

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

RATLARDA KARACİĞER İSKEMİ –REPERFÜZYON
HASARINDA, ROTENONUN HÜCRE APOPİTOZİSİ VE
İNFLAMATUAR PROÇESE ETKİSİ

Dr. Burcu MÜHÜRĐAROĐLU

Genel Cerrahi Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2009

T.C
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

RATLARDA KARACİĞER İSKEMİ –REPERFÜZYON
HASARINDA ROTENONUN HÜCRE APOPİTOZİSİ VE
İNFLAMATUAR PROÇESE ETKİSİ

Dr. Burcu MÜHÜRĐAROĐLU

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI

Prof. Dr. Haluk KİPER

ESKİŞEHİR

2009

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr.Burcu Mühürdaroğlu'na ait "Ratlarda Karaciğer İskemi/Reperfüzyon Hasarında Rotenonun Hücre Apoptozisi ve İnflamatuvar Proçese Etkisi" adlı çalışma jürimiz tarafından Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:28.12.2009

Jüri Bařkanı

Prof. Dr. Haluk KİPER
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Bekir YAŞAR
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Enver İHTİYAR
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun tarih ve Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zübeyir KILIÇ
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda almış olduğum uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana destek veren ve tezimin hazırlanmasında her türlü yardımı benden esirgemeyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Haluk KİPER'e teşekkür eder, sonsuz saygılarımı sunarım. Bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren ve eğitimimde büyük emekleri olan sayın hocalarım Prof. Dr. Bekir YAŞAR, Prof. Dr.ERCÜMENT PAŞAOĞLU, Prof. Dr. Tarık ÇAĞA, Prof. Dr. Enver İHTİYAR, Prof. Dr. Adnan ŞAHİN, Prof. Dr. Serdar ERKASAP ve Prof. Dr. Ersin ATEŞ'e teşekkür ederim. Ayrıca tezimin hazırlanmasında katkıları bulunan Biyokimya A.D. öğretim üyesi Doç. Dr. Sema USLU'ya, Yunusemre Devlet Hastanesi Patoloji bölümünden Uz.Dr.Betül Peker CENGİZ'e ve tezin istatistiksel değerlendirmesini yapan Biyoistatistik A.D. öğretim üyesi Doç.Dr.Setenay ÖNER'e teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Mühürdaroğlu, B. Ratlarda Karaciğer İskemi-Reperfüzyon (I/R) Hasarında Rotenonun Hücre Apoptozisi ve İnflamatuvar Proçese Etkisi . Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2009. I/R hasarı oluşturulan sıçan karaciğerinde, rotenonun koruyucu etkisini immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirmeyi amaçladık. Bu deneysel çalışmada 30 adet *Sprague-Dawley* cinsi albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar Kontrol Grubu, I/R Grubu ve I/R+*Rotenon* Grubu olacak şekilde 3 eşit gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki sıçanlara 8 saat açlık sonrası laparotomi uygulanarak hepatic arterler, portal ven ve safra yolu eksplore edilip, 90 dakika sonra kan örneği ve karaciğerden doku örneği alındı. I/R grubundaki sıçanlara; 45 dakika iskemi gerçekleştirildi ve reperfüzyon'dan 45 dakika sonra kan ve karaciğer örneği alındı. I/R+*Rotenon* grubundaki sıçanlara iskemiden 2 saat önce *rotenon* intraperitoneal olarak verildi. 45 dakika reperfüzyon sonrasında kan ve karaciğerden doku örneği alındı. Daha sonra tüm sıçanlar sakrifiye edildi. Serumda aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH) ve malonildialdehit (MDA) seviyeleri, dokuda ise MDA ve TNF- α düzeyleri ile biyokimyasal, ışık mikroskopunda Hematoksilen&Eozin boyama ile histopatolojik, TUNEL boyama yöntemiyle de apoptozis üzerine değerlendirmeler yapıldı. Serum ALT, AST, LDH ve MDA düzeyleri, doku MDA ve TNF- α düzeylerinin hepsi I/R grubunda yükselirken *rotenon* ile tedavi edilen grupta (I/R+*Rotenon*) anlamlı olarak gerilemiştir ($p < 0.05$). Konjesyon ve polimorf nüveli lökositler gibi histopatolojik bulgular da I/R+*Rotenon* grubunda gerilemiştir. TUNEL boyamasında sayılan apoptotik hücrelerin sayısı da I/R grubunda artarken, I/R+ *Rotenon* grubunda anlamlı olarak gerilemiştir ($p < 0.05$). Yaptığımız çalışma göstermiştir ki; *rotenon* , antioksidan ve antiapoptotik etkilerinden dolayı karaciğer I/R hasarını önlemek amacıyla kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Rotenon, rat, karaciğer, I/R, apoptozis.

