılmış immün cevap oluşmadan önceki devrede, önemli rol üstlenir. Mikroorganizmaların yüzeylerindeki mannoz ve N-asetilglikozamin gibi karbonhidratları tanıyan kollektin ailesinin bir üyesi olan mannoz bağlayıcı lektin (MBL) de klasik kompleman yolunu aktive edebilmektedir.

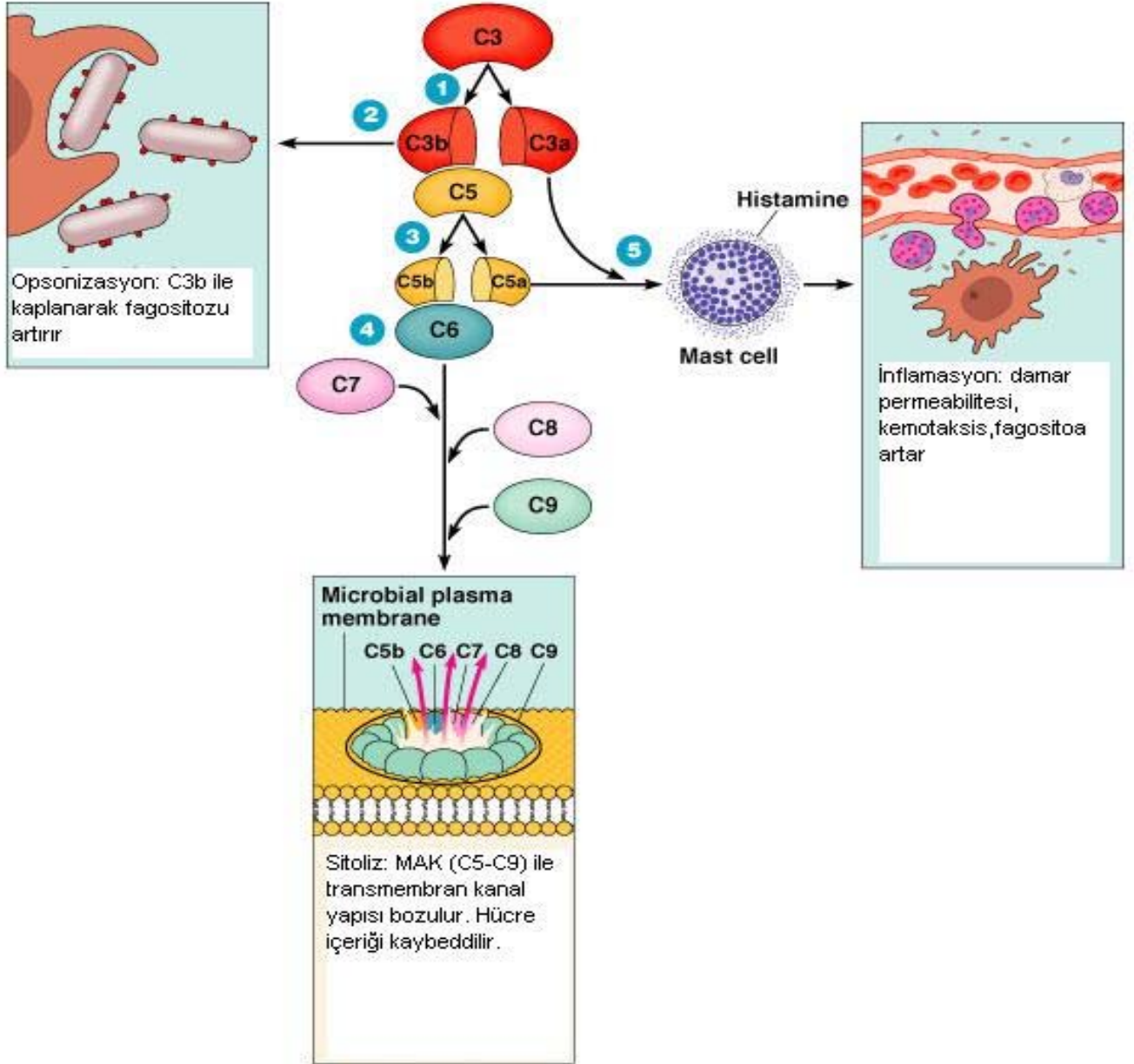
Alternatif yol (Properdin Yolu) : E.koli, tripanozoma, diğer parazitler, virüsle enfekte olmuş hücreler, maya hücre duvarı, kobra venom faktörü, nefritik faktör, dekstran sülfat, polivinil sülfat, nöraminidaz ile muamele edilmiş eritrositler, insanda diğer memelilerin eritrositleri, antijen-antikor kompleksleri, Ig A ve klasik yolu aktive eden immunglobulinler, lipopolisakkarid ve diğer bakteri ürünleri kompleman sistemini alternatif yol aracılığı ile aktive ederler. Alternatif yol bakteri hücumunda ön safta yer alır ve henüz konağın antikör üretimi için yeterli zaman bulamadığı dönemde devreye girer. Klasik yolun etkinleştirilmesi sonucunda aktifleşen C3 de, alternatif yolu aktifleştirebilmektedir. C3 klasik ve alternatif yolun birleştiği noktada yer alır ve kompleman sisteminin en önemli üyelerinden biridir. Dolaşımında C3 proteolitik enzimlerin etkisi ile C3a ve C3b'ye ayrılmakta, ancak faktör I ve H ile sürekli olarak inaktive edilerek düşük düzeyde tutulmaktadır. Patojen mikroorganizmaların polisakkarid ve lipopolisakkaridleri varlığında bu denge bozulduğunda C3b, faktör B ve D ile etkileşime girer. Dolaşımında devamlı olarak hidrolize uğrayarak farklı bir konformasyona çevrilen C3, faktör B'ye, bu ikiliye de faktör D bağlanır ve sonuçta faktör B kırılır. Geride kalan kompleks, alternatif yol C3 konvertazdır. Properdin, bu konvertaza bağlanır ve onu stabilize eder ve kompleman kaskadının devamını sağlar. Faktör D, plazmada aktif halde bulunan bir proteazdır.



ŞEKİL 1: Kompleman Sistem Aktivasyonu (Nature Clinical Practice, Nephrology; 2007, 3: 277)



ŞEKİL 2: Kompleman Sistemin Etkileri (Nature Clinical Practice, Rheumatology; 2006, 2: 330)



ŞEKİL 3: Kompleman Sistemin Fonksiyonları (Tartara F. Weigang Q, Microbiology; 2004, 8. baskı)

2.2. IR HASARINDA KOMPLEMAN SİSTEMİN ROLÜ

Yapılan birçok çalışma da IR hasarında kompleman sistemin her 3 yolunun da aktive olduğu gösterilmiştir(30-32). Myokarda reperfüzyon sırasında kompleman aktivasyonunu gösteren bir çalışmada komplemanın klasik yolu C1 inhibitörü kullanılarak inhibe edilmiş ve iskemik myokardın reperfüzyon hasarından efektif olarak korunduğu gözlenmiştir(33).

Hayvan deneylerinde barsak IR hasarı kompleman inhibitörleri ile tedavi edildiğinde; mukozal hasarda azalma, damar permeabilitesinde azalma ve sağkalımda artış saptanmıştır(34-37).

Karaciğer IR hasarında komplemanların rolü ilk olarak Jaeschke tarafından 1993 yılında araştırılmıştır. Bu çalışmada hepatik iskemiden önce serum kompleman inhibitörü olarak kobra venom faktör kullanılmış ve sonuçta kupffer hücrelerinin neden olduğu oksidant strese anlamlı azalma görülmüş, reperfüzyonun başladığı 1 saat boyunca karaciğer nötrofil birikimine karşı korunmuştur. Soluble kompleman reseptör 1 (sCR1) ve C5a reseptör inhibitörleri ile tedavi edilen hayvanlarda karaciğerde iskemi sonrası uzun reperfüzyon süresi (24 saat) boyunca çok az miktarda nötrofil birikimi saptanmış ve hasar anlamlı derecede azalmış olarak tesbit edilmiştir(38-40).

2.2.1. C1 İnhibitörü:

C1 inhibitör (C1 INH) bir serin proteaz inhibitörü olup birçok farklı proteazı inhibe eder; kompleman sisteminde C1r, C1s ve MASP ' yi, kontakt sistemde Faktör 12 ve kallikreini, koagülasyon sisteminde Faktör 11 ve trombini, fibrinolitik sistemde tPA ve plazmini inhibe eder.

Kompleman klasik yolunu bloke eder ve kompleman aktivasyonunu azaltır. Reperfüzyon hasarına karşı iskemik dokuyu korur. Ratlarda IR hasarı oluşturulan karaciğer modellerinde C1 inhibitörü ile tedavi edildiğinde perfüze olan sinüzoid sayısında artış, lökosit adezyonunda azalma saptanmıştır. Perfüzyondaki artış:

- İnterstisyel ödemin azalmasına
- Endotelial şişmedeki azalmaya
- Trombosit ve lökosit agregasyonundaki azalmaya bağlanmıştır(41).

Bir diğer çalışmada geçici iskemi sonrası perisantral hepatositlerde intrasellüler kompleman ürünlerinin konsantrasyonunda artış saptanmıştır(42).

C1 inhibitörünün komplemanın alternatif yolunda hiçbir etkisi yoktur(41-42).

C1 inhibitörleri protektif sitokin olan IL10 ve IL6 düzeyini artırarak antiinflamatuvar etkide gösterir(43). Antiinflamatuvar özelliğinden dolayı birçok hayvan deneyinde sepsis, myokard enfarktüsü gibi hastalıkların araştırılmasında kullanılmıştır. Koroner arter tıkanmasını takiben gelişen myokard iskemi-reperfüzyon hasarında C1 INH'ün hasarı belirgin azalttığı gösterilmiştir(44-48). Organ transplantasyonları sırasında da IR hasarı sonucu kompleman aktivasyonu meydana gelir. Kompleman aktivasyonu ve ilgili patolojik olaylarda C1 INH ile önlenir. C1 INH organ naklinden önce (49,50), perfüzyon sırasında ve perfüzyon solüsyonlarına eklenerek kullanılabilir(51). C1 INH endotel hücrelere bağlanarak tüm fonksiyonel kapasitesini korur. Böylece transplante edilecek organa bağlı komplikasyonlar önemli ölçüde azaltılmış olur(52).



RESİM 1: Kompleman İnhibitörü (C1 INH, Ceter)

2.2.2. C3 İnhibitörleri (sCR1) :

Çeşitli organlarda IR hasarına karşı yaygın olarak kullanılan bir diğer kompleman inhibitörü sCR1 'dir. sCR1;

- ✓ Fagositozu düzenler
- ✓ C3 aktivasyonunun potent düzenleyicisidir.
- ✓ C3b ve C4b 'e bağlanarak C3-C5 konvertazların yıkımını hızlandırır(53).

- ✓ Tüm yollarda ortak kompleman aktivatörü olan C3' ün aktivasyonunu inhibe eder. Böylece hem C3a ve C5a' nın hemde MAK 'in üretimini engeller.

Deneysel çalışmalarda IR hasarında sCR1 uygulaması infarkt boyutunu azaltır, infarkt alanında PMNL birikimini azaltır, C5a üretimini baskılayarak lökosit adezyon reseptörlerinin salınımını ve lökosit kemotaksisini önler(54,55). Sonuç olarak direkt endotelial hasara neden olan C5b-9 kompleks oluşumu sCR1 tarafından baskılanır(56).

Karaciğer IR hasarında hayvanlar sCR1 ile tedavi edilmişler ve post iskemik karaciğerde postiskemik karaciğerde uzun reperfüzyon periyodunda (24 saat) lökosit PMNL birikiminde anlamlı derecede azalma saptamışlardır.(38) Bu çalışmada ayrıca reperfüzyon hasarının geç dönemi boyunca karaciğer nekrozuda anlamlı düzeyde azalmıştır. sCR1 oksidatif stresin indüklediği kupffer hücrelerini bloke ederek koruyucu etki gösterir, karaciğer fonksiyonlarını ve mikrovasküler perfüzyonu iyileştirir. Parankimal hücre hasarını azaltır(39).

Barsak IR hasarında kompleman inhibitörü olarak sCR1 kullanıldığında mukozal hasarlanmada azalma, vaküler permeabilite de azalma ve sağkalımda artış görülmüştür(57,58).

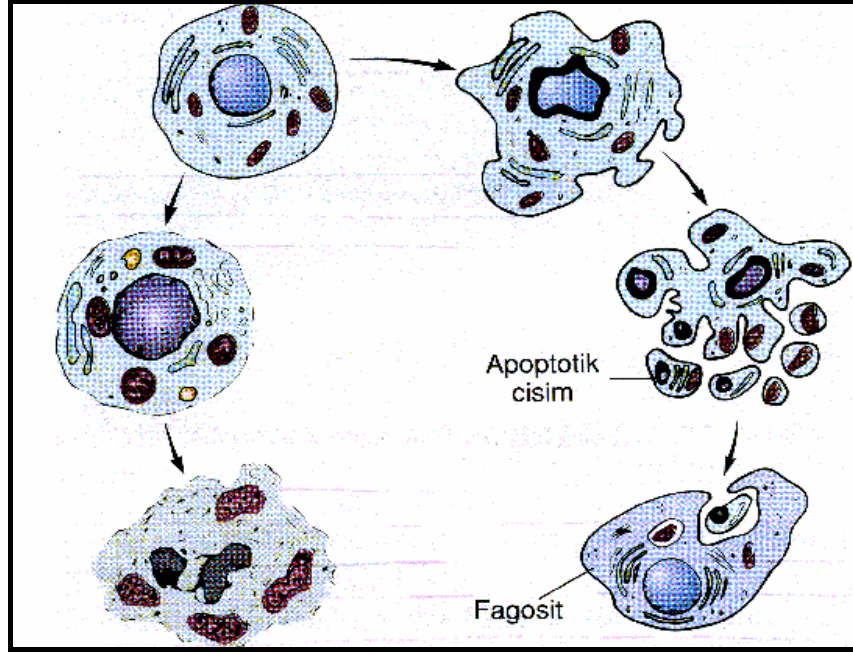
Allogreft cevabı üzerine sCR1 ile yapılan bir çalışmada ise plazma kompleman aktivasyonu %90 'ın üzerinde baskılanmış, doku C3 ve MAK birikimlerinde azalma görülmüştür. Ayrıca lökosit infiltrasyonunda azalma ve greft ömründe artış saptanmıştır(59-61).

2.3. APOPİTOZİS

Apopitozis, programlanmış hücre ölüm mekanizmasıdır. Bir grup protein ve gen ekspresyonunun birlikte işleme sonucu meydana gelir. Gen ekspresyonu ile birlikte çekirdek DNA'sı kırılır, kromatin çekirdekte yoğunlaşır, çeperde toplanır, sitoplazma büzülür, bu esnada hücre membran bütünlüğü ve mitokondrion dış yapısı korunur. Sonunda hücre apoptotik cisimcikler oluşturarak parçalanır. Bu cisimcikler yakınındaki yerleşik hücreler, bölgesel makrofajlar, mikroglial hücreler tarafından abartılı bir inflamatuvar reaksiyon olmadan fagosite edilirler(62-64) .

Apopitoz, embriyonal dönemdeki temel hücre ölüm şeklidir. Fetal yaşam sırasında hücrelerin büyük kısmı bu yolla ortadan kaldırılır. Hücre çekirdeğinde DNA hasarı tamir edilemeyecek boyuta geldiğinde (Özellikle yüksek çoğalma yeteneğine sahip hücrelerde) apopitoz programları aktive olabilir. ATM (ataxia telangiectasia mutated) gibi bazı kinazlar, DNA hasarını tarayıp saptarlar eğer DNA hasarı kontrol edilemeyecek boyutta ise ATM, p53 gibi hücre döngüsünde kontrol noktalarında yer alan pek çok proteini, hücre ölümünü desteklemek üzere fosforile eder. p53'ün yarı ömrü uğradığı fosforilasyon ile uzar. Fosforile p53 hücre yıkımını hedefleyen proteinlere bağlanamaz ve stabilize hale gelir. Stabilize p53, proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu arttırırken Bcl-2 gen ekspresyonunu baskılar. Böylece hem DNA tamir mekanizmalarını aktive eder hemde ölüm proteinlerinin salınımını baskılar. Ancak onarım yetersiz olursa, hücreyi apopitozise götürür(68-71).

Nekrotik hücre ölümü ise apopitozdan çok farklıdır. Hücre şişmesi, membran bütünlüğünün kaybı ve belirgin inflamasyon ile karakterizedir. DNA iplikçikleri, apopitozdaki gibi internükleozomal bağlantı noktalarından, düzenli olarak kırılmaz, rastgele olacak şekilde kırılır(64-68).



Nekroz

Apoptoz

Şekil 4: Apoptotik Ve Nekrotik Hücre Ölümleri

Apoptozisin canlı hücrelerinin reperfüzyondan hasar görmelerinde önemli bir faktör olduğu, hem hayvan deneylerinde, hemde klinik transplantasyon çalışmalarında gösterilmiştir(69,70).

Reperfüzyon sonucunda pre- apoptotik proteinler olan caspase-3 ve caspase-8'in aktivasyonu ile apoptoz tetiklenir. Caspase-3 ve caspase-8 birlikte mitokondrial membran yapısında ve fonksiyonlarında bozulmaya yol açmanın yanısıra sitoplazmaya sitokrom C salınımına ve sonuçta nükleer DNA'nın yıkılarak hücrenin ölmesine sebep olmaktadır(71-73).

Apoptozu başlatan genler, ölüm sinyallerini hücre dışında bulunan ölüm reseptörleri aracılığı ile hücre içine iletirler. Ölüm reseptörleri, tümör nekroze edici faktör (TNF) reseptörünün üst ailesine aittirler ve TNF R-1, FAS ve p75 NTR'yi içerirler. Ölüm sinyalinin dışarıdan gelmesi şart değildir hücre içerisinde hasarlanmış DNA, endoplazmik retikulum veya mitokondride bu sinyalin kaynağı olabilir(65,66,72).

Apoptozis iki aşamada gelişmektedir.

1. Başlangıç fazı (ölüm faktörleri, ölüm reseptörleri)
2. İkinci faz (mitokondriyal disfonksiyon)

Ölüm faktörleri TNF reseptör-1 (TNF-R1) ve Fas (CD95/APO-1) reseptörleridir. Bu reseptörler ligantları ile bağlandıktan sonra Fas, TNF-R1, adaptör proteinler ve pro-caspaslardan oluşan bir ölüm kompleksinin oluşmasına aracılık ederler. Oluşan bu kompleks ise caspase-8 ve caspase-3'ün aktivasyonunu sağlar (76).

Ölüm faktörlerinin salınımını takiben mitokondriyal disfonksiyon başlar. Mitokondri dış zarı üzerindeki pro ve antiapoptotik Bcl reseptör ailesi üyelerinin birbirleriyle olan etkileşimlerinin hücrede yaşam ile ölüm arasındaki kararın alınmasında rol oynadığı düşünülmektedir (74,75).

Ölüm reseptörleri ile mitokondriyal disfonksiyonun başlaması bir bid proteini ile ilişkilidir. Bid proteini caspase-8 tarafından aktive edildikten sonra mitokondrilerden sitokrom-C salınmaya başlar. Oluşan sitokrom-C Apaf-1 aktivasyonunu sağlar, aktive Apaf-1 caspase 9 aktivasyonunu yapar. Aktive olan caspase-9, caspase-8 ile birlikte caspase-3 aktivasyonunu gerçekleştirir. Kaskadın en sonunda aktive olan caspase-3 nükleazları aktive eder ve çekirdek DNA'sının yıkılması ile hücrenin ölümüne sebep olur (68,75-81).

Apopitoz oluşumunun yan yolağında ise hücrel stres sonucunda ortaya çıkan sitokrom C, Apaf-1'e bağlanarak caspase-9'u aktive eder. Bu noktadan sonra her iki yolak birleşir (71).

Apopitozis'i değerlendirmek için, birçok histokimyasal tetkik geliştirilmiştir. TUNEL (Transferase- mediated d-UTP-biotin Nick End Labeling) bu yöntemlerden birisidir. Enzimatik olarak in-situ, DNA fragmantasyonunun tespitine olanak sağlar. Bu yöntemin temel prensibi tek ve/veya çift zincir kırıklı DNA bölgesine, işaretli nükleotitlerin girmesi veya eklenmesidir.

TUNEL yönteminin diğer apoptozis tespit yöntemlerine göre daha sensitif olma nedeni, pepsin, protein K, S1 nükleaz ve DNA zincirlerinin içine girebilen özellikte proteazlarla zenginleştirilmiş olmasındandır. Apoptozisdeki yoğun kromatin yapıları ve nükleer proteinlerdeki oluşan çapraz bağlar, bu proteazlarla tespit edilir. Böylece bir çok histokimyasal metotla ya da yoğun ve zor DNA çalışmalarıyla gösterilemeyecek kadar küçük boyut ve orandaki apoptotik hücreleri bu yöntemle göstermek mümkün olur (82-87).

2.4. GLUTATHİON

Glutathion, 1888 yılında Rey Pailhade tarafından keşfedilmiş ve 1930 yılında da glutathionun L-glutamil-sisteinil-glisin yapısında bir tripeptit olduğu ortaya konulmuştur (76,88,89). Glutathion ana olarak karaciğerde glutamat, sistein ve glisinden sentezlenen bir tripeptittir. Biyosentez, sitoplazmada yer alan glutamilsistein sentetaz ve glutathion sentetaz enzimlerinin katalizi ile gerçekleşmektedir. Hücre içi yapılar ve diğer hücrelerin glutathion ihtiyacı sentezlenen glutathionun plazma ve intersellüler membranlarda yer alan özgün taşıyıcı proteinlerle aktarılması ile karşılanmaktadır. Glutathion hücre içi majör olmayan bir protein olan tiyoldür. Hücrede serbest ya da çeşitli moleküllere (özellikle proteinlere) bağlı olarak bulunabilmektedir. Serbest glutathion formu indirgenmiş (GSH) veya oksitlenmiş tiyol (GSSG) formlarında bulunur.

GSH hücre içi antioksidan sisteminin bir üyesi olup, hücre redoks dengesinin sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Peroksitleri, daha az zararlı olan yağ asitlerine, su ve GSH disülfidlerine dönüştürür. Antioksidan işlevinin yanı sıra sinyal iletisinin modülasyonu, hücre proliferasyonu ve immün cevapta da işlevleri tanımlanmıştır(89-93).

GSH bunların dışında;

- 1) DNA' nın deoksiribonükleotid öncüllerinin sentezinde görev alır.

- 2) Esansiyel-SH grupları içeren enzimlerin koruyucusu ve aktivatörü olarak görev yapar.
- 3) GSH-peroksidaz gibi antioksidan enzimler için kofaktör olarak çalışır.
- 4) Hücre için toksik olan sisteini depo eder.
- 5) Hücre içi bakır taşınımı ve detoksifikasyonda görev yapar.

Hücre içi GSH derişimi, GSH'nın hücrede kullanım-sentez hızına bağlıdır. Özellikle savunma sisteminde GSH kullanımı, hücre GSH/GSSG oranının düşmesine sebep olmaktadır. Oksidatif stres hücrede GSSG ve protein-karışık disülfit derişimlerinin artmasına neden olmaktadır.

GSH hücre içerisinde özellikle hidrojen peroksit (H₂O₂) detoksifikasyonu (glutathion peroksidaz aracılı) sırasında oksitlenmektedir. Oksidasyona uğrayan tiyollerin indirgenmesi ya da olası ise denovo biyosentez ile geri kazanımı NADPH bağımlı glutathion redüktaz, thiyol transferaz (TRX) ve glutaredoksin redüktaz (GRX) enzimleri tarafından sağlanır. GSSG ve protein tiyolleri ile karışık disülfitler bu enzim sistemleri tarafından GSH'a çevrilir (94-97).

GSH'nın çeşitli moleküllerle konjugasyonu, hücre GSH derişiminin düşmesi nedenleri arasında yer almaktadır. GSH'nın küçük moleküllerle oluşturduğu bu konjugatlar hücreden atılır. Konjugasyon veya atılım nedeni ile olan GSH miktarındaki azalma, hepatositlerde biyosentez ile ya da eksojen GSH alınımı ile karşılanır. Hücre içi GSH'nın düşmesi erken dönemde hücrede adaptif yanıt oluşturarak GSH biyosentezini arttırmaktadır (91,92,96).

Yüksek GSH derişimi hücre fonksiyon ve canlılığının bir göstergesi olarak kabul edilir.(98) Bunun aksine GSH derişiminin düşmesi hücre içi savunma sisteminin zayıflamasının ve mitokondriyal hasarın belirteçlerinden olarak kabul edilir (99).

Hücrenin apoptozisi başlatması ya da devam ettirmesinde, hücre içi GSH seviyesinin önemli olduğu görülmüştür. Hücre içi GSH seviyesi düşük olduğunda, hücre içi ROM artmakta ve apoptotik yolda rolü olan kaspaz aktivasyonu uyarılmaktadır (94,95).

Mitokondriyal ve sitoplazmik glutathionun tüketilmesi, apoptotik hücre ölümünün erken sinyali oluşturur. GSH'daki azalma mitokondri transmembran potansiyelini değiştirmekte, bu da mitokondrinin hızlı bir şekilde fonksiyonunu kaybederek, sitokrom C'nin sitoplazmaya salınımına sebep olmaktadır. Böylece apoptozise giden yol tetiklenmektedir (94) .

2.5. MALONDİALDEHİT

Serbest oksijen radikallerinin; savunma sisteminin koruyucu etkisini aşacak şekilde fazla oluşmaları sonucu, metabolizmada zararlı etkiler oluşturur. SOR'den en yüksek oranda etkilenen bileşik lipidlerdir. Membranlarda bulunan fosfolipidlerdeki doymamış bağlar ve kolesterol, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek, peroksidasyon ürünlerini meydana getirir. Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü malondialdehittir(100-102).

Oluşan malondialdehit; hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek, membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açarak, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. Malondialdehit bu özelliğinden dolayı, DNA'nın nitrojen bazları ile de reaksiyona girebilir. Bundan dolayı da malondialdehit mutajenik, kültür hücreleri için genotoksik ve karsinojeniktir(103,104).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları:

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinde yapılmıştır. Çalışmada her biri 200-250 gram arasında değişen 48 adet dişi Winstar albino ratlar kullanılmıştır. Ratlar çalışmaya başlamadan bir hafta önce üretim merkezinden araştırma merkezine getirilerek deney zamanına kadar, sıcaklığı +22⁰C ye ayarlanmış bir odada 12 saat gündüz, 12 saat gece ortamında tutulmuşlar, su ve standart yem ile beslenmişlerdir. Ratlar deneyden iki saat önce aç bırakılıp, su kısıtlaması yapılmamıştır. Bu çalışma öncesinde çalışma projesi, üniversitemiz “Hayvan Deneyi Etik Kurulu” tarafınca onaylanmış ve çalışmada tüm cerrahi girişimler “National Institutes of Health, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” kurallarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışma Grupları:

Grup 1: PHR (6 Rat)

Grup 2: IR + PHR (6 Rat)

Grup 3: IR (6 Rat)

Grup 4: Kontrol (6 Rat)

Grup 5: C1 INH (6 Rat)

Grup 6: C1 INH + IR + PHR (6 Rat)

Grup 7: C1 INH + PHR (6 Rat)

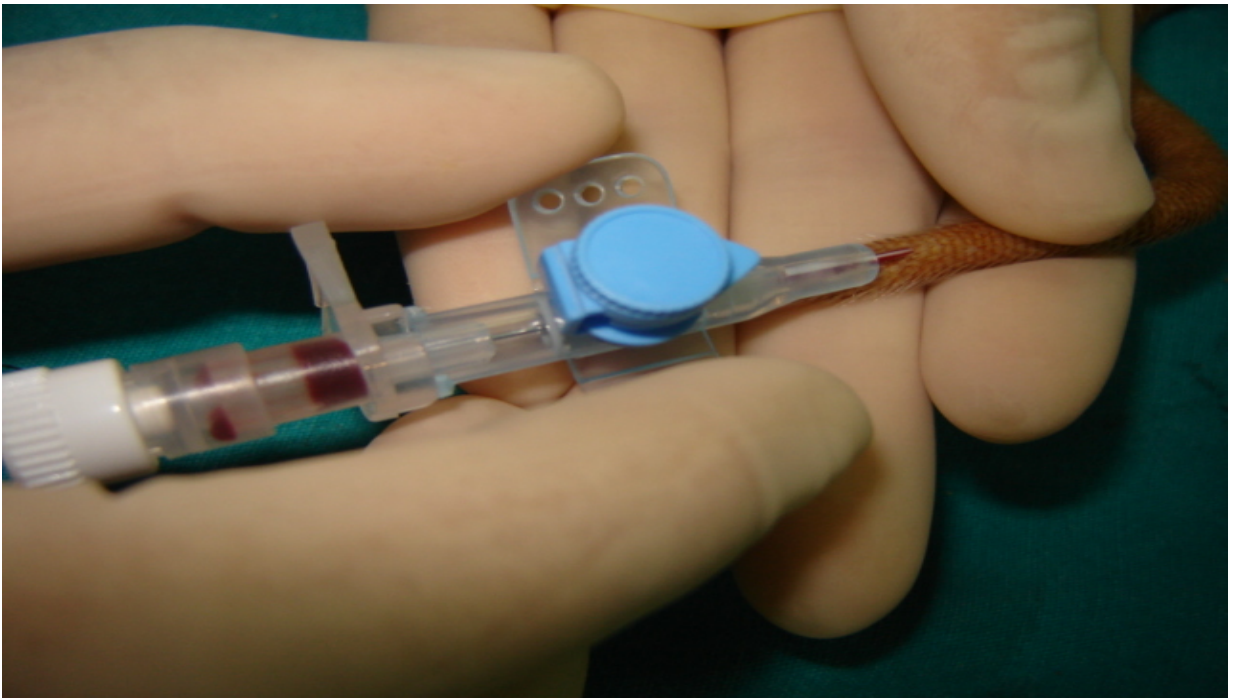
Grup 8: C1 INH + IR (6 Rat)

3.2. Anestezi:

Bütün hayvanların anestezisi, 50 mg/kg Ketamin Hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı Warner-Lambert ilaç sanayi, Levent, İstanbul) ve 7 mg/kg xylazine Hidroklorit’ in (Rompun, Bayer Şişli. İstanbul) aseptik şartlarda intraperitoneal verilmesi ile sağlandı.

3.3. C1 INH 'in Uygulanışı ve Sıvı Replasmanı

Cerrahi işlemden 10 dakika önce, C1 INH (Cetor) 200 mg/kg dozda IV olarak verildi. İlacın ve cerrahi uygulamanın getireceği sıvı açığını karşılamak amacı ile her rata ortalama 2 cc ringer laktat ve 3 cc % 5 dekstroz, karın insizyonu kapatılmadan önce intraperitoneal verildi. Anesteziden sonra uyanma süreleri, ortalama 4 saat olup ratların beslenme ve sıvı alımları takip edilerek, idrar çıkışları gözlemlendi. İlk 24 saat içinde tek doz fentanyl tüm ratlara 0,02 mg dozda subkütan olarak uygulandı.



RESİM 2: Kuyruk Veninden C1 INH Verilmesi İçin Damar Yolu Açılması

3.4. CERRAHİ TEKNİK

Hazırlık: İşlem öncesi ratlar tartıldı. Anestezi alan ratların, insizyon sahası traşlandı. Povidon iyot ile cilt antisepsisi sağlandıktan sonra, ameliyat düzeneğine kol ve bacakları tesbit edildi. Düzenek aspirasyon riskini önlemek amacıyla, 30 derece eğimli tutuldu ve steril örtü insizyon alanı açıkta kalacak şekilde kapatıldı.

İnsizyon: Üst orta hat insizyonu, kanama daha az olacağı düşünülerek tercih edildi. (Resim 4)

Hepatektomi: Karaciğer sol lateral segmenti, çevresindeki ligamentlerden kanama kontrolü ile disseke edilerek rezeke edildi. (Resim 8)

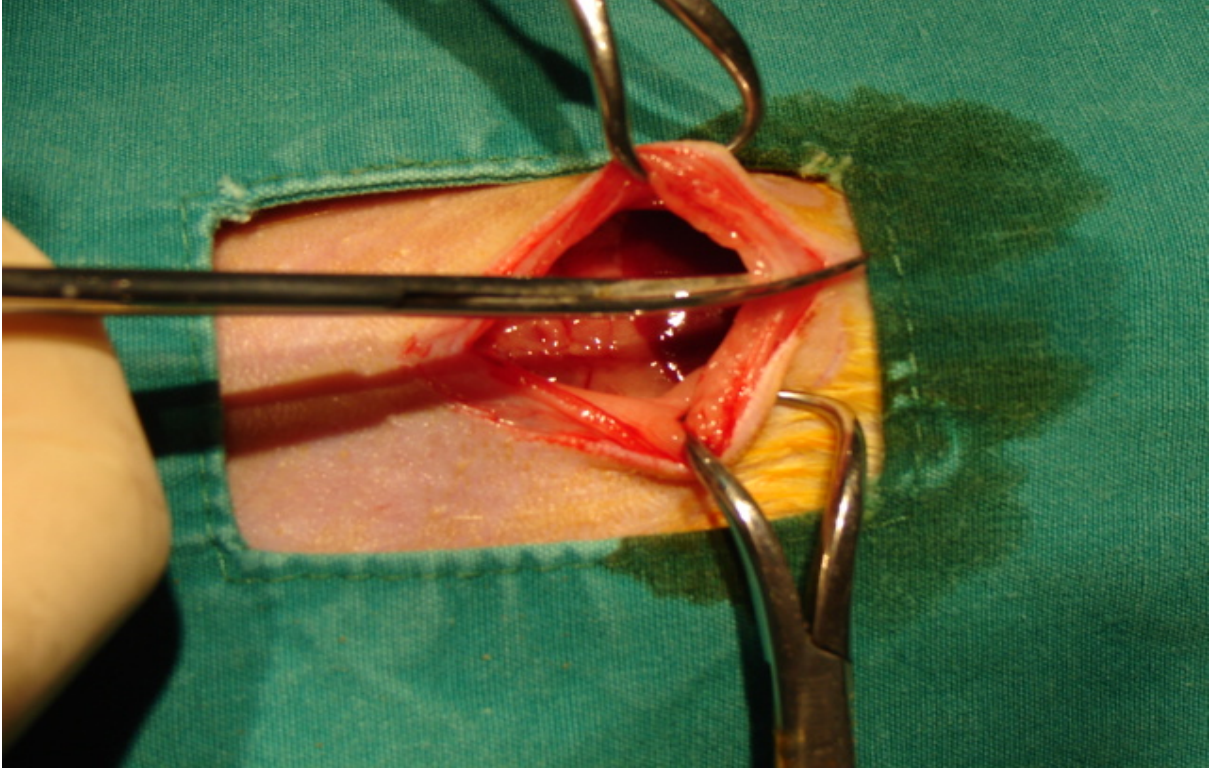
İskemi: Portal pediküle yerleştirilen mikrovasküler klemp ile sağlandı. İskemi süresi 45 dakika olarak uygulandı. Portal pedikül, disseksiyon mikroskopunda kanama kontrolü ile klemlendi ve iskemi izlendi. (Resim 5-6)

Reperfüzyon: 45 dakikalık bekleme süresi dolduktan sonra klemp kaldırıldı ve reperfüzyon disseksiyon mikroskopunda izlendi.

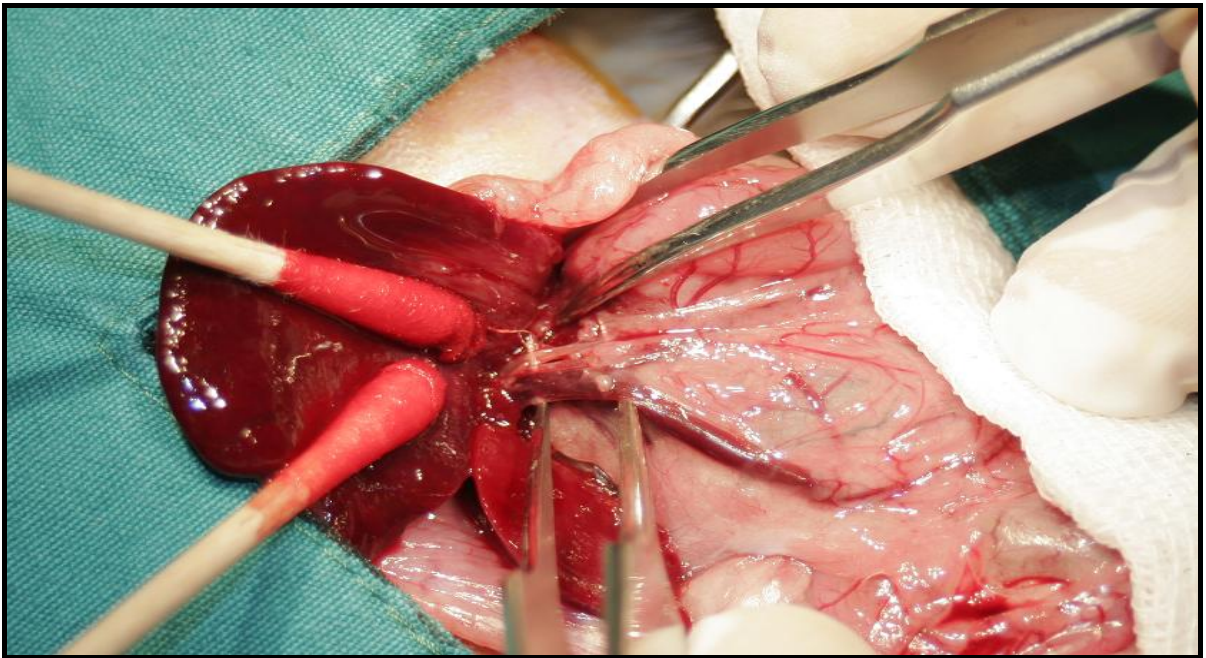
İskemi Süresini Bekleme: İskemi sürecinde olan ratlara, 2 cc ringer laktat intraperitoneal olarak verildikten sonra insizyon tek tabaka halinde 2 adet dikiş ile yaklaştırıldı. İnsizyon üzerine steril spanç kapatılarak, ısı lambası altında 45 dakika bekletildi ve ısı kontrolü sağlandı.

İşlem Sonrası Gözlem: Tüm ratların insizyonu 3/0 ipek kullanılarak 2 tabaka halinde kapatıldı. Kapatılmadan önce %5 lik dekstroz 3 cc intraperitoneal olarak verildi. Anestezi etkisi geçene kadar vücut ısısı ve solunumu normal olacak şekilde izlendi.

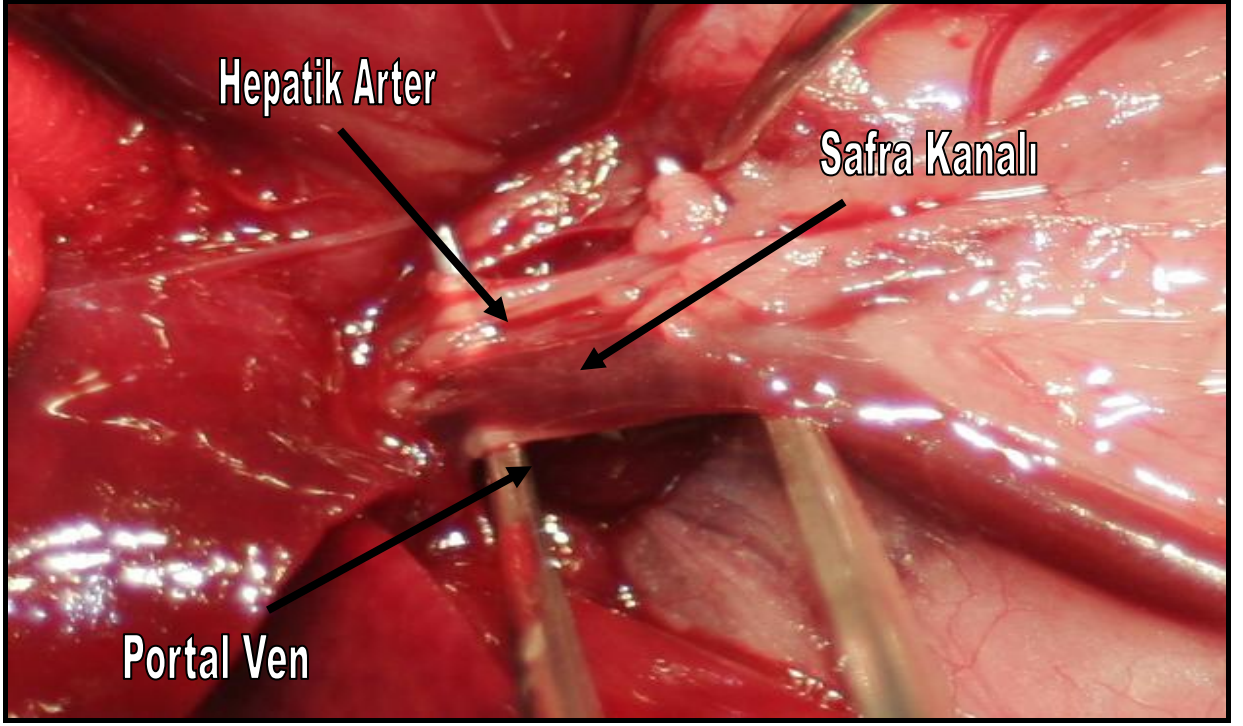
Sakrifikasyon: Ameliyat sonrası beşinci gün, ratlar sakrifiye edildi. Önce sitokin analizi için gerekli 5 cc venöz kanı vena kava inferiordan alındı, ardından karaciğer eksize edilerek immunhistokimyasal ve biyokimyasal parametreler için ayrıldı. (Resim 7)



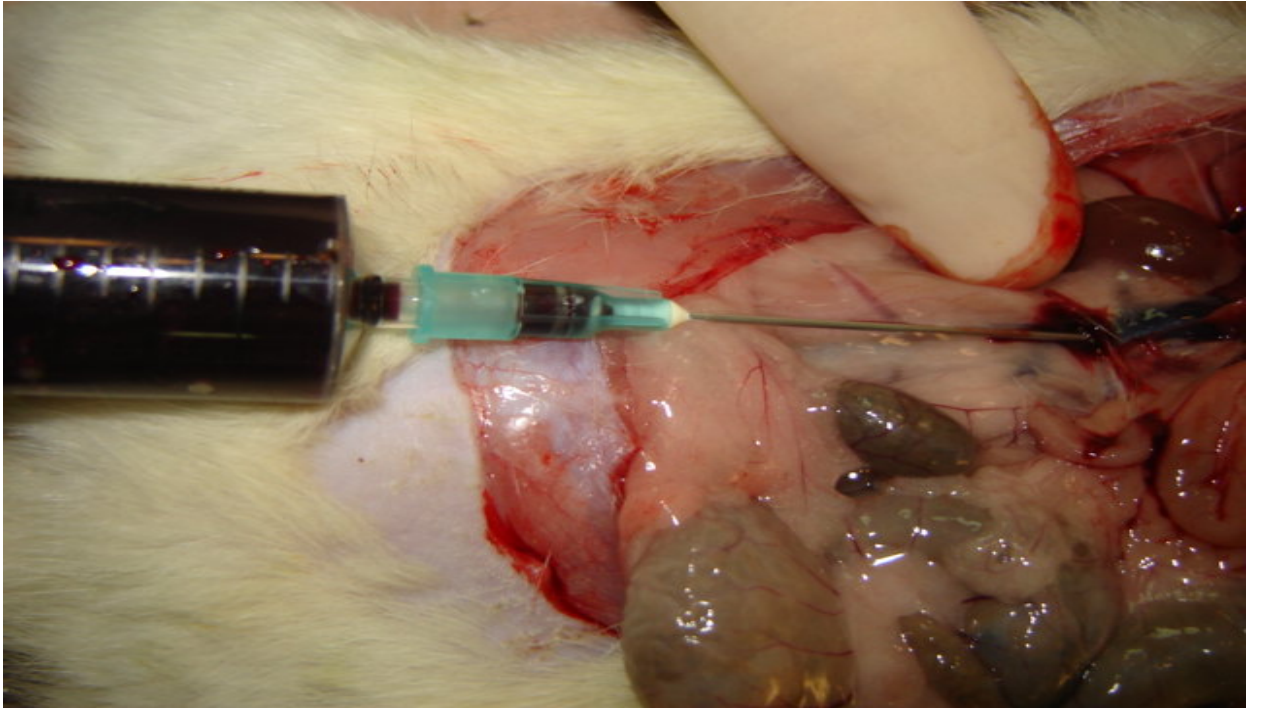
Resim 3: Orta Hattan Laparotomiye Başlanması



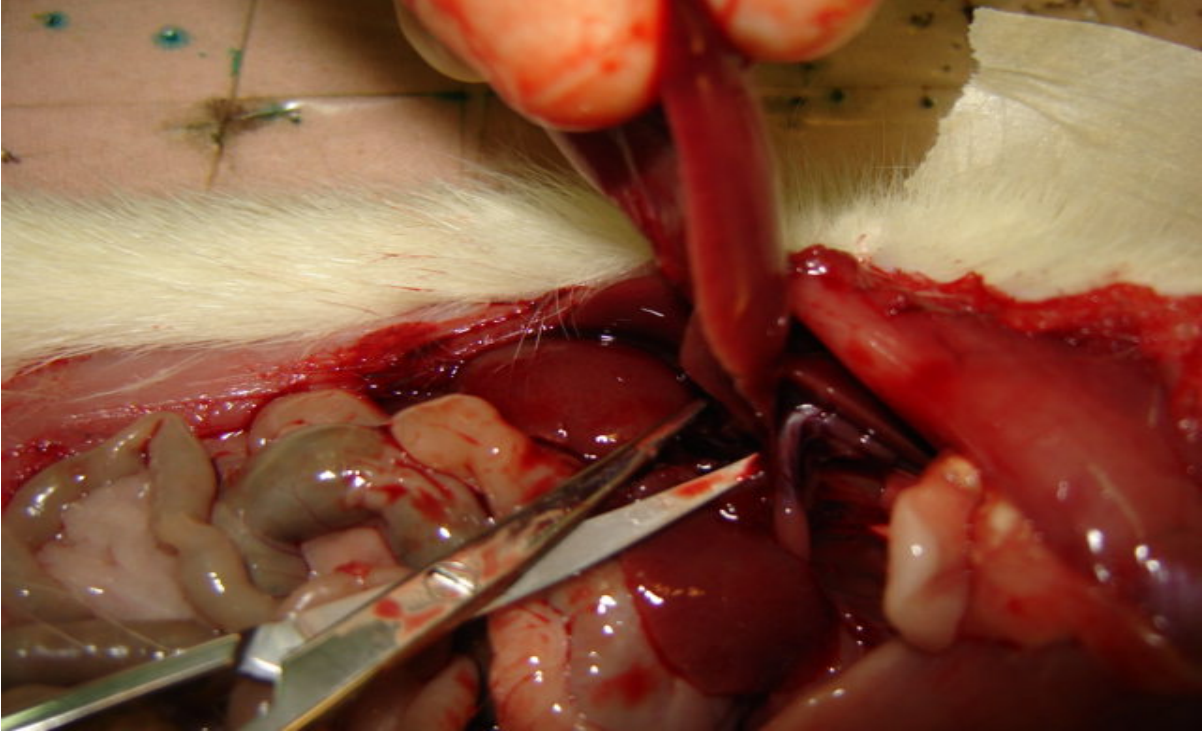
Resim 4: Portal Pedikül Disseksiyonu



Resim 5: Portal Pedikül



Resim 6: Vena Kava İneriordan Kan Örneklerinin Alınması



Resim 7: Kısmi Karaciğer Rezeksiyonu

3.5. ARAŞTIRMA PARAMETRELERİ

Araştırmada kontrol ve deney gruplarında;

3.5.1. İmmunhistokimyasal Analiz

Apoptozisin Değerlendirilmesi

Karaciğer sol lobundan alınan doku örnekleri, incelemenin yapılacağı güne kadar % 10'luk formal içinde, her bir rat için ayrı saklama kabında bekletildi.