ABSTRACT

Mühürdaroğlu, B. Effects of Rotenon on Cell Apoptosis and Inflammatory Process in Liver Following Ischemia-Reperfusion(I/R) Injury in Rat Models. Eskisehir Osmangazi University Medical Faculty, Department of General Surgery. Purposes; to evaluate the protective effects of rotenon on liver following I/R injury, by immunohistochemical methods . Thirty *Sprague-Dawley* rats were used in this experimental study. Animals were divided into 3 groups including the Control Group, the I/R Group, and the I/R+ *Rotenon* Group. In the Control group, the arteries , portal veins and main biliary ducts were explored and after 90 minutes, blood and liver tissue samples were collected. In the I/R group, after the arteries , portal veins and main biliary ducts were clamped for 45 minutes, blood and liver tissues samples were collected. In the I/R+*Rotenon* group, rotenon was administered intraperitoneally before 2 hours of ischemia and blood and liver tissues samples were collected 45 minutes later. All rats were sacrificed at the end of the experiment. The aspartat aminotransferase (AST), alanin aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH) and malonedialdehyde (MDA) levels of blood samples and the TNF- α and malonedialdehyde (MDA) levels of tissue samples biochemically and tissue samples histopathologically under light microscopy with hematoxylin and eosin stain, apoptosis TUNEL assay were studied. The blood ALT, AST, LDH and MDA levels and the tissue MDA and TNF- α levels were increased in the I/R group but in the rotenon treatment group (I/R+*Rotenon*) were decreased significantly ($p < 0.05$). Histopathological findings such as congestion and polymorphonuclear leukocytes were observed less in the I/R+*Rotenon* group compared to the I/R group. In the TUNEL assay, the number of the apoptotic cells were increased in the I/R group however decreased in the I/R+*Rotenon* group significantly($p < 0.05$). In our study, we showed that *rotenon* with antioxidant and antiapoptotic properties may be used in surgery clinics for liver I/R injury.

Key Words:Rotenone, rat, liver, I/R, apoptosis.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. İskemi Reperfüzyon Hasarı	4
2.2. Mitokondri ve ETS	7
2.3.Apopitozis	8
2.4.Rotenon	15
3.GEREÇ VE YÖNTEM	16
4.BULGULAR	19
4.1. Biyokimyasal Bulgular	19
4.2. Histopatolojik Bulgular	28
5.TARTIŞMA	39
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

AI	Apoptotik indeks
ALT	Alanin Aminotransferaz
AST	Aspartat Aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
Ca	Kalsiyum
DNA	Deoksi Ribonükleik Asit
ETS	Elektron Transport Sistemi
H&E	Hematoksilen-Eozin
I/R	İskemi-reperfüzyon
LDH	Laktat Dehidrogenaz
MDA	Malonil Dialdehit
mm/Hg	Milimetre/civa
MNL	Mononükleer lökosit
Ng	Nanogram
NO	Nitrik Oksit
PAF	Platelet Aktive Edici Faktör
PGI	Prostasiklin
PNL	Polimorfonükleer lökosit
SOR	Serbest oksijen Radikalleri
TİCAM	Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
TxA	Tromboxan A
μ g	Mikrogram