İnceleme yapılacağı zaman doku örnekleri doku takip kasetlerine alınarak parafin blok haline getirildi. Her parafin bloktan 3 mikron kalınlığında kesitler alındı, kesitler etüvde 56 °C'de bir gece bekletilerek deparafinize edildi.

- TUNNEL yöntemi (In situ Cell Death Detection Kit; TUNNEL Metodu: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated Deoxyuridine Triphosphate Nick End Labeling) için, deparafinize edilen kesitlere proteinaz K damlatılarak 2 saat oda ısısında bekletildi. Tris Buffer Saline (TBS) ile iki kez yıkandı ve kurulandı. TUNNEL reaksiyon mixture ile 2 saat karanlık ve nemli ortamda bekletilerek, TBS ile tekrar yıkandı ve kurulandı.

Conventer-POD (vial-3)' de, 30 dakika oda ısısında bekletildi. Kromojen diamino benzidinde, 10 dakika oda ısısında bekletilerek tekrar yıkandı. Boyama işlemi metil green ile tamamlandı.

Işık mikroskopunda en büyük büyütmede (x40 HBF) 200 hücre sayıldı. Pozitif boyanan hücre sayısı % olarak belirtildi.

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) İşlemi

Deparafinizasyon işleminden sonra, kesitlere PCNA antikoru damlatıldı. 2 saat bekletilerek TBS de 5 dakika yıkandı. Daha sonra biomylated damlatılarak, 20 dakika bekletildi ve TBS ile tekrar 5 dakika yıkandı. Bunun ardından streptavidin damlatılarak 20 dakika bekletildi ve TBS ile 5 dakika yıkandı, 10 dakika süre ile üzerine diaminobenzidin damlatıldı ve çeşme suyunda yıkandı. Hemotoksilenle 1 dakika zıt boyama yapıldıktan sonra, ksilen ile şeffaflaştırılıp balzamlı kapatıldı.

Işık mikroskopunda en büyük büyütmede (x40 HBF) 1000 hücre sayılarak, pozitif hücre sayısı % olarak değerlendirildi.

3.5.2. KCFT Tayini:

Sakrifikasyon sonrası sol ventrikülden kan örnekleri (5 cc) alındıktan sonra santrifüj edilerek -70 C °'de sıvı nitrojenle dondurularak saklanan serum örneklerinde; Karaciğer fonksiyon testleri (AST-ALT) Başkent Üniversitesi Biyokimya Bölümünde değerlendirildi. Tüm biyokimyasal analizler çift çalışma şeklinde gerçekleştirildi.

3.5.3. Elektron Mikroskopik İnceleme

Tüm dokular fosfat tamponlu %2,5 gluteraldehit içerisinde 2-3 saat fikse edildi. %1 lik osmium tetraoksit ile defiksasyonu takiben derecelendirilmiş alkol banyosunda dehidrate edildi. Spesimenler propilen oksit içerisinde geçirildi, araldit CY 212, 2-dodesenil süksinik anhidrat, bezildimetil amin ve dibutilpentalat içine gömüldü. Yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile renklendirildi ve ışık mikroskobu altında sahalar seçildi. Ardından ince kesitler alınarak uranil asetat ve kurşun sitrat ile kaplanarak LEO 906E transmisyon elektron mikroskopisinde incelendi.

3.5.4 Karaciğer Dokusunda Reperfüzyonun Değerlendirilmesi:

Dokuda MDA ve GSH Analizi:

Doku MDA Derişiminin Saptanması:

Doku örneklerinde MDA ve redükte glutathion (GSH) analizleri için karaciğer doku homojenatları soğukta 0,15 M KCl içinde (%10, w/v) cam homojenizatörler kullanılarak hazırlandı.

Lipid peroksidasyon belirteci olarak doku MDA derişimi Beuge ve Aust tarafından tanımlanan yöntemle göre analiz edildi. Yöntem, MDA'nın tiyobarbitürik asit ile yaptığı kompleksin kalorimetrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır. Bu yöntemle göre bir hacim doku homojenat örneğinin iki hacim stok reaktif (0,25 N HCl içinde %14 trikloroasetik asit ve % 0,375 tiyobarbitürik asit içeren) ile reaksiyona girmesi sonrasında hazırlanan reaksiyon karışımları 15 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildikten sonra soğutulup, 1000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantların absorbansı spektrofotometrik olarak 535 nm'de reaktif körü'ne karşı ölçüldü. Molar ekstinksiyon katsayısı ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplanan sonuçlar nmol MDA/gram doku olarak ifade edildi.

Doku GSH Derişiminin Saptanması

Doku homojenatlarında redükte glutathion (GSH) düzeyleri Ellman tarafından tanımlanan sülfidril grup analizi prensibine göre tayin edildi. Bu yöntemde örneklerin deproteinizasyonu sonrasında Ellman'ın renk reaktifi (%40 DTNB, w/v %1 sodyum sitrat içinde) ile süpernatantların reaksiyonu sonucu oluşan renkli kompleksin absobansı 412 nm'de reaktif körüne karşı spektrofotometrik olarak ölçüldü. GSH derişimleri GSH eğrisi kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar nmol GSH/mg protein olarak ifade edildi.

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Araştırma bulgularının istatistiksel analizleri SPSS 9.0 paket programı ile yapılmıştır. İstatistiksel analizde merkezi dağılım ölçütleri olan ortalama ve standart sapmalar hesaplanmış, nonparametrik verilerin analizinde nominal değerlerin gruplar arası farklılıkları Independent Samples T testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve $p < 0.05$ değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir

4. SONUÇLAR

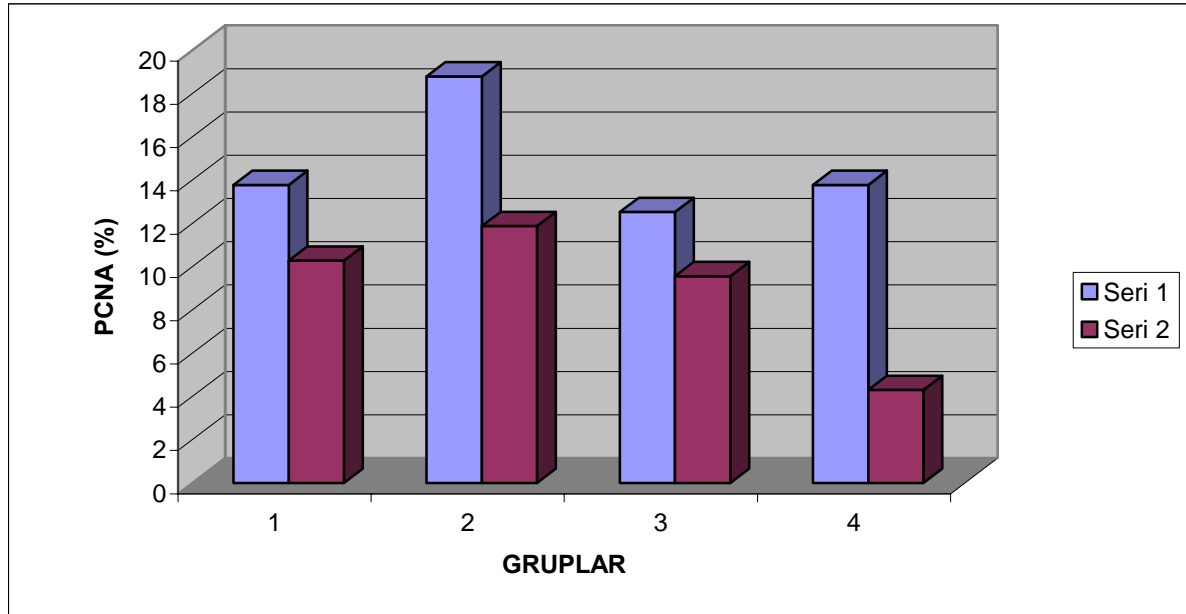
4.1. PATOLOJİ

PCNA için; ilaç alan ve aynı cerrahi işlem uygulanan gruplar karşılaştırıldığında; (IR+PHR ve C1 INH+IR+PHR), (IR ve C1 INH+IR) ile Kontrol Grubu ve Sadece İlaç uygulanan grup arasında istatistiksel olarak $p<0,05$ 'e göre anlamlı fark bulundu. İskemi Reperfüzyon uygulanmayıp sadece kısmi karaciğer rezeksiyonu yapılan grupta (PHR ve C1 INH+PHR) anlamlı fark saptanmadı.

Apoptozis için; ilaç alan ve almayan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında; (PHR ve C1 INH+PHR), (IR ve C1 INH+IR), Kontrol Grubu ve Sadece C1 INH uygulanan grup arasında istatistiksel olarak $p<0,05$ 'e göre anlamlı fark bulundu.

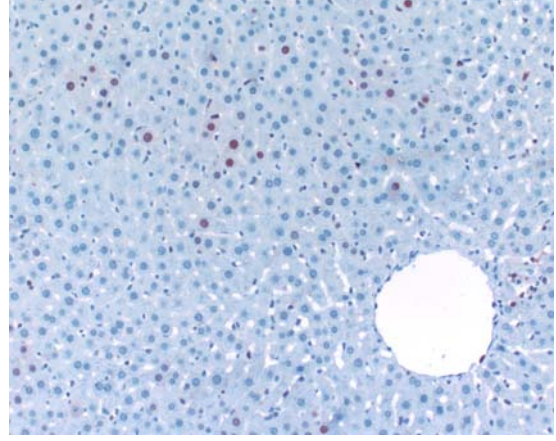
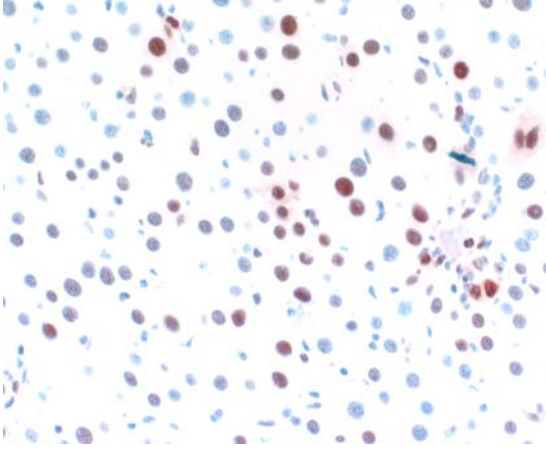
RAT (PCNA)	Ortalama Değer	Ortalama Standart Hata
GRUP 1 (PHR)	13,78	$\pm 1,96$
(C1 INH +PHR)	10,28	$\pm 4,71$
GRUP 2 (IR+PHR)	18,80	$\pm 1,95$
(C1 INH+IR+PHR)	11,88	$\pm 2,10$
GRUP 3 (IR)	12,53	$\pm 1,08$
(C1 INH+IR)	9,56	$\pm 3,05$
GRUP 4 (Kontrol)	13,78	$\pm 4,84$
(C1 INH)	4,30	$\pm 1,57$

TABLO 1: PCNA İçin Ortalama Değerler / Ortalama Standart Hata Değerleri

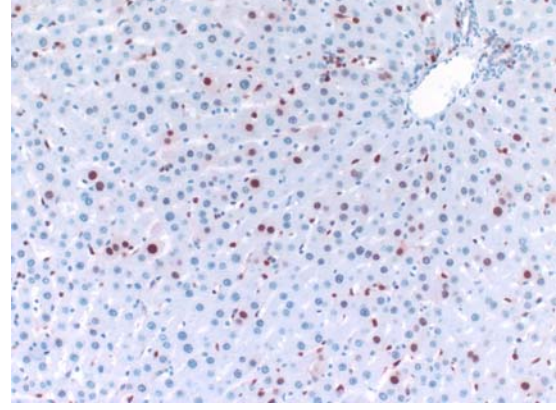
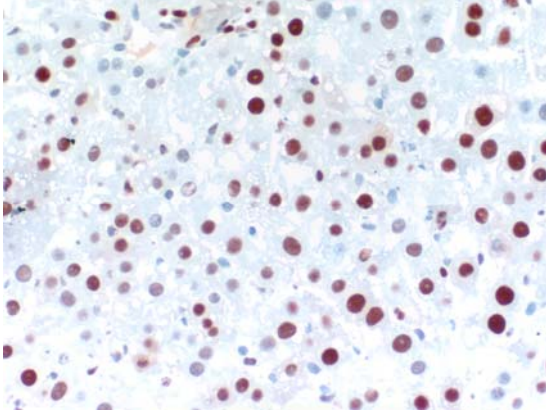


GRAFİK 1: PCNA İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı

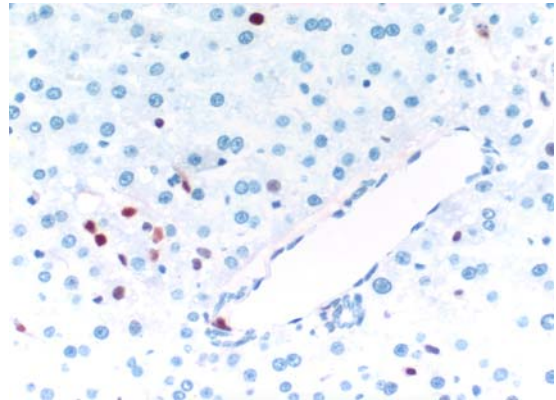
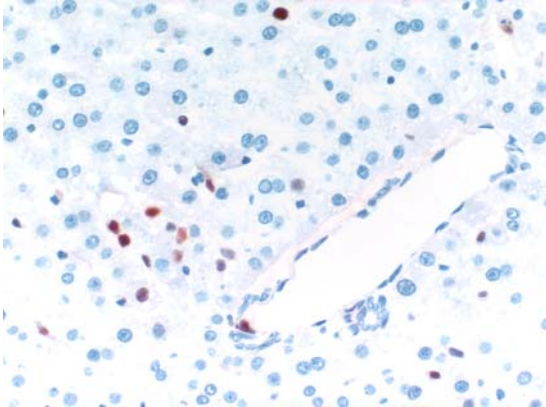
RESİM 8: Gruplara Göre PCNA Boyamaları



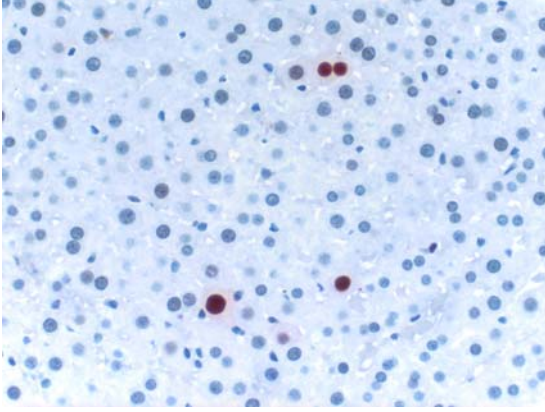
Grup 1: Kısmi Karaciğer Rezeksiyonu



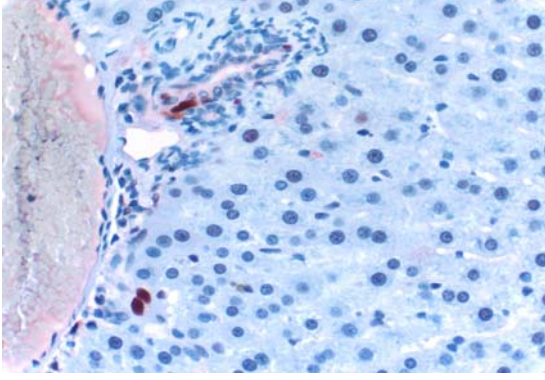
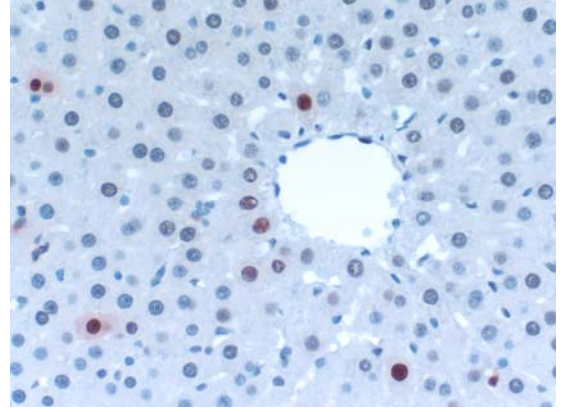
Grup 2: İskemi Reperfüzyon + Kısmi Karaciğer Rezeksiyonu



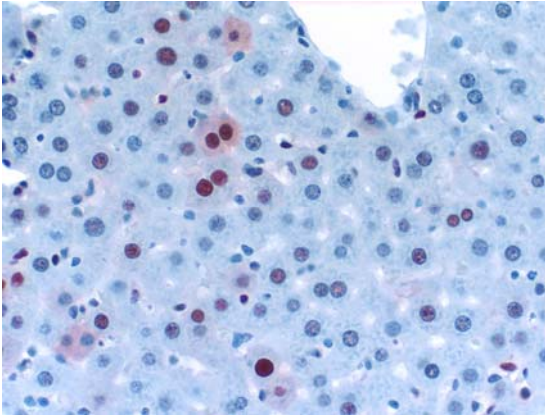
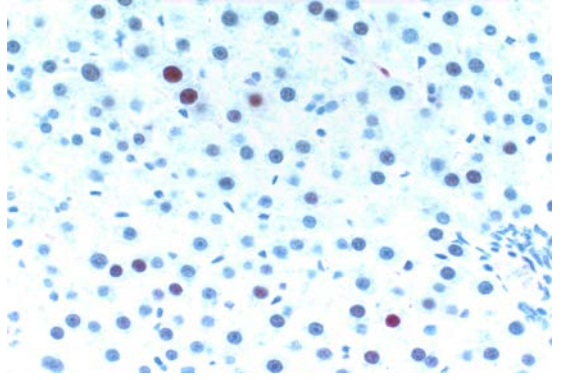
Grup 3 : İskemi Reperfüzyon



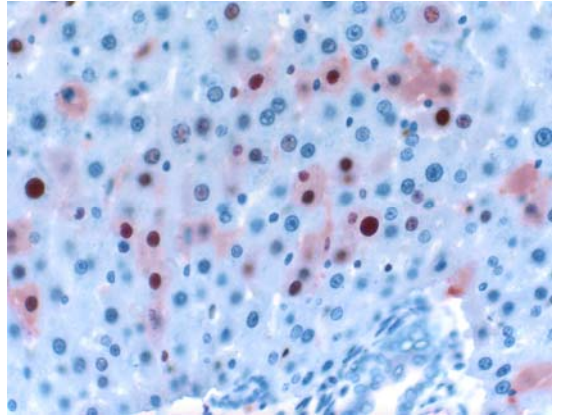
Grup 4 : Kontrol Grubu

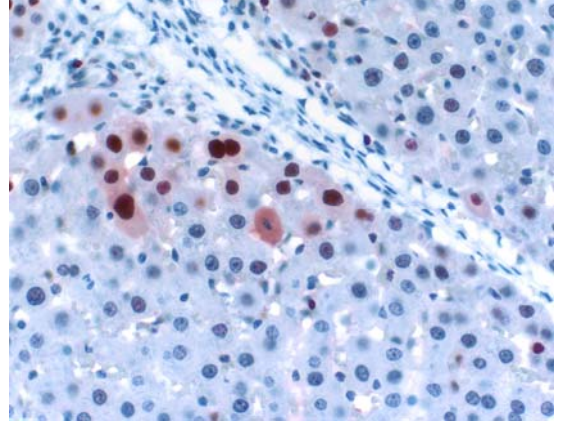
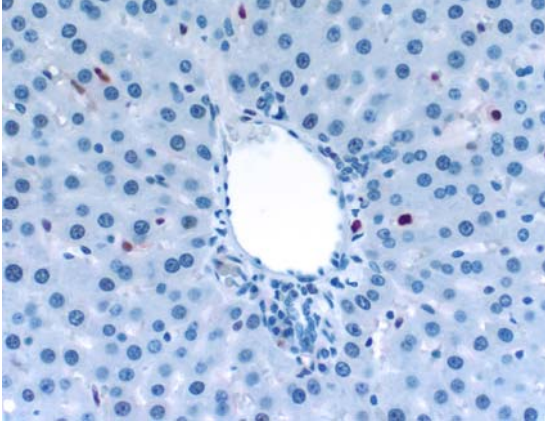


Grup5: Sadece C1 INH Verilen Grup

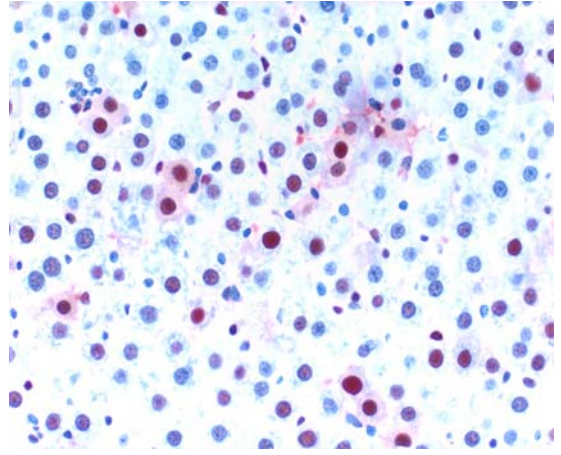
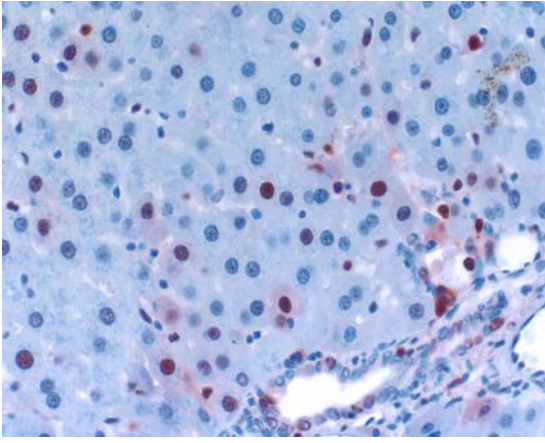


Grup 6: C1 INH + İskemi Reperfüzyon + Kısmi Karaciğer Rezeksiyonu





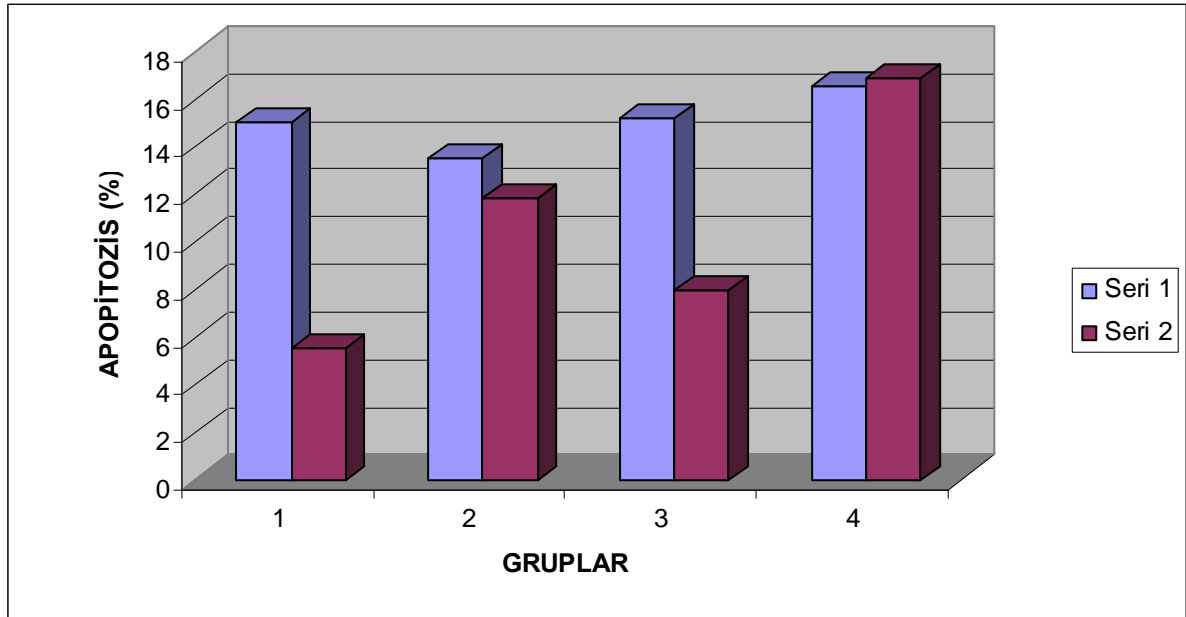
Grup 7: C1 INH + Kısmi Karaciğer Rezeksiyonu



Grup 8: C1 INH + İskemi Reperfüzyon

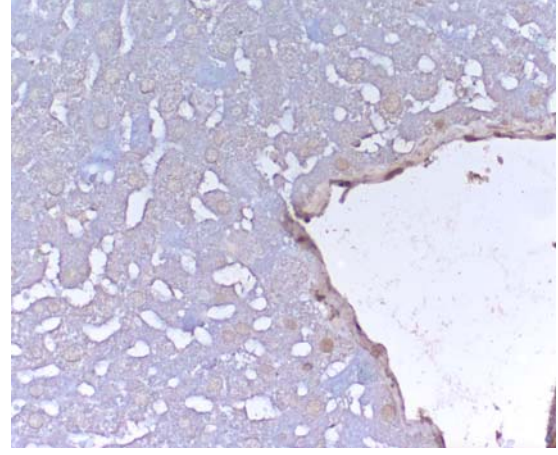
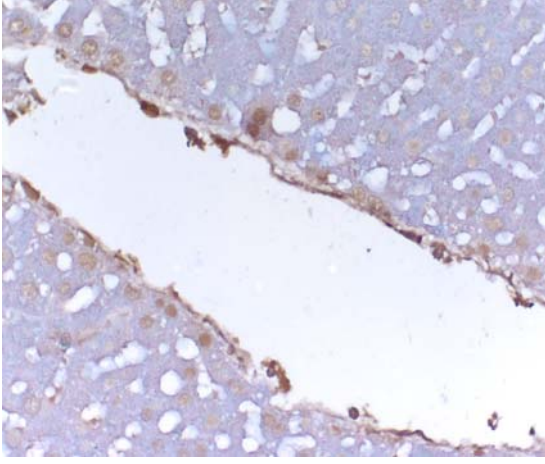
RAT (APOPTOZİS)	ORTALAMA DEĞER	ORTALAMA STANDART HATA
GRUP 1 (PHR)	15,01	$\pm 2,57$
(C1 INH+PHR)	5,49	$\pm 0,96$
GRUP 2 (IR+PHR)	13,48	$\pm 0,99$
(C1 INH+IR+PHR)	11,85	$\pm 0,95$
GRUP 3 (IR)	15,21	$\pm 1,70$
(C1 INH+IR)	7,95	$\pm 0,72$
GRUP 4 (KONTROL)	16,51	$\pm 0,62$
(C1 INH)	16,87	$\pm 3,14$

TABLO 2: Apoptozis İçin Ortalama Değerler / Ortalama Standart Hata Değerleri

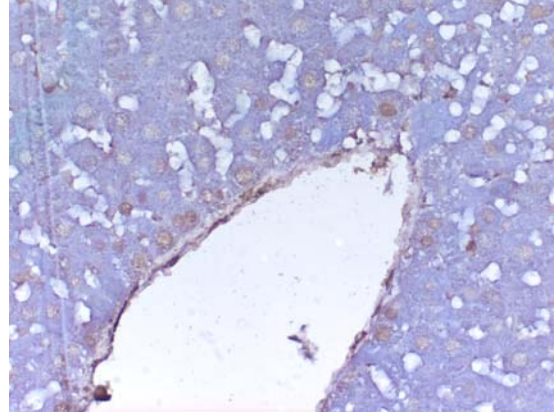
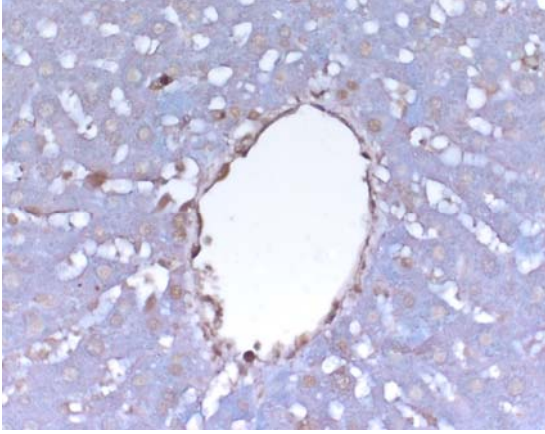


GRAFİK 2: Apoptozis İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırmalı Dağılımı

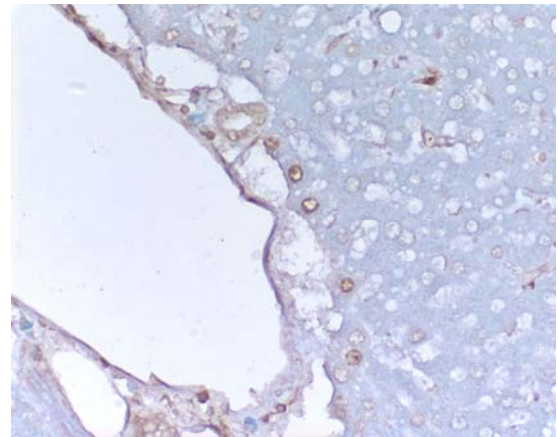
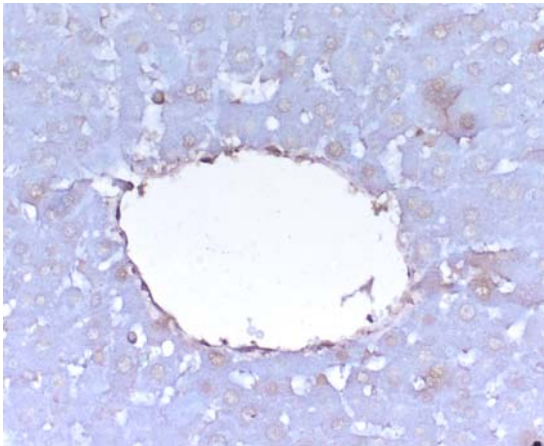
RESİM 9: Gruplara Göre TUNEL Boyamaları



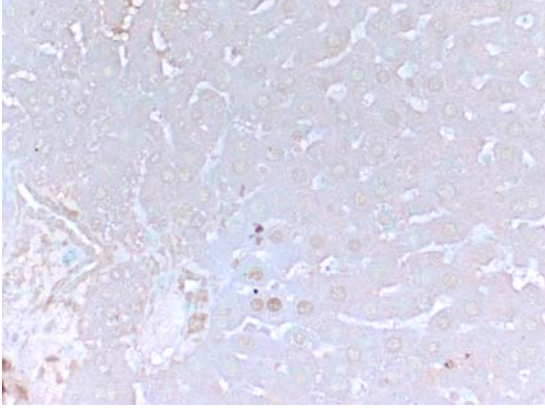
Grup 1: Kısmi Karaciğer Rezeksiyonu



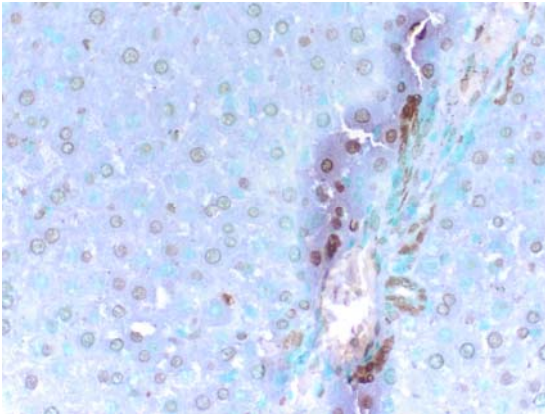
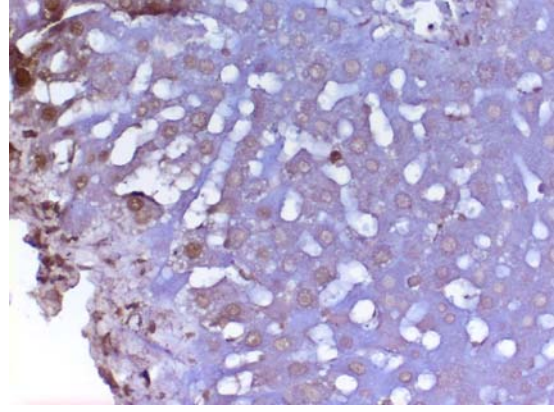
Grup 2 : İskemi Reperfüzyon + Kısmi Karaciğer Rezeksiyonu



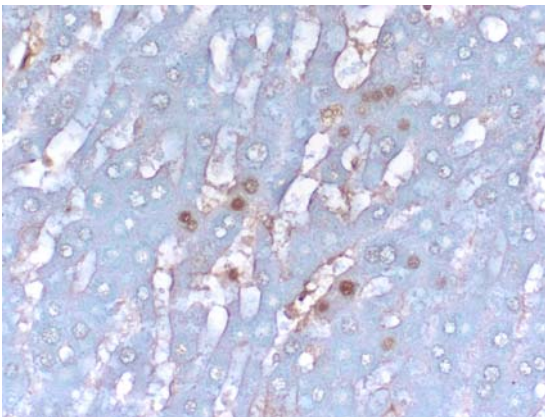
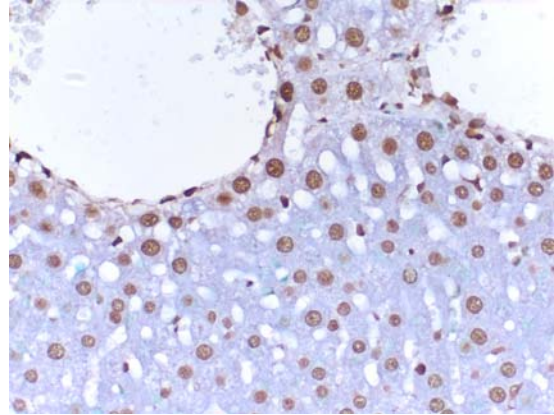
Grup 3: İskemi Reperfüzyon



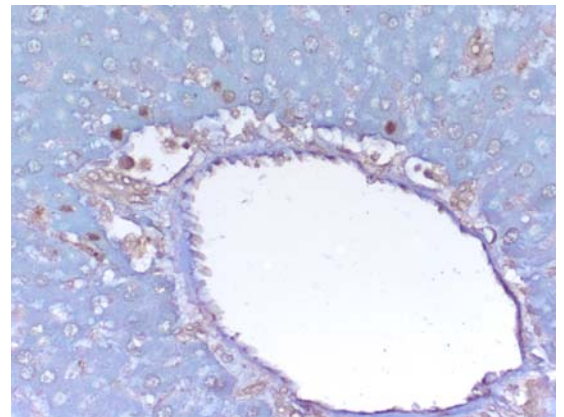
Grup 4: Kontrol Grubu

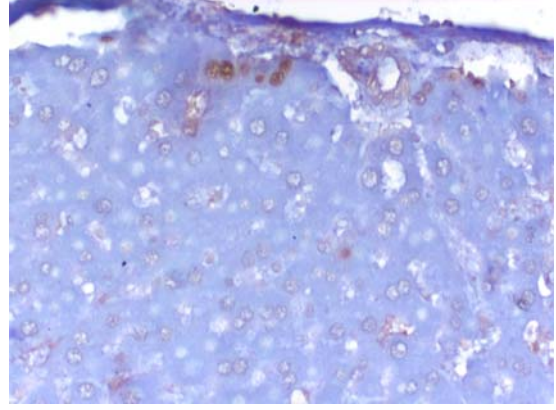
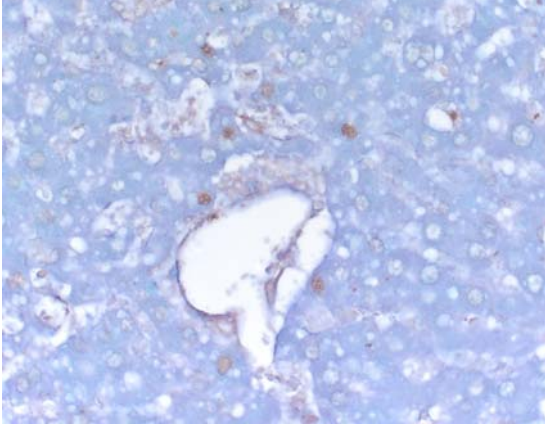


Grup 5: Sadece C1 INH Verilen Grup

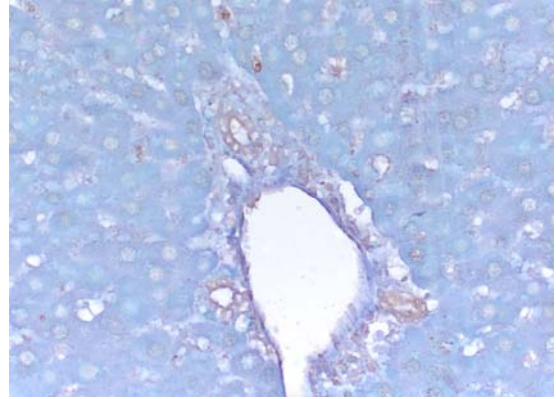
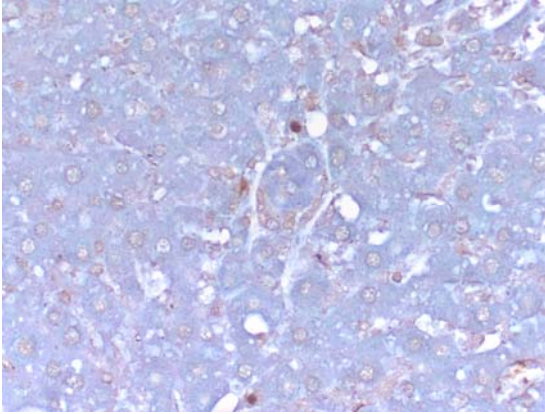


Grup 6: C1 INH + İskemi Reperfüzyon + Kısmi Karaciğer Rezeksiyonu





Grup 7: C1 INH + Kısmi Karaciğer Rezeksiyonu

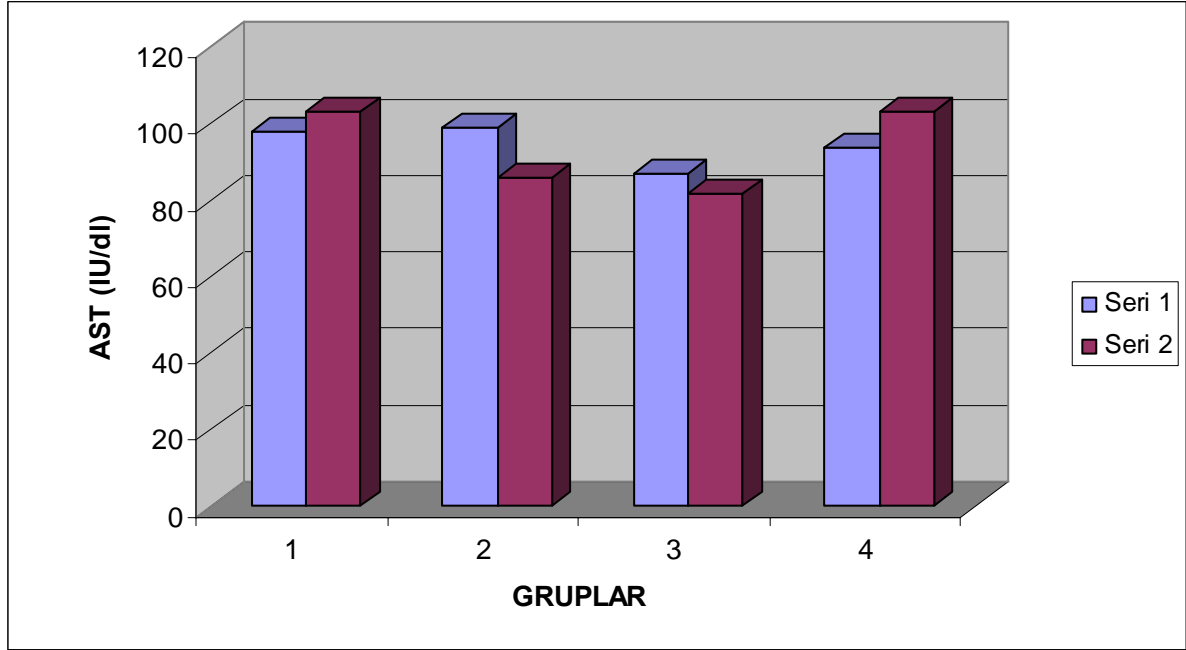


Grup 8: C1 INH + İskemi Reperfüzyon

4.2. BİYOKİMYASAL ANALİZ

RAT	ORTALAMA AST DEĞERLERİ	ORTALAMA STANDART HATA
GRUP 1 (PHR) (C1 INH+PHR)	97,833 103,166	6,75 13,09
GRUP 2: (IR+PHR) (C1 INH+IR+PHR)	99,0 85,66	14,95 6,32
GRUP 3: (IR) (C1 INH+IR)	86,83 81,83	17,31 2,05
GRUP 4: (KONTROL) (C1 INH)	93,83 103,33	2,67 21,39

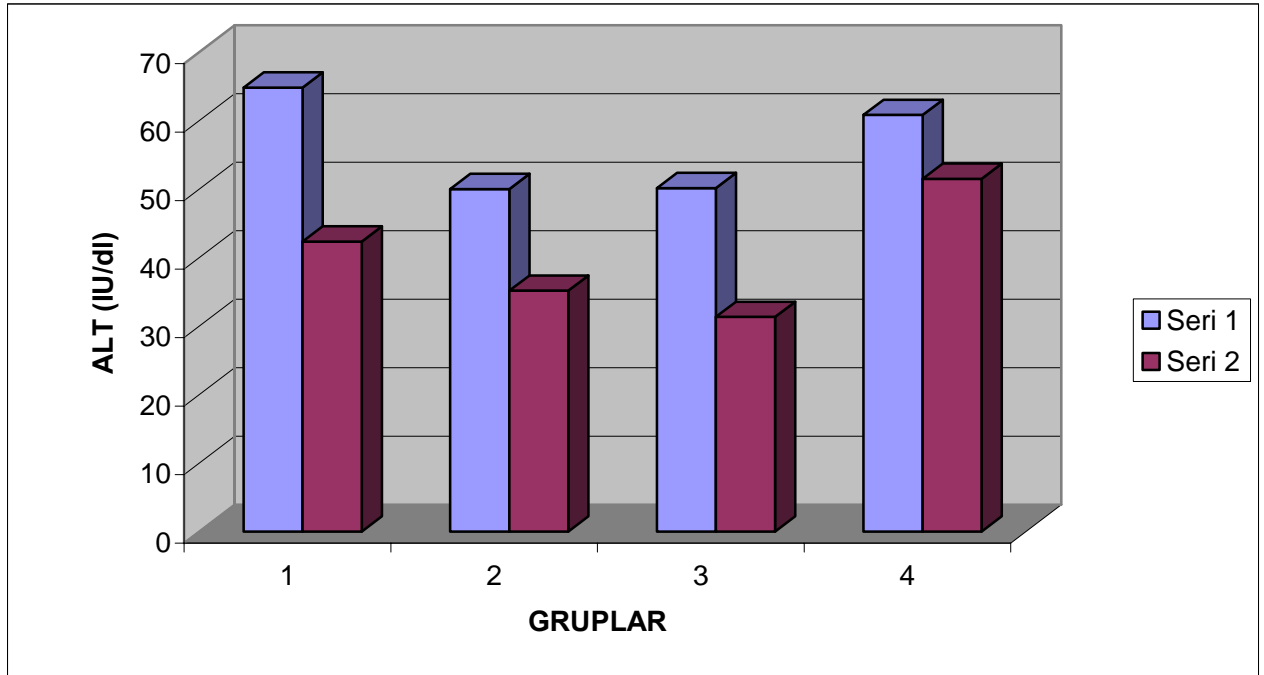
TABLO 3: AST İçin Değerler / Ortalama Standart Hata Değerleri