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. İskemide erken fazdaki değişiklikler	5
2.2. Kompleks 1 (NADH dehidrojenaz kompleksi)	8
4.1. Rotenonun serum ALT düzeyi üzerine etkisi	21
4.2. Rotenonun serum AST düzeyi üzerine etkisi	22
4.3. Rotenonun serum LDH düzeyi üzerine etkisi	23
4.4. Rotenonun serum MDA düzeyi üzerine etkisi	24
4.5. Rotenonun doku MDA düzeyi üzerine etkisi	26
4.6. Rotenonun doku TNF- α düzeyi üzerine etkisi	28
4.7. Kontrol grubunda karaciğer dokusunun H-E ile boyanması	29
4.8. I/R grubuna ait balonlaşma dejenerasyonu	30
4.9. I/R grubuna ait balonlaşma dejenerasyonu	30
4.10. I/R+ <i>Rotenon</i> grubunda balonlaşma dejenerasyonu, konjesyon ve MNL infiltrasyonu.	31
4.11. I/R+ <i>Rotenon</i> grubunda balonlaşma dejenerasyonu	31
4.12. Kontrol grubunda apoptotik bir hücrenin görünümü	33
4.13. I/R grubunda apoptotik hücreler I	34
4.14. I/R grubunda apoptotik hücreler II	34
4.15. I/R+ <i>Rotenon</i> grubunda apoptotik hücreler I	35
4.16. I/R+ <i>Rotenon</i> grubunda apoptotik hücreler II	36

TABLÖLAR

	Sayfa
2.1. Apoptozis ve nekrozun başlıca özellikleri	9
2.2. Hastalıklarda apoptozisin rolü	10
2.3. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler	14
4.1. Gruplara göre serum AST, ALT,LDH VE MDA değerleri	19
4.2. Gruplara göre serum ALT, AST, LDH ve MDA ortalama değerleri	21
4.3. Gruplara göre doku MDA değerleri	25
4.4. Gruplara göre doku MDA ortalama değerleri	25
4.5. Gruplara göre doku TNF- α değerleri	26
4.6. Gruplara göre doku TNF- α ortalama değerleri	27
4.7. Gruplarda H&E İncelemelerinin Karşılaştırılması –I	32
4.8. Gruplarda H&E İncelemelerinin Karşılaştırılması –II	33
4.9. Grupların Apoptotik Hücre Sayısı ve Apoptotik İndeks	37

1.GİRİŞ

İskemi, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının dolaşım tarafından sağlanamaması ve oluşan artık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması olarak tanımlanır. 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.(1).İskemi-reperfüzyon hasarı dokularda yeterli oksijen (O₂) sağlanamamasının tetiklediği bir hücreyel olaylar dizisidir, sonuçta tüm organlar ve sistemler etkilenir. Son yıllarda üzerinde en çok araştırma yapılan konulardan biridir.

Klinik olarak iskemi-reperfüzyon hasarı organ transplantasyonu, travma, vasküler ve intestinal cerrahide önem kazanmaktadır (2).İskemi sonrası reperfüzyon, hasarlı dokuların iyileşmesi için bir ön koşul olmasına rağmen hasarı daha da arttırabilmektedir (3). İskemik dokunun reperfüzyonu ve yeniden oksijenlenmesi hücre zarlarının lipid peroksidasyonuna neden olur ve hücre fonksiyonlarının değişimine sebep olan serbest oksijen radikallerini (SOR) üretir (4,5). Reperfüzyon ile iskemik dokuda oluşan SOR'nin bu hasardan sorumlu olduğu ortaya konulmuştur. (6).