GRAFİK 3: AST İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırmalı Dağılımı

RAT	ORTALAMA ALT DEĞERLERİ	ORTALAMA STANDART HATA
GRUP 1 (PHR) (C1 INH+PHR)	64,83 42,33	8,21 3,93
GRUP 2: (IR+PHR) (C1 INH+IR+PHR)	50,00 35,16	5,31 3,97
GRUP 3: (IR) (C1 INH+IR)	50,16 31,33	3,11 2,80
GRUP 4: (KONTROL) (C1 INH)	60,83 51,50	2,77 11,23

TABLO 4: ALT İçin Ortalama Değerler / Ortalama Standart Hata Değerleri



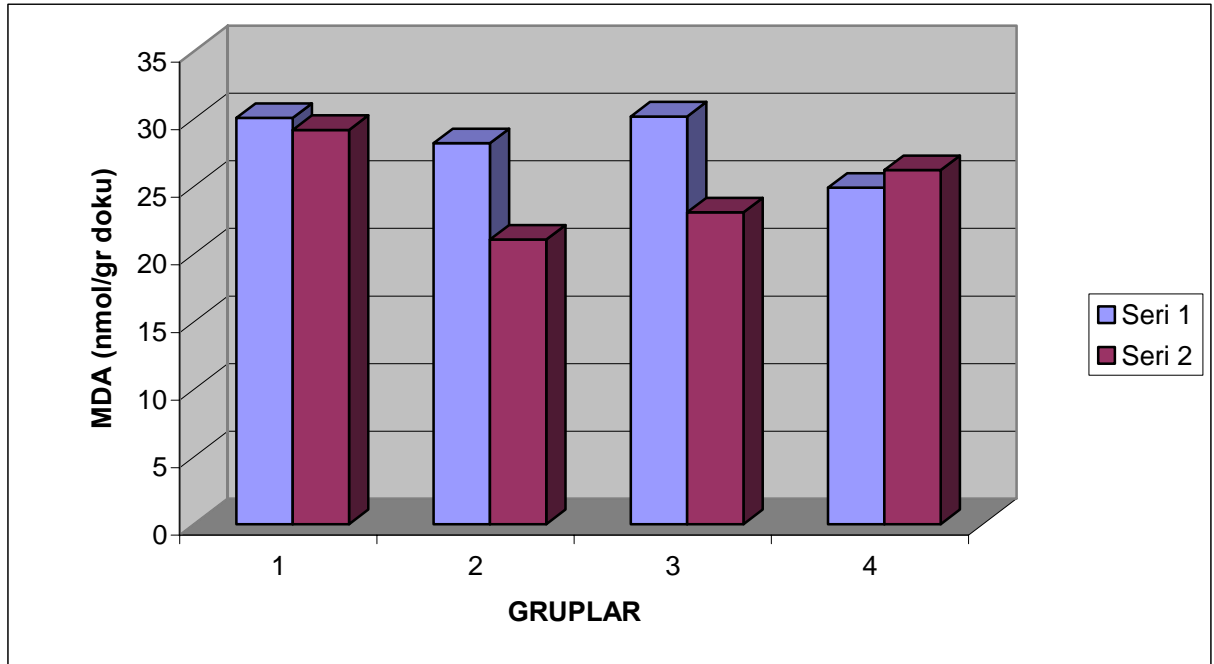
GRAFİK 4: ALT İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı

AST değerleri için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmaz iken ALT ilaç alan tüm gruplarda anlamlı düşük bulunmuştur. ($p < 0.05$)

4.3. DOKUDA MDA VE GSH ANALİZİ

RAT	MDA (nmol/g doku) ORTALAMA DEĞERLER	MDA (nmol/g doku) STANDART HATA
GRUP 1 (PHR) (C1 INH+PHR)	30.06 29.17	± 1.2 ± 0.9
GRUP 2: (IR+PHR) (C1 INH+IR+PHR)	28.19 21.06	± 3.2 ± 1.04
GRUP 3: (IR) (C1 INH+IR)	30.17 23.08	± 0.8 ± 2.5
GRUP 4: (KONTROL) (C1 INH)	24.9 26.20	± 2.0 ± 2.8

TABLO 5: Doku MDA Düzeyi İçin Ortalama Değerler / Ortalama Standart Hata Değerleri

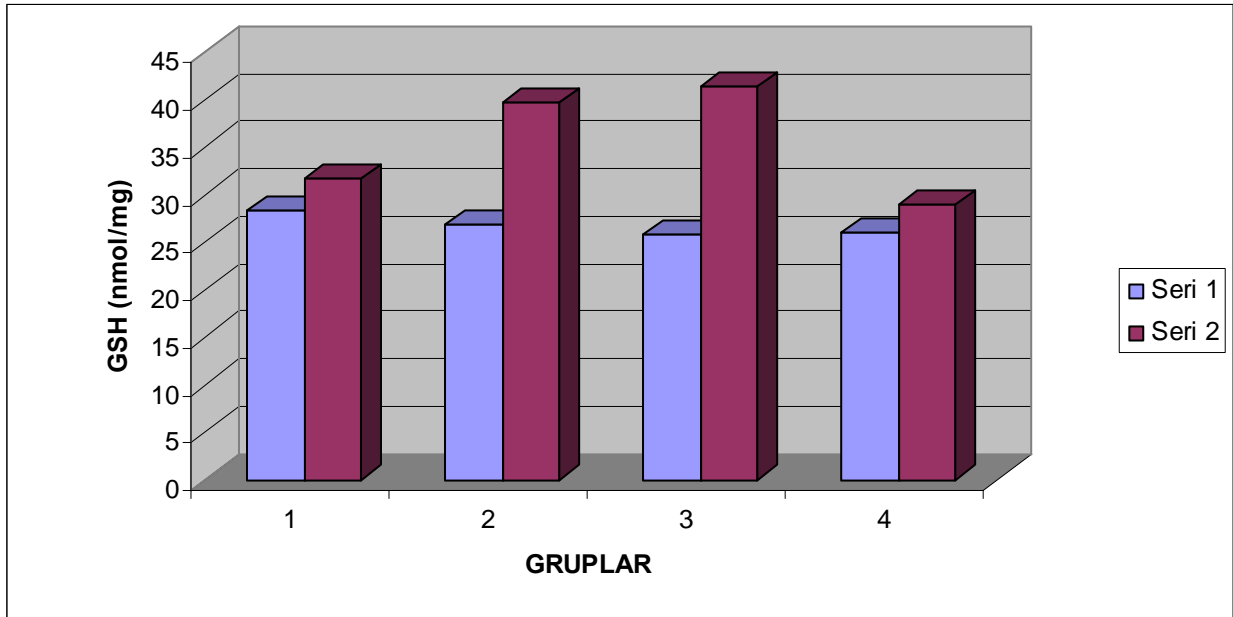


Grafik 5: Doku MDA Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında sadece grup 2 (IR+PHR ile C1 INH+IR+PHR) ve grup 3 (IR ile C1 INH+IR) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p < 0.05$)

RAT	GSH (nmol/mg) ORTALAMA DEĞERLER	GSH (nmol/g doku) STANDART HATA
GRUP 1 (PHR) (C1 INH+PHR)	28.3 31.7	±1.2 ±4.2
GRUP 2: (IR+PHR) (C1 INH+IR+PHR)	26.8 39,6	± 3.4 ±3.7
GRUP 3: (IR) (C1 INH+IR)	25.8 41.3	± 1.0 ±4.1
GRUP 4: (KONTROL) (C1 INH)	26.0 28.9	± 0.7 ±1.1

TABLO 6: Doku GSH Düzeyi İçin Ortalama Değerler / Ortalama Standart Hata Değerleri

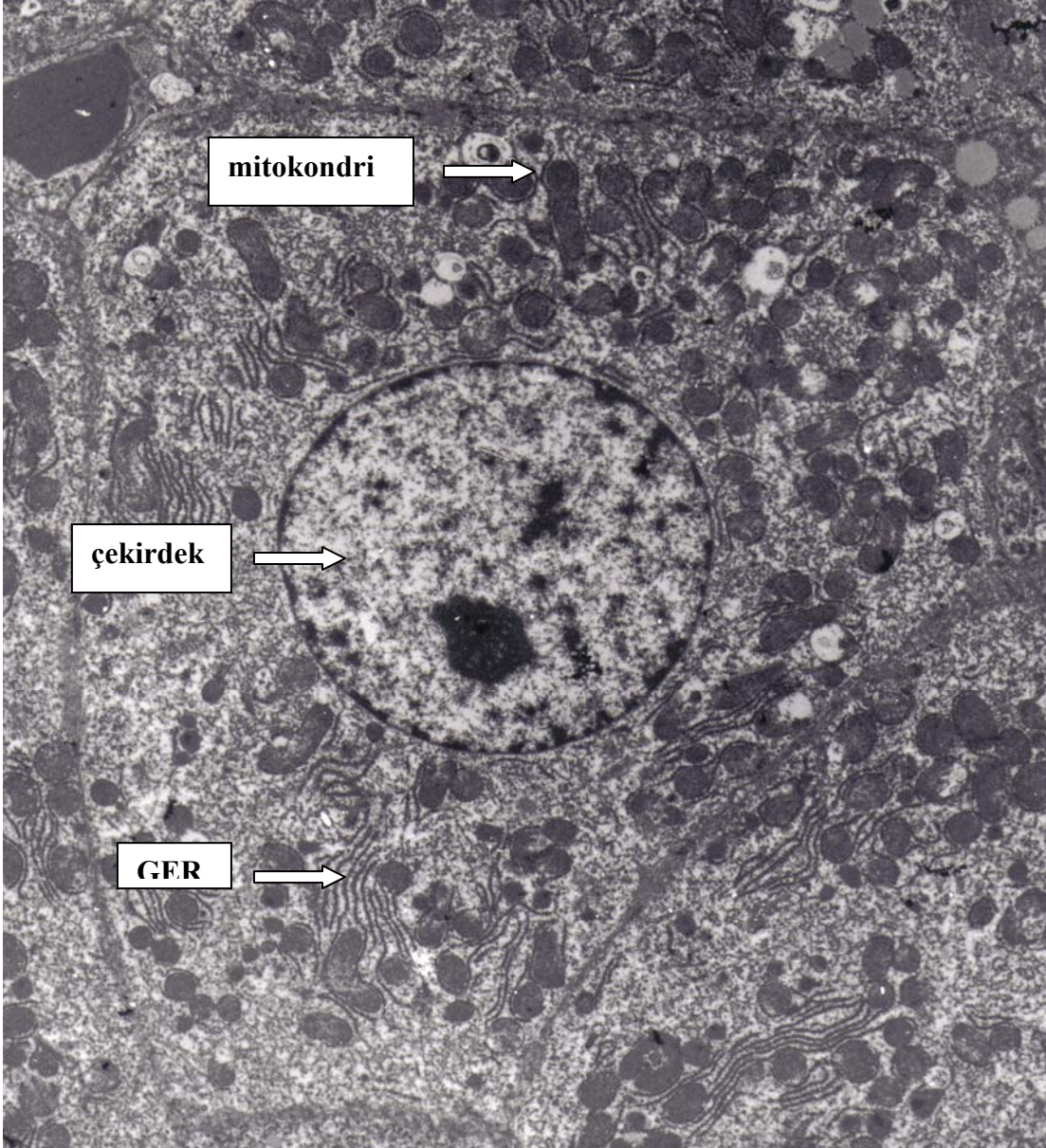


GRAFİK 6: Doku GSH Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı

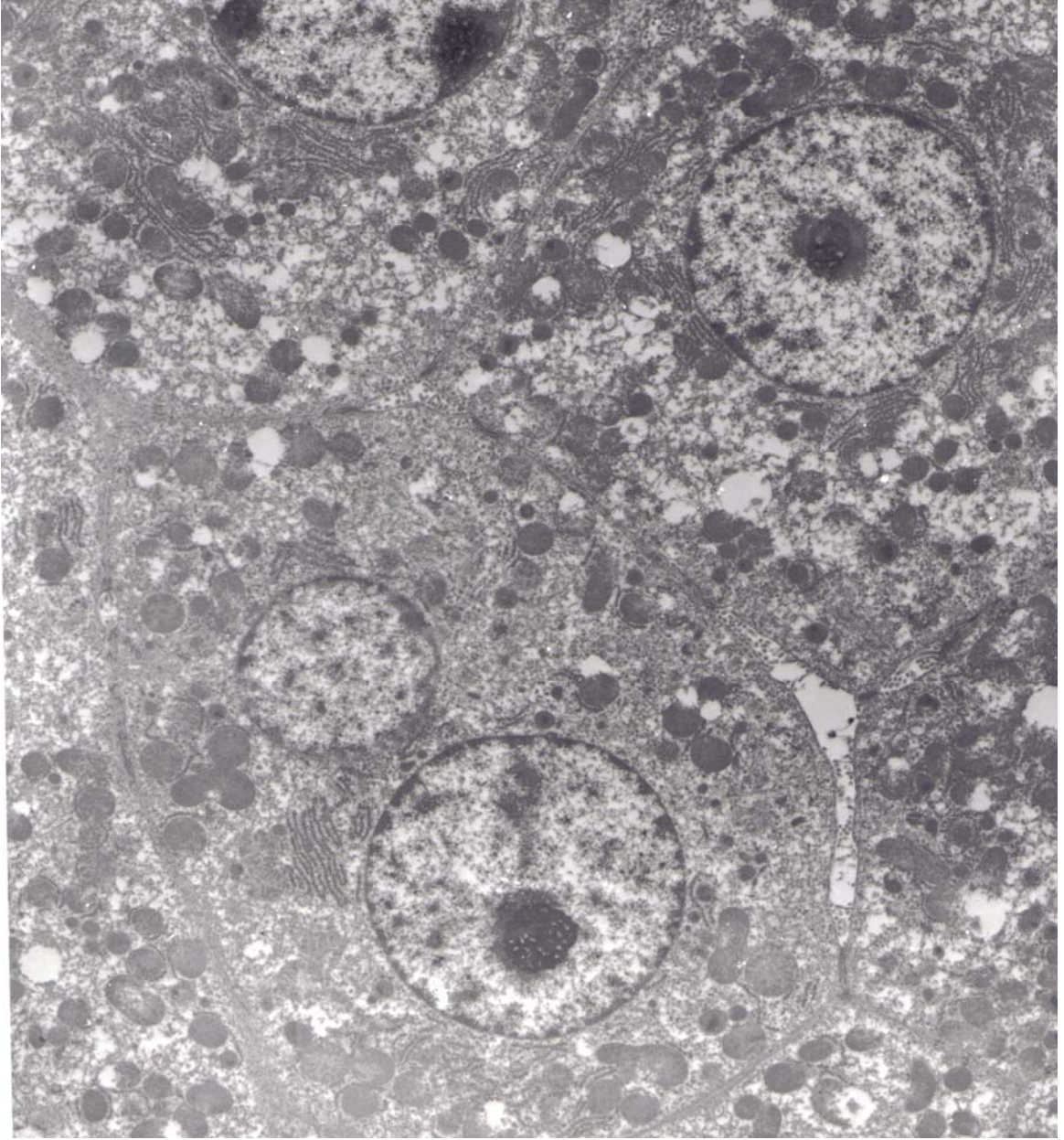
GSH için gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında grup2 (IR+PHR ile C1 INH+IR+PHR) ve grup 3 (IR ile C1 INH+IR) 'deki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur($p < 0.05$). Kontrol grubu ile sadece C1 INH verilen grup arasındaki fark anlamlı değildir.

4.4. ELEKTRON MİKROSKOPİSİ

Grup 1 (PHR ile C1 INH+PHR): Kısmi karaciğer rezeksiyonu yapılan ve ilaç uygulandıktan sonra rezeksiyon yapılan gruplar karşılaştırılmalı değerlendirildiğinde; her iki grupta da hepatositlerde çekirdek yapısı, kromatin dağılımı, mitokondriyonlar, granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve hücrelerin yan bağlantı birimleri normal olarak saptandı.

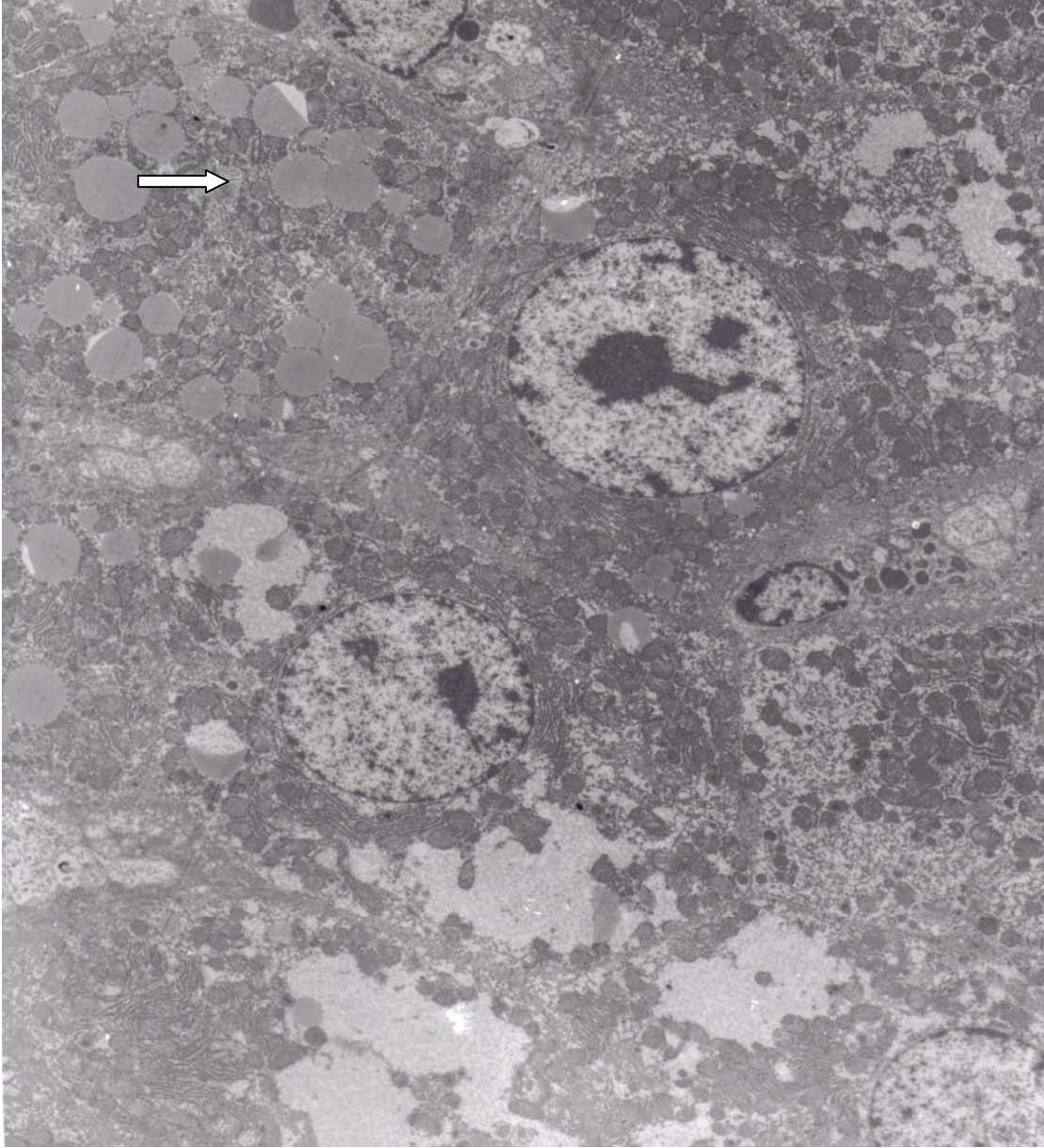


RESİM 10: Kısmi Karaciğer Rezeksiyonu (Normal Yapıda Hepatosit)