İskemik dokunun reperfüzyonu sonrası gördüğü hasar akciğer, böbrek, karaciğer, kalp,beyin ve barsaklar gibi pek çok organda ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Ancak yine de İ/R (iskemi-reperfüzyon) hasarının fizyopatolojisi tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. İ/R hasarında serbest radikallerin oluşumu, polimorf nüveli lökositlerin aktivasyonu, endotel ve kompleman sistemi gibi major komponentlerin rol oynadığı bilinmektedir.(6,7). Bu tablo lokal ve sistemik inflamatuvar cevabın başlamasına yol açarak lokal ve uzak organlarda da hasar oluşturmaktadır.

Günlük uygulama içerisinde İ/R tıbbın pek çok alanında karşılaşılan bir olaydır. Şok,yanık, sepsis, pankreatit, serebrovasküler olaylar, miyokard infarktüsü, travma ve travma cerrahisi, ortopedik cerrahi, kardiyovasküler cerrahi, transplantasyon cerrahisi İ/R olayının görüldüğü durumlardan sadece bazılarıdır. Pratikte bütün cerrahi işlemler sırasında dokuların iskemisi ve bunu takiben bir reperfüzyon

periyodu vardır.(2,3). Karaciğer İ/R hasarı ise, karaciğer transplantasyonu ve hepatik rezeksiyon sırasında uygulanan pringle manevrası veya hemorajik şok sonrasında görülen primer hepatik disfonksiyon veya yetmezlikten sorumludur.

Ağır metabolik yüküne karşın, karaciğer hücre proliferasyonu açısından oldukça istikrarlı bir organdır. Sağlıklı karaciğer dokusundaki bu zayıf hücre döngüsü, toksik karaciğer hasarı sonrası hızla değişmektedir. Karaciğer anatomik lokalizasyonu, fizyolojik ve biyokimyasal rolü nedeni ile birçok toksik madde ve ilaçtan sıkça etkilenen bir organdır. Bu etkileşim sonrası gelişen hepatotoksisitenin sonuçları da karşımıza akut, kronik ve fulminan hepatit şeklinde çıkabileceği gibi çok çeşitli klinik durumlarla da, örneğin siroz veya tümör şeklinde de çıkabilmektedir.

Fizyolojik ya da birçok stres ve hasar tarafından başlatılan programlı hücre ölümü süreci olan apoptozisin, birçok sistemde uygun fonksiyon ve homeostazın devamı için önemli olduğu bilinmektedir (8). Apoptozis ile organizmada hasar görmüş veya tehlike potansiyeli olan hücreler, çevreye zarar vermeksizin ortadan kaldırılır. Bu işlem hem çok hücreli organizmaların normal gelişim süreci olan embriyogenezis sırasında, hem de erişkinlerde neredeyse bütün dokularda hücresel çoğalma ve yenilenme arasındaki homeostatik dengenin ve doku içeriğinin kararlılığının korunması için gereklidir (9). Çeşitli uyarılar apoptozis mekanizmasını uyarır. Bunlara örnek olarak, tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), hücre içi kalsiyum düzeyinin artışı, glikokortikoidler, reaktif oksijen ürünleri, ultraviyole ışık, radyasyon, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar sayılabilir (10).

İskemi-reperfüzyon hasarında serbest oksijen radikallerinin sorumlu olduğu bilinmektedir. Kompleks I enzimi mitokondride elektron transport zincirinde rol oynayan ilk enzimdir ve mitokondride reaktif oksijen ürünlerinin oluşmasında önemli bir kaynaktır. Mitokondrial elektron transport inhibitörü olan *rotenon*, antioksidatif savunma mekanizmasında rol alır(11). Elektron transport zincirine kompleks I üzerinden giren NADH'deki elektronlar, ubikinona (UQ, koenzim Q) aktarılırlar. Ubikinonun tamamen indirgenmiş formu olan UQH₂, membranda kompleks I'den kompleks III'e diffüze olur; kompleks III'te de UQH₂, okside form olan UQ formuna oksitlenir. Elektronların kompleks I yoluyla kompleks III'e akışı, protonların mitokondriyal matriksten membranlar arası boşluğa hareketiyle

eşleşmiştir ki böylece bir proton gradienti oluşur; bu proton gradienti de mitokondriyal ATP sentezi için önemlidir.