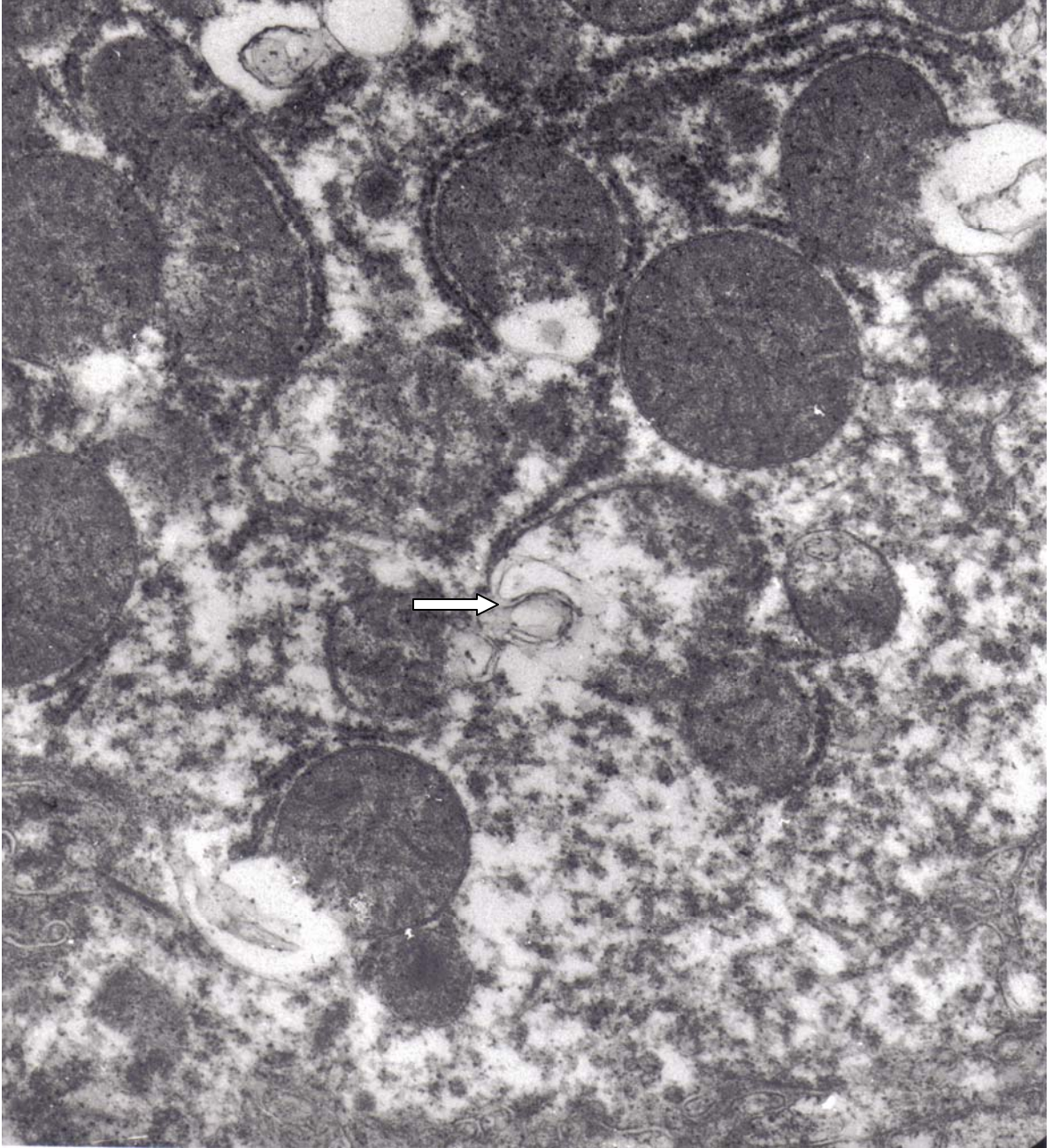


RESİM 11: C1 INH+Kısmi Karaciğer Rezeksiyonu

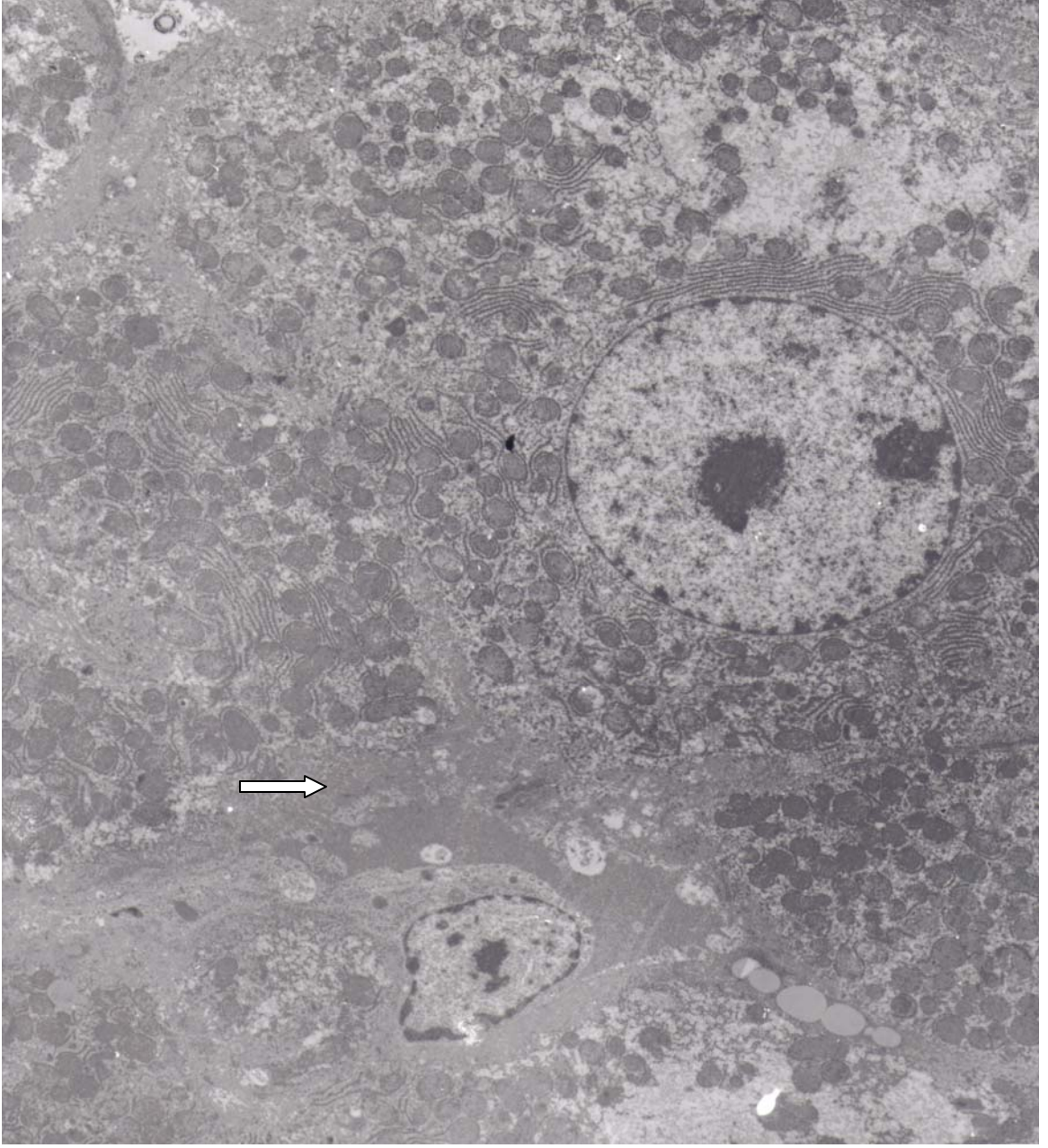
Grup 2 (IR+PHR ile C1 INH+IR+PHR): İskemiye takiben karaciğer rezeksiyonu yapılan grupta; bazı hepatositlerin sitoplazmasında lipid damlacıklarında artış, mitokondri zar yapısında bozulma ve hücreler arası bağ dokuda artış saptandı. İlaç uygulandıktan sonra IR ve PHR uygulanan grupta ise; hepatositlerin iskemi reperfüzyondan etkilenmediği hücre yapısının normale yakın yapıda olduğu görüldü.




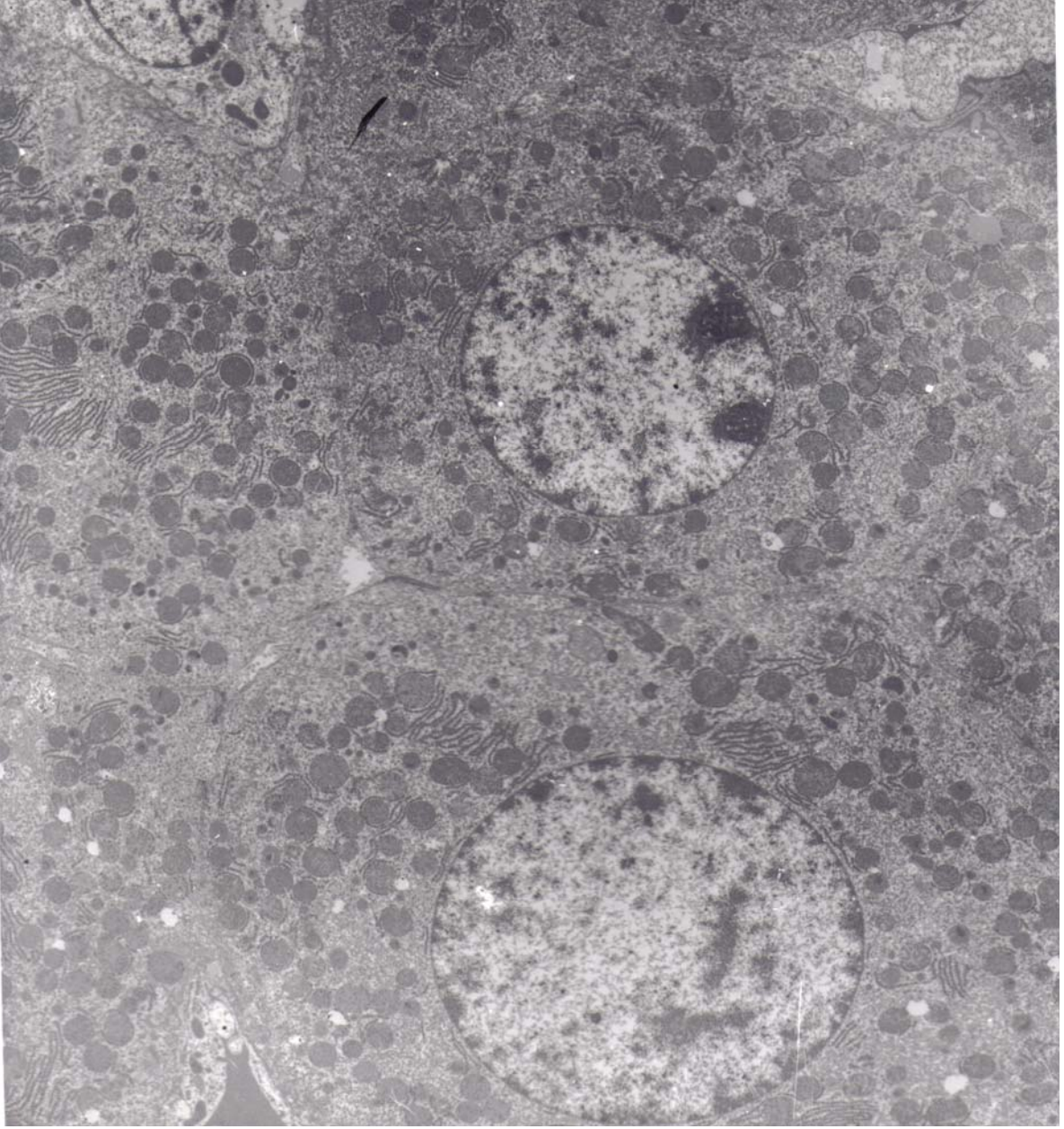
RESİM 12: IR+PHR (\Rightarrow) : Sitoplazmada yağ damlacıklarında artış)



RESİM 13: IR+PHR (\Rightarrow : Mitokondri zar bütünlüğü bozulmuş)

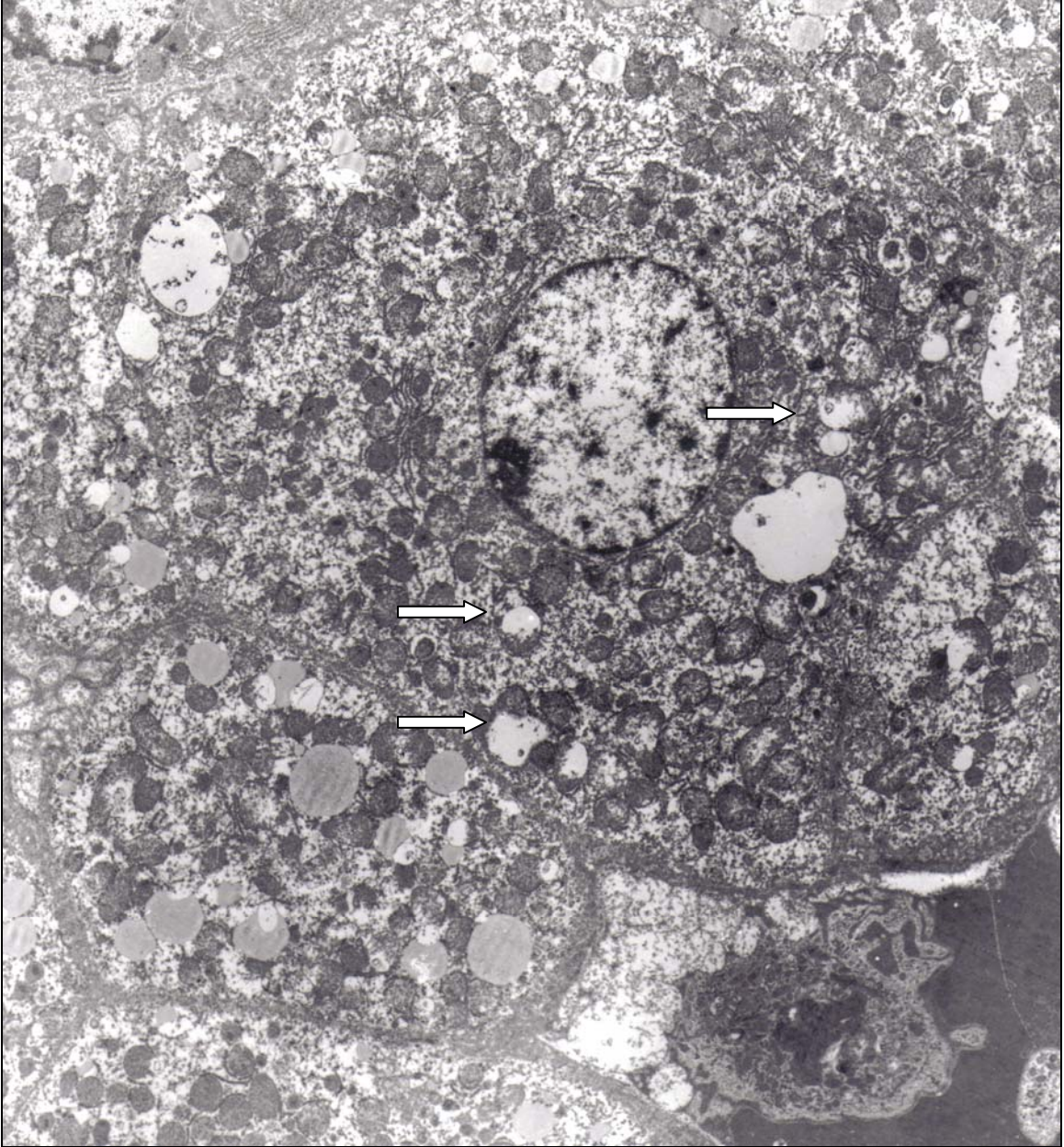


RESİM 14: IR+PHR ( : Bağ dokuda artış)

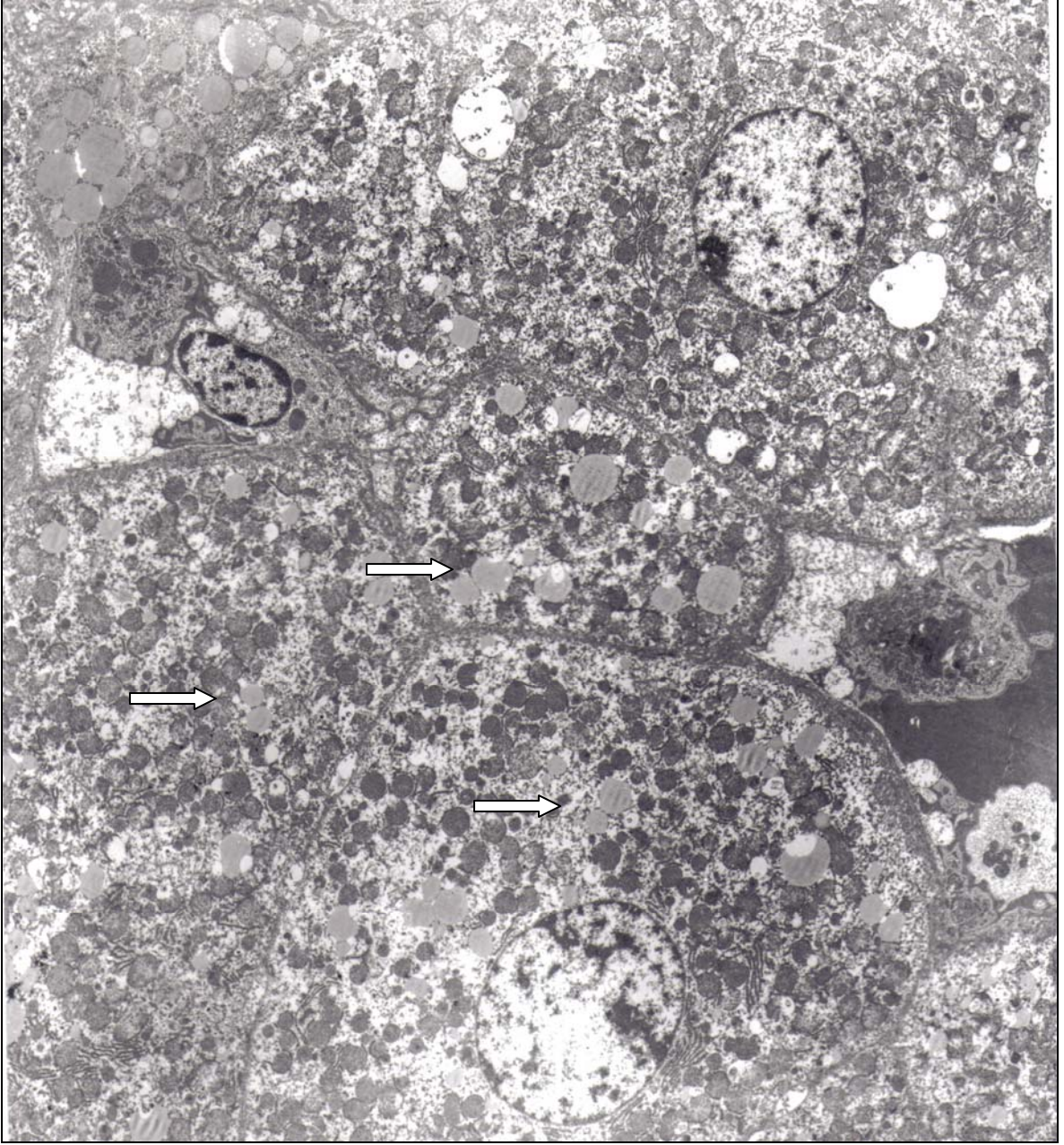


RESİM 15: C1-INH+IR+PHR (IR ‘dan etkilenmemiş normale yakın görünümde hepatosit)

Grup 3 (IR ile C1 INH+IR): Tüm hepatositlerde iskemi ve reperfüzyona bağı olarak sitoplazmada lipid damlacıklarında artış mitokondrial belirgin dejenerasyon ve vakuolizasyon, GER' da dilatasyon ve hücreler arası bağ dokuda artış saptandı. Buna karşılık ilaç uygulandıktan sonra IR meydana getirilen grupta ise bu değişiklikler saptanmayıp hepatositlerin ve hücreler arası bağ dokunun normal olduğu görüldü.



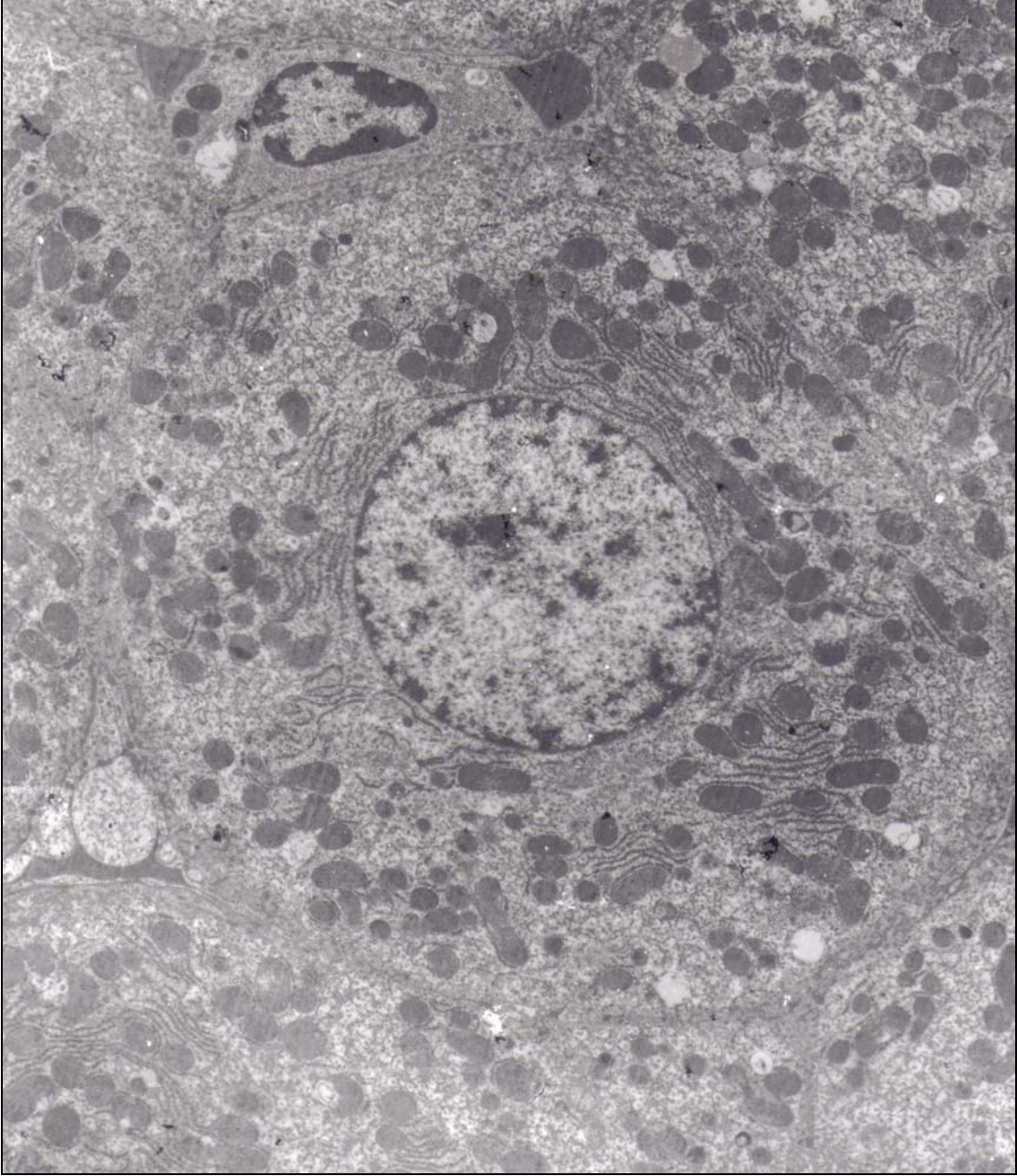
RESİM 16: IR ( : Mitokondrilerde vakuolizasyon)



RESİM 17: IR (\Rightarrow : Tüm hepatositlerde yağlanma)

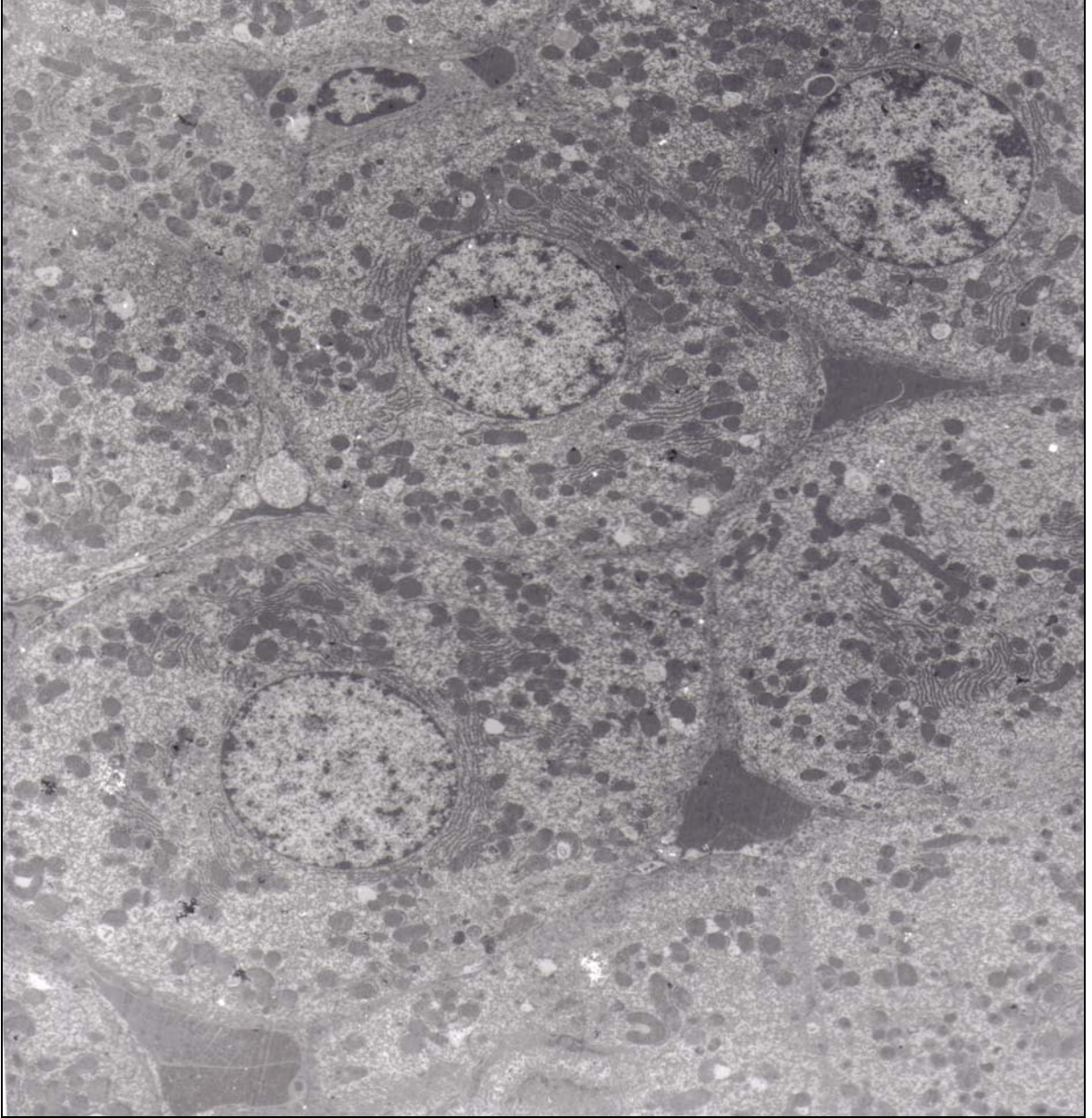


RESİM 18: IR \rightleftarrows :Apoptotik Görünümlü Çekirdeğe Sahip Hepatosit)