Kompleks I bir insektisit olan rotenone tarafından inhibe edilir. Sellüler respirasyonun genel bir inhibitörü olarak rol oynayarak, toksik aksiyonunu göstermektedir.

Çalışmamızda sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan karaciğer İ/R hasarında bir antioksidan ajan olan *rotenonun* , İ/R hasarını önleyip önleyemediğini ve apoptozise etkisini gösterebilmek için biyokimyasal olarak serumda alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), laktat dehidrogenaz (LDH) ve dokuda TNF- α ve MDA düzey ölçümlerini, histopatolojik olarak da Hematoksilen-Eozin (H&E) ve TUNEL boyama yöntemlerini kullandık.

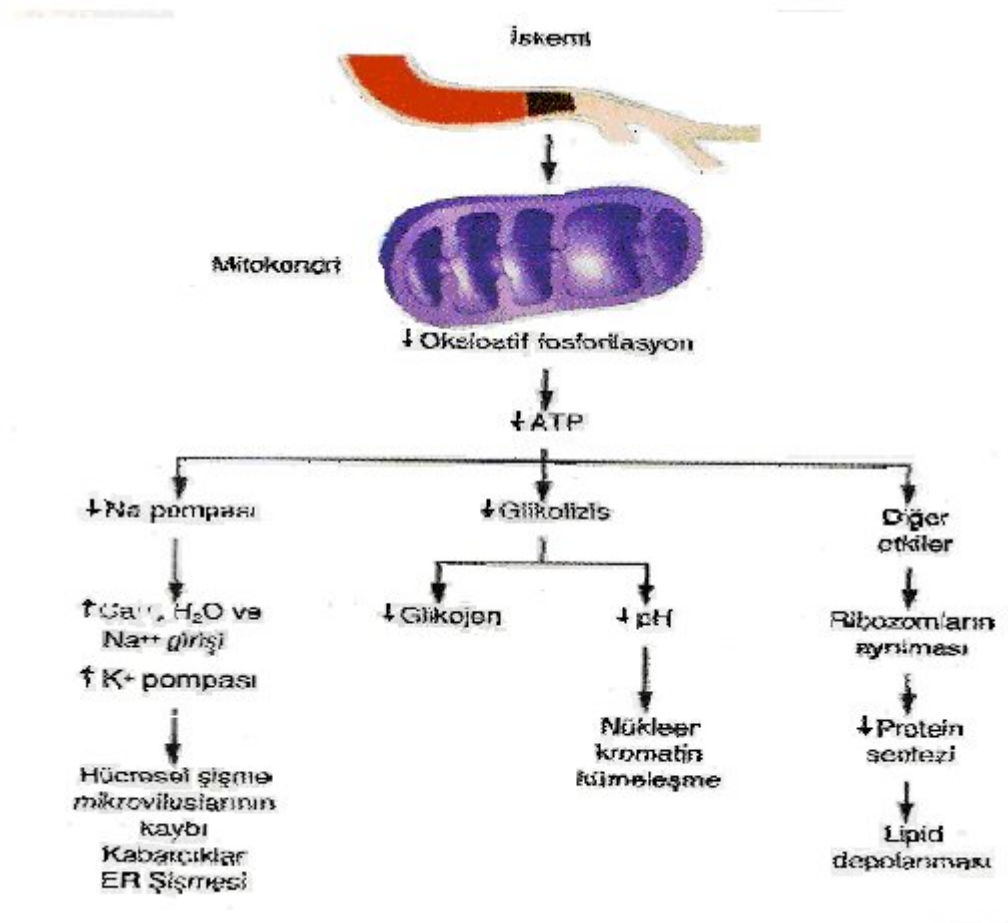
2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi Reperfüzyon Hasarı