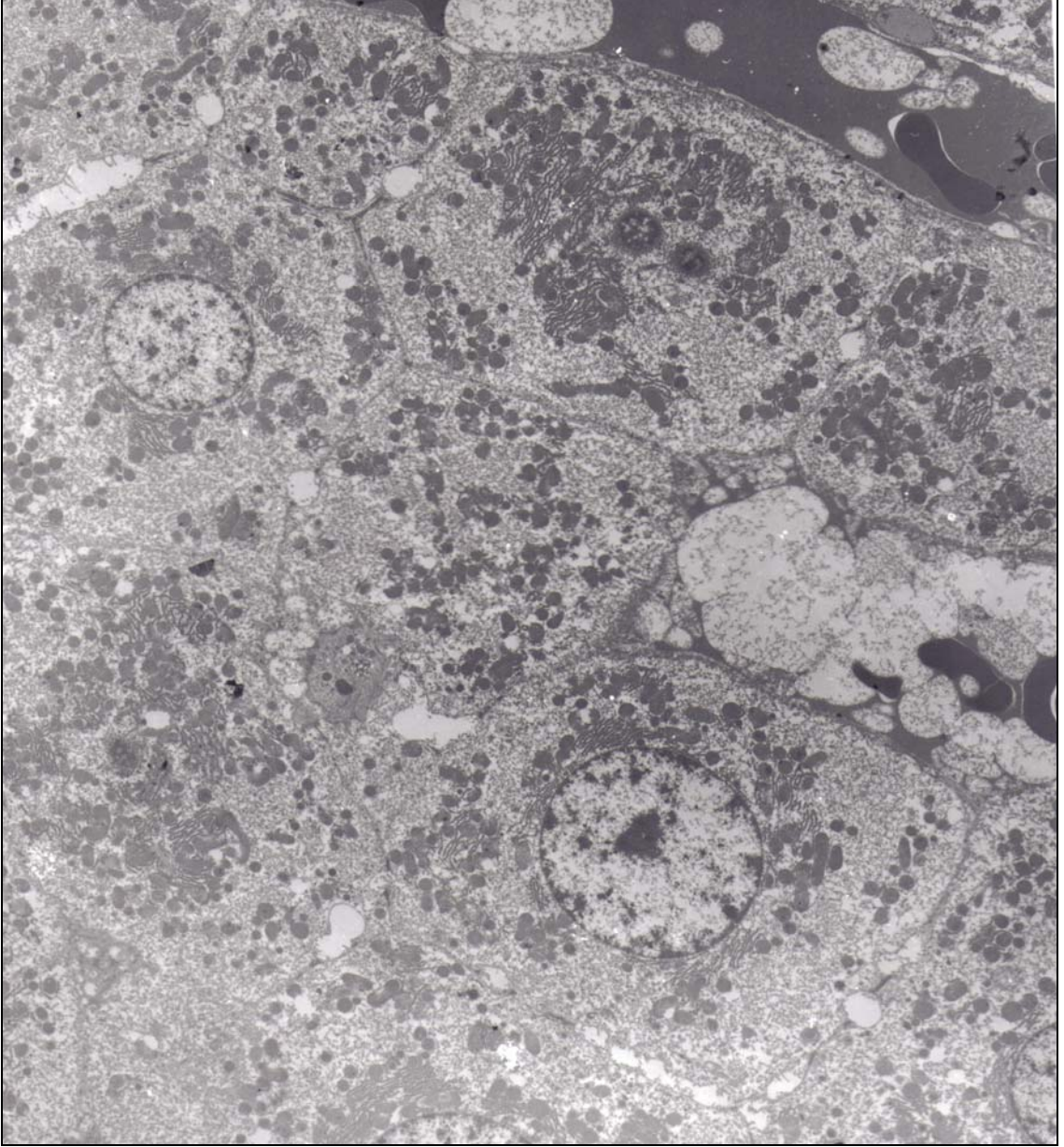


RESİM 19 : C1 INH+IR (IR'den etkilenmemiş normal yapıda hepatosit)

Grup 4 (KONTROL GRUBU ile C1 INH): Her iki grupta da hepatositin poligonal yapısının korunduğu, çekirdek yapısı, kromatin dağılımı, çekirdekçik, mitokondriyonlar, GER ve hücreler arası bağ dokunun normal olduğu izlendi.



RESİM 20 : Kontrol Grubu (normal yapıda hepatosit)



RESİM 21 : C1 INH (Normal yapıda hepatosit)

5. TARTIŞMA

IR hasarı dokunun geçici olarak kan akımından yoksun bırakılması ve takiben kan akımının geri dönmesi sonucu ciddi bir inflamatuvar cevabın başlaması ile karakterizedir. Karaciğerde iskemiye neden olan olayların başında; karaciğer rezeksiyonu, travmaya bağlı karaciğer hasarı, hemorajik şok gelmektedir. Kan akımının kesilmesini takiben ortaya çıkan organ disfonksiyonun nedeni reperfüzyon sonrası meydana gelen hücre hasarı ve organ hassasiyetinin artmasıdır(105-108). Hasara neden olan faktörler; SOR, lökosit migrasyonu ve aktivasyonu, sinüzoidal endotelial hücre hasarı, mikrosirkülasyondaki düzensizlikler, koagülasyon sisteminin aktivasyonu ve kompleman sisteminin aktivasyonu olarak özetlenebilir.

IR hasarında kompleman sisteminin hem klasik yolu hem de alternatif yolu aktive olur. Normal şartlar altında hücre membranında bulunan “Decay accelerating factor” ve membran kofaktör protein hücreyi kompleman saldırısına karşı korur. Reperfüzyon sırasında kompleman bağımlı proinflamatuvar peptidler (C3a-C5a) salınır. Bu peptidler de; nötrofil birikimine, düz kas hücrelerinde kasılmaya, vasküler permeabilitede artışa ve kupffer hücrelerinde aktivasyona yol açar. (105,13,110) Reperfüzyon sırasında da hücre içi elemanlardan mitokondri membranları ve intermediate filamanlar komplemanın etkisine maruz kalır(111). Ayrıca endotel hücrelerinde fibrin depositler birikir, trombosit agregasyonu ve nötrofil adezyonu meydana gelir(14,105,110).

Karaciğer kitlesinin %90' ını parankimal hücreler (hepatositler) oluşturur. Nonparankimal hücre olan kupffer hücreleri ise karaciğerdeki kalıcı makrofajlar olup tüm vücuttaki makrofajların %80 'ini oluşturur. Karaciğerde IR hasarının başlangıç fazında, kupffer hücrelerinde oksidatif stresin indüklediği hasar, reaktif oksijen radikallerinin üretimi ve salınımı hasara neden olur. Kupffer hücre aktivasyonu için bu fazda kompleman ürünlerine ihtiyaç vardır(15,38,112,113). Geç fazda ise aktive kompleman komponentlerinin plazma düzeyi artar kompleman aktivasyon ürünleri olan anaflatoksinler ve membran atak kompleks komponentleri massif nötrofil infiltrasyonu ile karakterize olup reperfüzyon sonrası 12-24 saatlik zamanı kapsar. Kupffer hücreleri ve nötrofiller reaktif oksijen radikalleri ve proinflamatuvar sitokinlerin artışına, sinüzoidal konjesyona, hepatositlerde sitoplazmik vakuolizasyona neden olur. Vazokonstriksiyon yaparak mikrosirkülasyonu bozar. Hasarlı hücrelerin opsonizasyonunu kolaylaştırarak fagositoza duyarlı hale getirir. Nekroz ve apoptozisin görüldüğü irreversible doku hasarına kadar birçok olaya neden olur (30,15,112-114).

Kompleman kaskadının inhibisyonu ile IR hasarının azaldığını ve fatal organ hasarının önlendiğini gösteren birçok çalışma yapılmıştır. Myokardda reperfüzyon sırasında kompleman aktivasyonunu gösteren bir çalışmada kompleman sistemin klasik yolu C1 inhibitörü ile inhibe edilmiş ve iskemik myokard reperfüzyon hasarından efektif olarak korunmuştur(30). Takip eden çalışmalarda barsak ve böbrekte yapılan IR hasarı modellerinde kompleman sistemin anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (30,31-37,115-119).

Karaciğerde yapılan IR modellerinde ise kompleman sistemin sCR1 ve C5aR inhibitörü ile tedavi edildiğinde iskemi sonrası karaciğerde uzun reperfüzyon (24 saat) boyunca kupffer hücrelerinde süperoksit birikimi azalmış, reperfüzyon sırasında çok az miktarda nötrofil birikimi saptanmış ve hasar anlamlı derecede az olarak tesbit edilmiştir (30,38,39,40). Ayrıca endotel hücrelerinde C3 birikimi anlamlı ölçüde azalmış karaciğerde nekroz miktarı daha az olarak tesbit edilmiştir.

C1 INH; serin proteaz inhibitör ailesinden olup komplemanın klasik yolunun major inhibitörüdür.(120,121) Yapılan birçok çalışmada C1 INH'ün reperfüzyon ilişkili mikrosirkülatuar düzensizlikleri en aza indirdiğini göstermektedir. Antiinflamatuvar özelliğinden dolayı C1 INH sepsis, myokard infarktüsü gibi çeşitli hastalıklarda hayvan deneylerinde kullanılmıştır(120-125). Yapılan birçok çalışmada C1 INH' ün reperfüzyon ilişkili mikrosirkülatuar düzensizlikleri en aza indirdiğini göstermektedir.(120,126) Değişik IR modellerinde C1 INH'ün 100-400 IU/kg dozları arasında dokularda koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir(120). Deneysel modeli oluştururken yaptığımız pilot çalışmada IR modelinde 400 IU/kg ve üzeri C1 INH dozlarında denek mortalitesinin arttığını saptadık. Bu nedenle C1 INH dozunu 200 IU/kg olarak belirledik.

Kompleman aktivasyonunun etkilerini önlemek için daha önce yapılan çalışmalarda C1 INH'ün iskemi öncesi uygulanmasının iskemi sonrası uygulanmasına göre hasarı azaltmakta daha etkili olduğu gösterilmiştir (124-127). Bu nedenle bizde C1 INH 'ü iskemi oluşturmadan 20 dakika önce 10 dakikada gidecek şekilde intravenöz infüzyon şeklinde uyguladık.

Reperfüzyon iskemik karaciğerde kompleman aktivasyonunu artırır. Kompleman kaskadının inhibisyonu iskemi sonrası reperfüze karaciğerde inflamatuvar olayı azaltmaktadır. Bu çalışmadaki amacımız karaciğerde IR hasarında kompleman sistemi C1 INH ile baskılayarak, kompleman inhibisyonunun rejenerasyon ve apoptozis üzerine etkisini değerlendirmek, sonuçta karaciğer hasarını en aza indirip fatal organ hasarından koruduğunu göstermekti.

Komplemanın klasik yolunun inhibisyonu ile karaciğer hasarının incelendiği deneysel bir çalışmada albumin ve C1 INH verilerek gruplar karşılaştırılmıştır. C1 INH uygulandığında tüm karaciğer mikrosirkülasyonuna dağıldığı ve sinüzoidal endotelyuma bağlanarak komplemanın etkilerini önlediği, reperfüzyonun 24. saatinde C1 INH verilen gruplarda hepatosit fonksiyonları (ALT düzeyi ile değerlendirilmiştir) ve safra sekresyonunun anlamlı daha iyi olduğu görülmüştür(120). Bir diğer deneysel çalışmada karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı oluşturmadan hemen önce ringer solüsyonu ve C1 esteraz inhibitör verilerek gruplar karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak karaciğerde perfüze olan asiner hücre sayısında artış, sinüzoidlere yapışan lökosit sayısında azalma ve karaciğer fonksiyon testlerinde (AST,ALT) belirgin azalma tesbit etmişlerdir(126). Bizim çalışmamızda da ilaç verilen tüm gruplarda AST düzeyinde anlamlı değişiklik saptanmaz iken ALT düzeyi anlamlı olarak düşük ölçülmüştür. Sonuçta kompleman inhibisyonu iskemi reperfüzyon sonrası karaciğer hasarını azalttığını ve hepatosit fonksiyonlarının değerlendirilmesinde ALT düzeyi daha anlamlı bilgiler verdiğini düşündürmektedir.

Karaciğerde C1 INH'ün anti-apoptotik etkisini araştıran bir çalışma daha önce yapılmamıştır. Yapılmış çalışmalar myokard hücresi, damar endotel hücresi ve iskelet kas hücreleri üzerinde deneysel çalışmalardır. İskemik kalp hastalıklarında özellikle rekanalizasyon tedavisi uygulanan hastalarda inflamatuvar yanıtın artarak myokard hücrelerinde hasar meydana geldiği gösterilmiştir. Kompleman sistemin hücre hasarı ve apoptozis üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalar da vasküler endotel hücre kültürlerinde C1 INH'ün endotel hücrelerini apoptozise karşı koruduğu gösterilmiştir(128-129). IR' a myokard hücre hasarında kompleman inhibisyonunun anti-apoptotik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; akut myokard infarktüsü geçiren ratlara kompleman inhibisyonu sonrası infarkt boyutu, infarkt alanındaki apoptotik hücre sayısı ve kardiyak fonksiyonlar değerlendirilmiştir. Sonuç olarak C1 INH'ün infarkt alanındaki myokard hücrelerinde apoptozisi önlediği ve bunu da sistemik inhibisyondan bağımsız olarak kompleman bileşiklerine bağlanmadan direkt olarak yaptığı gösterilmiştir. Çalışmada C1 INH'ün anti-apoptotik etkisini; sitokrom c translokasyonunu inhibe ederek, sitokrom c bağımlı caspase-9 aktivasyonunu baskılayarak, caspase-3 aktivasyonunu inhibe ederek ve Bcl-2/Bax protein salınım oranını normale getirerek yaptığı gösterilmiştir(126).

Bizim çalışmamızda apoptozisin değerlendirildiği TUNEL boyamalarında PHR ve C1 INH + PHR ile IR ve C1INH +IR grubunda anlamlı fark bulunmuştur. Özellikle iskemi reperfüzyon grubuna göre IR hasarı oluşturmadan önce C1 INH uygulanan grupta

apoptozis yüzdesindeki belirgin düşüklük ilacın apoptozis üzerine olumlu etkisinin olduğunu düşündürmektedir.

PCNA boyamalarında özellikle iskemi gruplarında (IR ve IR+PHR) anlamlı bir yükseklik saptanması oluşan iskemi reperfüzyon hasarı sonrası hücrelerdeki rejenerasyon yanıtı olarak değerlendirilebilir. Rejenerasyon inflamatuvar bir olaydır ve kompleman inhibisyonu ile antiinflamatuvar bir etki orta çıkar. Sonuç olarak PCNA'nın ilaç verilen gruplarda daha düşük görülmesi ise ilacın antiinflamatuvar etkisinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Elektron mikroskopik incelemelerde; iskemi-reperfüzyon hasarı meydana getirilmeyen gruplarda yani sadece kısmi karaciğer rezeksiyonu yapılan grupta ve kontrol grubunda C1 INH uygulandığında ve uygulanmadığında hepatositlerde ultrastrüktürel yapıda herhangi bir değişiklik saptanmadı. Tüm hepatositlerde poligonal yapının korunduğu, çekirdek yapısı, kromatin dağılımı, mitokondriyonlar, granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve hücrelerin yan bağlantı birimlerinin normal olduğu görüldü. Ancak iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan gruplarda (IR ve IR+PHR) tüm hepatositlerde iskemi ve reperfüzyona bağlı olarak sitoplazmada lipid damlacıklarında artış, mitokondrial belirgin dejenerasyon ve vakuolizasyon, GER' da dilatasyon ve hücreler arası bağ dokuda artış saptandı. Çekirdekte kromatinde kümeleşme görüldü. Sonuç olarak hepatositin apoptozise doğru ilerlediği tesbit edildi. Bu gruplarda C1 INH ile kompleman inhibisyonu sağlandığında hücrelerde bu değişikliklerin oluşmadığı, hepatositin çekirdek ve diğer organellerinin iskemi-reperfüzyon hasarından korunduğu görüldü.

Karaciğer dokusunda değerlendirilen MDA, iskemi-reperfüzyon sonrası dokularda oluşan serbest oksijen radikallerine bağlı lipid peroksidasyon varlığını ve dolayısı ile hücre hasarını göstermektedir(130-133). MDA sonuçlarımızın değerlendirilmesinde; IR ile C1 INH+IR'i karşılaştırdığımız grupta ve IR+PHR ile C1 INH+IR+PHR 'i karşılaştırdığımız grupta MDA istatistiksel olarak anlamlı düşük saptanmıştır. Bu da bize iskemi reperfüzyon sırasında serbest oksijen radikallerine bağlı oluşan hepatosit hasarının kompleman inhibisyonu ile engellendiğini veya azaltıldığını düşündürmektedir.

Glutathion iskemi ve reperfüzyon hasarı sırasında konjugasyona uğrayarak tüketilmesi, hücre içi GSH düzeyinin düşmesi nedenleri arasında yer almaktadır. Glutathion miktarındaki azalma, hepatositlerdeki biyosentez veya ekzojen GSH alımı ile karşılanır. Hücre içi GSH'nın düşmesi erken dönemde hücrede adaptif yanıt oluşturarak GSH biyosentezini arttırmaktadır(135-137).

Yüksek GSH derişimi hücre fonksiyon ve canlılığının bir göstergesi olarak kabul edilir.(138) Bunun aksine GSH derişiminin düşmesi hücre içi savunma sisteminin zayıflamasının ve mitokondrial hasarın belirteçlerinden olarak kabul edilir.(102)

Karaciğer dokusunda GSH ölçümlerinin iskemi grubunda (IR ve IR+PHR) düşük bulunması iskemi reperfüzyonun geç döneminde hücre içi reaktif oksijen metabolitlerinin artmasına bağlı mitokondrial hasarın belirteci olarak düşünülebilir. Ayrıca düşük GSH seviyesi mitokondrial ve sitoplazmik glutathionu tüketilmesi ve apoptotik hücre ölümünün erken sinyalini oluşturmaktadır. IR hasarı meydana getirilmeden kompleman inhibisyonu uyguladığımız gruplarda ise GSH düzeyinin yüksek bulunmasını; C1 INH'ün hem nötrofillerin neden olduğu lipid peroksidasyonunu azaltarak hemde oksidatif stresi azaltarak hücreyi özellikle de mitokondiyi IR hasarından koruduğu şeklinde yorumladık.

Sonuç olarak; C1 INH iskemi/reperfüzyon oluşturmada önce uygulandığında karaciğerde lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresi azaltarak hepatositlerde hasarı engellemekte, hücre rejenerasyonunu artırmakta ve en önemlisi apoptozisi belirgin azaltmaktadır.

6. SONUÇLAR

IR hasarı sonrası kompleman inhibitörünün apoptozis ve rejenerasyon üzerine olan rolünü ve tedavideki etkisini araştırmak amacıyla yaptığımız bu çalışmadan elde edilen sonuçlar şunlardır:

1. IR hasarı oluşturmada önce kompleman inhibitörü verildiğinde karaciğer hasarı anlamlı ölçüde azalmış, karaciğer fonksiyon testlerinden ALT anlamlı derecede düşmüştür.
2. IR sırasında serbest oksijen radikallerine bağılı oluşan hepatosit hasarı kompleman inhibisyonu ile azalmakta veya engellenmektedir.
3. C1 INH; hem nötrofillerin neden olduğu lipid peroksidasyonunu azaltarak hem de oksidatif stresi azaltarak hücreyi özellikle de mitokondriyi IR hasarından korumaktadır.
4. Özellikle IR hasarı oluşturulan gruplarda daha belirgin olmak üzere kompleman sistemin inhibisyonu apoptozisi belirgin baskılamaktadır.
5. Kompleman sistemin inhibisyonu IR hasarı sonrası hepatositlerde rejenerasyonu artırmaktadır. Ancak IR hasarı oluşturulmayan gruplarda kompleman inhibisyonu antiinflamatuvar etki göstererek rejenerasyon üzerine olumlu bir etki oluşturmamaktadır.

7. KAYNAKLAR

- 1- Majino G, Joiris I. Apoptosis, oncosis and necrosis: An overview of the death cell. *Am J Pathol.* 146:3-9, 1995
- 2- Zimmerman BJ, Granger N. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am.* 72:65-83, 1992
- 3- Parks P, Granger DN, Contributions of ischemia reperfusion to mucosal lesions formation. *Am J Physiol* 250:G749-753, 1986
- 4- Harton JW, Walker PB; Oxygen radicals, lipid peroxidation and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. *J Appl.* 74:1515-1520, 1993
- 5- Bilbao G, Contrenas JL. Reduction of ischemia reperfusion injury of the liver by vivo adenovirus mediated gene transfer of the antiapoptotic Bcl-2 gene. *Ann Surg* 230:185-193, 1999
- 6- Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischemia reperfusion injury. *Br J Surg,* 83:162-170, 1996
- 7- Collard CD, Gehran S. Pathophysiology, clinical manifestations and prevention of ischemia reperfusion injury. *Anest* 94:1122-1138, 2001
- 8- Carden DL, Granger DN, Pathophysiology of ischemia reperfusion injury. *J Pathol,* 190:255-66, 2000
- 9- Chamoun F, Burne M, Rabb H, Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front Bioscl.* 5:E103-109, 2000
- 10- Serracino Inglott F, Habib NA, Mathie RT, Hepatic ischemia reperfusion injury. *Am J Surg,* 181:160-166, 2001
- 11- Tedesco F, Fischetti F, Pausa M, Dobrina A, Sim RB, Daha MR: Complement-endotelial cell interactions; pathophysiological implications. *Mol Immunol* 36:261-268, 1999
- 12- Kirschfink M: Targeting complement in therapy. *Immunol Rev* 180:177-189, 2001
- 13- Baldwin W. M., Pruitt S.K., Brauer R.B., Daha M.R: Complement in organ transplantation. Contributions to inflammation, injury and rejection. *Transplantation* 59:797-808, 1995
- 14- Chavez-Cartaya R.E., DeSola G.P., Wright L., Jamieson N.V.: regulation of the complement cascade by soluble complement receptor type 1. Protective effect in experimental liver ischemia and eperfusion. *Transplantation* 59:1047-1052, 1995
- 15- Jaeschke H., Farhood A., SmithC.W.: neutrophils contribute to ischemia-reperfusion injury in rat liver in vivo *FASEB J.* 4:3355-3359, 1990

- 16- Mitsuoka H, Schmid-Schonbein GW: Mechanisms for blockade of in vivo activator production in the ischemic intestine and multi-organ failure. *Shock* 14:522-527, 2000.
- 17- Jeon BR, Yeom DH, Lee SM: Protective effect of allopurinol on hepatic energy metabolism in ischemic and reperfused rat liver. *Shock* 15:112-117, 2001.
- 18- Welborn MB 3rd, Douglas WG, Abouhamze Z, Auffenburg T, Abouhamze AS, Baumhofer J, Seeger JM, Pruitt JH, Edwards PD, Chizzonite R, Martin D, Moldawer LL, Harward TR: Visceral ischemia-reperfusion injury promotes tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) dependent organ injury in the mouse. *Shock* 6:171-176, 1996.
- 19- Huber TS, Gaines GC, Welborn MB 3rd, Rosenberg JJ, Seeger JM, Moldawer LL: Anticytokine therapies for acute inflammation and the systemic inflammatory response syndrome: IL-10 and ischemia/reperfusion injury as a new paradigm. *Shock* 13:425-434, 2000.
- 20- Carden DL, Granger DN: Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol* 190:255-266, 2000.
- 21- Rose S, Floyd RA, Eneff K, Buhren V, Massion W: Intestinal ischemia: reperfusion-mediated increase in hydroxyl free radical formation as reported by salicylate hydroxylation. *Shock* 1:452-456, 1994
- 22- Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, Harken AH, Meng X: Ischemia alone is sufficient to induce TNF-alpha mRNA and peptide in the myocardium. *Shock* 17:114-119, 2002
- 23- Myers SI, Hernandez R, Turnage RH, Bartula L, Taylor-Kalley B: Resuscitation of ischemia/reperfusion with hyperalimentation increases intestinal PGI2 synthase (PS) content and PGI2 release. *Shock* 3:422-429, 1995.
- 24- Riedemann NC, Ward PA: Complement in ischemia reperfusion injury. *Am J Pathol* 162:363-367, 2003.
- 25- Kunkel S.L., Fantone JC, Ward PA. Complement mediated inflammatory reactions. *Pathobiol Annu* 11:127-154,1981
- 26- Schifferli JA., Peters DK. The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *N Engl J Med*315:488-495, 1986
- 27- Bitter-Suermann D. Contribution of complement factors and reaction pathways to inflammation, *Agents Action Suppl* 11:159-178, 1982
- 28- Sim R:B;,Tsiftoglou SA. Proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans* 32:21-7,2004

- 29- Morgan BP. Complement regulatory molecules: Application to therapy and transplantation. *Immunol Today* 16:257-9, 1995
- 30- Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM. The role of complement system in ischemia reperfusion injury. *Shock* 21:401-409, 2004
- 31- Stahl GL, Xu Y, Hao L. Role of alternative complement pathway in ischemia reperfusion injury. *Am J Pathol* 162:449-455, 2003
- 32- Link C, Hawlisch H, Meyer zu Vilsdorf A, Gyleruz S, Nagel E, Kohl J. Selection of phage-displayed anti-guinea pig C5 or C5a antibodies and their application in xenotransplantation. *Mol Immunol* 36:1235-47, 1999
- 33- Buerke M, Murohara T, Lefer AM. Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 91:393-402, 1995
- 34- Atkinson C, Song H, Lu B. Targeting complement inhibition by C3d recognition ameliorates tissue injury without apparent increase in susceptibility to infection. *J Clin Invest* 115:2444-53, 2005
- 35- Proctor LM, Arumugam TV, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. Comparative anti-inflammatory activities of antagonist to C3a and C5a receptors in a rat model of intestine ischemia-reperfusion injury. *Br J Pharmacol* 142:756-64, 2004
- 36- Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. Protective effects of a new C5a receptor antagonist ischemia-reperfusion injury in a rat small intestine. *JSurg Res*, 103:260-7, 2002
- 37- Fleming SD, Mastellos D, Karpel-Massler G, Shea Donohue T. C5a causes limited, polymorphonuclear cell-independent, mesenteric ischemia-reperfusion induced injury, *Clin Immunol*, 108:263-73, 2003
- 38- Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Complement activates kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *A J Physiol*, 264:G801-9, 1993
- 39- Lehmann TG, Koeppl TA, Munch S. Impact of inhibition of complement by sCR1 on hepatic microcirculation after warm ischemia. *Microvasc Res*, 62:284-92, 2001
- 40- Arumugam TV, Woodruff TM, Stocks SZ. Protective effects of a human C5a receptor antagonist against hepatic ischemia-reperfusion in rats. *J Hepatol*, 40: 934-41, 2004
- 41- Lehmann TG, Heger M, Munch S, Kirschfink M, Klar E. In vivo microscopy reveals that complement inhibition by C1-esterase inhibitor reduces ischemia-reperfusion injury in the liver. *Transpl Int*, 13:S547-50, 2000

- 42- Straatsburg IH, Boermeester MA, Wolbink GJ. Complement activation induced by ischemia-reperfusion in humans: a study in patients undergoing partial hepatectomy. *J Hepatol*, 32:783-91, 2000
- 43- Storini C, Rossi E, Marrella V,. C1-inhibitor protects against brain ischemia-reperfusion injury via inhibition of cell recruitment and inflammation. *Neurobiol Dis*,19:10-7, 2005
- 44- Marco Cicardi, Lorenza Zingale, Andrea Zanichelli, Emanuela Pappalardo, Benedetta Cicardi: C1 inhibitor molecular and clinical aspects; *Springer semin Immun* 27: 286-298, 2005
- 45- Buerke M, Murohara T, Lefer AM. Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion [see comments]. *Circulation*, 91:393–402, 1995
- 46- Horstick G, Heimann A, Gotze O, Hafner G, Berg O, Boehmer P. Intracoronary application of C1 esterase inhibitor improves cardiac function and reduces myocardial necrosis in an experimental model of ischemia and reperfusion. *Circulation*, 95:701–708, 1997
- 47- Buerke M, Prufer D, Dahm M, Oelert H, Meyer J, Darius H. Blocking of classical complement pathway inhibits endothelial adhesion molecule expression and preserves ischemic myocardium from reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 286:429–438, 1998
- 48- Horstick G, Berg O, Heimann A, Gotze O, Loos M, Hafner G. Application of C1-esterase inhibitor during reperfusion of ischemic myocardium: dose-related beneficial versus detrimental effects. *Circulation*, 104:3125–3131, 2001
- 49- Lehmann TG, Heger M, Munch S, Kirschfink M, Klar E. In vivo microscopy reveals that complement inhibition by C1-esterase inhibitor reduces ischemia/reperfusion injury in the liver. *Transpl Int* 13:S547–S550, 2000
- 50- Scherer M, Demertzis S, Langer F, Moritz A, Schafers HJ. C1-esterase inhibitor reduces reperfusion injury after lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 73:233–238, 2002
- 51- Bergamaschini L, Gatti S, Caccamo L, Prato P, Latham L, Trezza P. C1 inhibitor potentiates the protective effect of organ preservation solution on endothelial cells during cold storage. *Transplant Proc* 33:939–941, 2001
- 52- Bergamaschini L, Gobbo G, Gatti S, Caccamo L, Prato P, Maggioni M. Endothelial targeting with C1-inhibitor reduces complement activation in vitro and during ex vivo reperfusion of pig liver. *Clin Exp Immunol* 126:412–420, 2001
- 53- McGreal E, Gasque P. Structure-function studies of the receptors for complement C1q. *Biochem Soc Trans*, 30:1010-4, 2002

- 54- Weisman HF, Bartow T, Leppo MK. Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science*, 249:146-51, 1990
- 55- Shandelya SM, Kuppusamy P, HerskowitzA, Weisfeldt ML. Soluble complement receptor type 1 inhibits the complement pathway and prevents contractile failure in the postischemic heart. Evidence that complement activation is required for neutrophil mediated reperfusion injury. *Circulation*, 88:2812-26, 1993
- 56- Zacharowski K, Otto M, Hafner G, Marsh Jr HC,Thiemermann C. Reduction of myocardial infarct size with sCR1sLex, an alternatively glycosylated form of human sCR1, possessing sialyl Lewis x. *Br J Pharmacol* 128:945-52, 1999
- 57- Hill J, Lindsay TF, Ortiz F, Yeh CG, Hechtman HB, Moore Jr FD. sCR1 ameliorates the local and remote organ injury after intestinal ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Immunol* 149:1723-8, 1992
- 58- Austen Jr WG, Kyriakides C, Favuzza J. intestinal ischemia/reperfusion injury is mediated by the membrane attack complex. *Surgery* 126:43-8, 1999
- 59- Pratt JR, Hibbs MJ, Laver AJ, Smith RA, Sacks SH. Allograft immune response with sCR1 intervention. *Transplant Immunol* 4:72-5, 1996
- 60- Pratt JR, Hibbs MJ, Laver AJ, Smith RA, Sacks SH. Effects of complement inhibition with sCR1 on vascular injury and inflammation during renal allograft rejection in the rat. *Am J Pathol* 149:2055-66, 1996
- 61- Stammberger U, Hamacher J, Hillinger S, Schmid RA. sCR1sLe ameliorates ischemia/reperfusion injury in experimental lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120:1078-84, 2000
- 62- Chalmers- Redman R, Franser A.D, Ju W. Mechanisms of nerve cell death: Apoptosis or necrosis after cerebral ischemia, Neuroprotective agents and cerebral ischemia. *Academia Press Lmt.* 2-25, 1997
- 63- Clarke, P.G. Developmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* 181: 195-213, 1990
- 64- Majno G. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol;* 146: 3-15,1995
- 65- Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *Am J Med.;* 108: 567-574, 2000
- 66- Ankarcona M, Dybukt M, Bonfoco E. Glutamate- induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptozis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 15. 961-973, 1995

- 67- Sastry P S, Subba KR. Apoptosis and the Nervous System. *J.Neurochem.* 74: 1-20, 2000
- 68- Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology.* 21: 1725-1741, 1995;
- 69- Hwang WYK, Koh LP, Ng HJ, Tan PHC, Chuah CTH, Fook SC, Chow H, Tan KW. A randomized trial of amifostine as a cytoprotectant for patients receiving myeloablative therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Hepatology.*; 5: 388-395, 1986
- 70- Nagano T, Yamamoto K, Matsumoto S, Okamoto R, Tagashira M, Ibuki N, Matsumura MK, Yabushita K, Okano N, Tsuji T. Cytokine profile in the liver of primary biliary cirrhosis. *J Clin Immunol.*;19: 422-427, 1999
- 71- Micha L, James A, William D, Susan J, Chunzhi D, Susan M, Heather S, Leslie M. Regional Pharmacokinetics Of Amifostine in Anesthetized Dogs: Role Of The Liver, Gastrointestinal Tract, Lungs, And Kidneys. *Anti- cancer Drugs.*; 13: 181-209. 2002
- 72- Preisler HD, Li B, Yang R. Suppression of telomerase activity and cytokine messenger RNA levels, in acute myelogenous leukemia cell in vivo in patients by amifostine and interleukin 4. *J Clin Invest.* 101:746-754, 2001
- 73- Zvi Symon, M.D., Micha Levi, M. Sc., William D. Ensminger, M. D., Selective Radioprotection Of Hepatocytes By Systemic And Portal Vein Infusions Of Amifostine In A Liver Tumor Model. *Virchows Arch.*; 431: 119-124, 1997
- 74- Strasser A. DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell.* 79: 189-192, 1994
- 75- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and the treatment of disease. *Science.* 267: 1456-62, 1995
- 76- Zvi Symon, M.D., Micha Levi, M. Sc., William D. Ensminger, M. D., Selective Radioprotection Of Hepatocytes By Systemic And Portal Vein Infusions Of Amifostine In A Liver Tumor Model. *Virchows Arch.* 431: 119-124, 1997
- 77- Davoli M, Fourtounis J, Tam S, Xanthoudakis S, Nicholson D, Robertson GS. Immunohistochemical assesment of caspase-3 activation and DNA Fragmentation Following Transient Focal Ischemia In Rat. *Neuroscience.* 115: 125-136, 2002
- 78- Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis caspases or mitochondria? *Trends cell biol.* 8: 267-271, 1998

- 79- Tsuyama H, Shimizu K, Yoshimoto K, Nezuka H, Ito H, Yamamoto S, Hasebe K. Protective Effect of Ischemic Preconditioning on Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Mice: Transplantation Proceedings. 32: 2310-2313, 2000
- 80- Natori S, Selzner M, Valantino KL, Fritz LC, Srinnivasan A, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. Transplantation. 68: 89-96, 1999
- 81- Surinder SY, David S, David KP, Piere AC. Ischemic Preconditioning Protects the Mouse Liver by Inhibition of Apoptosis Through a Caspase-Dependent Pathway. Hepatology. 30: 1223-1231, 1999
- 82- Gavrielli Y. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell. Biol. 119: 493-501, 1992
- 83- Gold R. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by combined use of insitu tailing and nick translation techniques. Lab. Invest. 71: 219-225, 1994
- 84- Loo DT, Rillema JR. Measurement Of Cell Death. Methods Cell Biol. 31: 1-9, 1998
- 85- Gavrielli Y. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell. Biol. 119: 493-501, 1992
- 86- Gold R. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by combined use of insitu tailing and nick translation techniques. Lab. Invest. 71: 219-225, 1994
- 87- Loo DT, Rillema JR. Measurement Of Cell Death. Methods Cell Biol. 31: 1-9, 1998
- 88- Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. Toxicol Appl Pharmacol. 204: 263-73, 2005
- 89- Ault J G, Lawrance D A. Glutathione disturbance in normal and oxidatively stressed cells. Exp Cell. 285: 9-14, 2003
- 90- Dickinson D A, Forman H J. Cellular glutathione and thiol metabolism. Biochem Pharmacol. 64: 1019-1026, 2002
- 91- Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia reperfusion injury and preconditioning. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 125: 917-36, 2003
- 92- Terada T, Nakanuma Y. Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile duct development. Am J Pathol. 146: 67-74, 1995
- 93- Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. Hepatology. 21: 1725-1741, 1995
- 94- Bayramiçli M. Deneysel Mikrocerrahi Temel Araştırma, Doku ve Organ Nakli Modelleri; 227-228, 2005

- 95- Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology*. 21: 1725-1741,1995
- 96- Ronen R L, Esther S. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms. *Neuroprotective opportunities*. 39: 55-73 , 2002
- 97- Bluege J A, Aust S D. Microsomal lipid peroksidation. *Methods Enzymol*. 52: 302-310, 1978
- 98- Ballatori N, Hammond C L, Krance S M. Molecular mechanism of reduced glutathione transport: Role of the MRP/ CFTR / ABCC and OATP / SCL21A families of membrane proteins, *Toxicol App Pharmacol.*, 204: 238-255, 2005
- 99- Shaw L. A-phase Study Comparing Bioavialability of intra-venous and Subcutaneous Administration of Amifostine. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 16: 250, 1997
- 100- Carecani P., Rosenbulum E.R., Van Thiel D. H., Reoxygenation Injury in Isolated Rat Hepatocytes: Relation to Oxygen Free Radicals and Lipid Peroxidation *Am J. Physiol:* 266-806, 1994
- 101- Ernster L.,*Biochemistry Of Reoxygenation Injury*. *Crit Care Med:* 16; 947-953, 1988
- 102- Foschi D., Castoldi L., Lesma A., Musazzi M., Effects of Ischemia and Reperfusion on Liver Regeneration in Rats. *Eur I Surg:* 159:393-398, 1993
- 103- Niki E. Antioxidant in Relation to Lipid Peroxidation. *Chem. Phy Lipids:*44, 227-253, 1987
- 104- Porter N.A. Chemistry of Lipid Peroxidation, *Methods in Enzymology:*105, 273-283, 1984
- 105- Thorsten G. Lehmann, Thomas A. Koepfel, Steffen Münch, Michael Heger, Michael Kirschfink, Ernst Klar and Stefan Post. Impact of Inhibition of Complement by sCR1 on Hepatic Microcirculation after Warm Ischemia, *Microvascular Research* 62:284-292, 2001
- 106- Huguet C, Gavelli A, Chieco PA. Liver ischemia for hepatic resection : where is the limit? *Surgery* 111:251-259, 1992
- 107- Pachter HL, Spencer FC, Hofstetter SR, Liang HG, Copa GF:. Significant trends in the treatment of hepatic trauma: Experiences with 411 injuries. *Ann Surg*. 215:492-500, 1999
- 108- 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*, 145:1421-1431, 1994

- 109- Jaeschke H., Farhood A, Bautista AP, Spolarich Z, Spitzer JJ; complement activates kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol* 264:G801-809, 1993
- 110- Platt JL, Dalmaso AP, Lindman BJ, Ihrcke NS, Bach FH, The role of C5a and antibody in the release of heparan sulfate from endothelial cells . *Eur J Immunol* 21:2887-2890, 1991
- 111- Marco C, Lorenza Z, Andrea Z, Emanuela P, Benedetta C. C1 inhibitor: molecular and clinical aspects, *Springer Semin Immun* 27:286-298, 2005
- 112- Jaeschke H., Farhood A, Bautista AP, Spolarich Z, Spitzer JJ; Superoxide generation by kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia, *Free Radic Res Commun* 15:277-284, 1999
- 113- Jaeschke H. Chemokines, neutrophils and inflammatory liver injury. *Shock* 6:403-404, 1996
- 114- FAN c, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia reperfusion injury in the liver, *J Mol Med*, 77:577-592, 1999
- 115- Hart MI, Coenzo KA, Shaffer LA, Gastrointestinal ischemia-reperfusion injury is lectin complement pathway dependent without involving C1q. *J Immunol*, 174:6373-80, 2005
- 116- Zhang M, Austen Jr WG, Chiu L. Identification of a specific self-reactive IgM antibody that initiates intestinal ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci*, 101:3886-91, 2004
- 117- Stein JH, Osgood RW, Barnes JL, Reineck HJ, Pinckard RN. The role of complement in the pathogenesis of post-ischemic acute renal failure. *Miner Electrolyte Metab* 11:256-61, 1985
- 118- De Vries B, Matthijsen RA, Wolfs TG, Van Bijnen AA, Heringa P, Inhibition of complement factor C5 protects against renal ischemia-reperfusion injury: inhibition of late apoptosis and inflammation. *Transplantation* 75:375-82, 2003
- 119- Arumugam TV, Shiels IA, Strachan AJ, Abbenante G, Fairlie DP, Taylor SM. A small molecule C5a receptor antagonist protects renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Kidney Int*, 63:134-42, 2003
- 120- B.H.M. Heijnen, I.H. Straatsburg, N.D. Padilla, G.J. Van Mierlo, C.E. Hack and T.M. Van Gulik. Inhibition of classical complement activation attenuates liver ischaemia and reperfusion injury in a rat model. *Clinical and experimental immunology*, 143:15-23, 2005

- 121- Caliezi C, Wullemin WA, Zeerleder S, Redondo M, Eisele B, Hack CE. C1-Esterase inhibitor: an anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema. *Pharmacol Rev* 52: 91–112, 2000
- 122- Jansen PM, Eisele B, de Jong IW et al. Effect of C1 inhibitor on inflammatory and physiologic response patterns in primates suffering from lethal septic shock. *J Immunol* 160: 475–84, 1998
- 123- Buerke M, Murohara T, Lefler AM. Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion [see comments]. *Circulation* 91: 393–402, 1995
- 124- Buerke M, Pruffer D, Dahm M, Oelert H, Meyer J. Darius. Blocking of classical complement pathway inhibits endothelial adhesion molecule expression and preserves ischemic myocardium from reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 429–38, 1998
- 125- Horstick G, Heimann A, Gotze O et al. Intracoronary application of C1 esterase inhibitor improves cardiac function and reduces myocardial necrosis in an experimental model of ischemia and reperfusion. *Circulation* 95: 701–8, 1997
- 126- Lehmann TG, Heger M, Munch S, Kirschfink M, Klar E. In vivo microscopy reveals that complement inhibition by C1-esterase inhibitor reduces ischemia/reperfusion injury in the liver. *Transpl Int* 13: S547–S550, 2000
- 127- Doherty JC, McMillen MA. Ischemic liver injury. *J Am College Surgeons* 186: 606–7, 1998
- 128- Jinrong Fu, Guosheng Lin, Zhiwei Wu, Bin Ceng, et al. Anti-apoptotic role for C1 inhibitor in ischemia reperfusion induced myocardial cell injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 349:504-512, 2006
- 129- D. Liu, D. Zhang, J. Scafidi, X. Wu, C.C. Cramer, A.E. Davis. C1 inhibitor prevents Gram-negative bacterial lipopolysaccharide-induced vascular permeability, *Blood* 105:2350-2355, 2005
- 130- Backmann K.B. and Ames B.N. The free radical theory of aging matures, *Physiol Rev.* 78: 547-581, 2002
- 131- Kuhn H, Borchert A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: The interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic Biol Med.* 33: 154-172, 2002
- 132- Aliakbarpour H.R, Kalavi K. Relationship between malondialdehyde level and glutathione peroxidase activity in diabetic rats. *Clin Chim Acta.* 340: 79-83, 2004

- 133- Cirak B, Inci S, Paloglu S. Lipid peroksidation in cerebral tumours. *Clin Chim Acta.* 327: 103-107, 2003
- 134- Halliwell B, Gutteridge M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford Science Publications, Third Edition. 246-350, 2002
- 134- Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *Am J Med.* 108: 567-74, 2000
- 135- Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 125: 917-36, 2003
- 136- Terada T, Nakanuma Y. Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile duct development. *Am J Pathol.* 146: 67-74, 1995
- 137- Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology.* 21: 1725-1741, 1995
- 138- Ronen R L, Esther S. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms. *Neuroprotective opportunities.* 39: 55-73 , 2002
- 139- Ballatori N, Hammond C L, Krance S M. Molecular mechanism of reduced glutathione transport: Role of the MRP/ CFTR / ABCC and OATP / SCL21A families of membrane proteins, *Toxicol App Pharmacol.*, 204: 238-255, 2005