2.1.1. İskemi

Dokuların normal homeostazı için gerekli olan oksijenin taşınmasındaki yetersizlik iskemi olarak tanımlanır. Hücresel fonksiyonların gerçekleşebilmesi için gerekli temel yakıt oksijendir. Normal hücre fonksiyonları için gerekli olan yüksek enerjili fosfat bağları aerobik metabolizma ile sağlanır. Oksijen yetersizliği durumunda anaerobik metabolizma devreye girer. Bu da laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimi ile sonuçlanır. Ortaya çıkan asidoz nedeniyle normal enzim kinetiği değişir ve yüksek enerjili fosfat bağlarının yapımı azalır. Bu durumda hücre kendi homeostazı için gerekli olan enerjiden yoksun kalır (12–14).

Homeostaz için gerekli olan enerji kaynaklarının, özellikle ATP sentezinin azalması (ya mitokondrial oksidatif fosforilizasyon ya da anaerobik glikoliz yolu ile) intrasellüler metabolit birikmesine ve hücre membranında iyon dengesizliğine yol açar (14,15). İskemik hasara karşı gelişen erken fazdaki bu değişiklikler zedeleyici ajan ortadan kaldırılmazsa irreversible hücre hasarı meydana gelir (Şekil 2.1).Kalsiyum iyon dengesi bozulur, hücre dışı Ca^{++} ' un plazma membranından içeriye akışı artarak stoplazmada birikir. Bu olaylar sonucunda sırasıyla mitokondriyal hasar,lizozomlarda şişme, endoplazmik retikulumun dilatasyonu, enzim ve protein kaybı,hücresel kompartmanların bozulması ve otoliz meydana gelir. Bunu asidoz ve ozmotik şok gibi klinik bulgular ile kromatin kümelenmesi ve piknozis gibi histolojik bulgular takip eder (16).



Şekil 2.1. İskemide erken fazdaki değişiklikler

2.1.2. Reperfüzyon

İskemik dokuda kan akımının normale dönmesi ile enerji kaynağının geri gelmesi ve toksik metabolitlerin temizlenmesi gibi iki yararlı sonuç ortaya çıkar. Bundan dolayı reperfüzyon iskemik hasarın iyileşmesi için ön koşuldur. Ancak paradoks olarak iskemik dokunun reperfüzyonu daha fazla hasarla sonuçlanabilir(12,17). Oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönmesi ile O₂ kaynaklı serbest radikallerin İ/R hasarında önemli rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir (18–20).

Dokuda her iskemi periyodu sonrasında progresif mikrovasküler obstrüksiyondan dolayı reperfüzyon süreci gelişmeyebilir. No-reflow fenomeni olarak adlandırılan bu süreç tam mekanizması bilinmemekle birlikte, mikrovasküler yapının bozulması (endotelde ödem, trombosit agregasyonu, hızlı miyosit ödemi sonucu damarın kompresyonu) sorumlu tutulmaktadır (21). Reperfüzyon süreci

iskemik intervalin uzunluğu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir, 1–3 saat iskemik kalan kaslar reperfüze edilebilirken, 5 saat iskemiyeye maruz kalan olgularda %40–50 oranında no-reflow fenomeni gelişmiştir (22).

İskemiye bağlı hasarın geri döndürülebilmesinde doku reperfüzyonu mutlak olmakla birlikte paradoksik olarak, reperfüzyon sonrası sağlanan oksijen ve metabolitler doku hasarının artışına neden olur. Birçok çalışmada, I/R hasarının iskemik hasara göre çok daha fazla toksik ürün oluşturduğu gözlenmiştir (23).

İskemik dönemde oluşan oksidatif fosforilasyon hasarı, hem ATP depolarında hızlı tükenme ve hipoksantin artışına, hem de azalmış ATP'ye bağlı hücre içi kalsiyumda hızlı artışa neden olur. Dolayısıyla, hücre içi kalsiyumun artış hızı ve miktarı, hasarı etkileyen en önemli ve erken mekanizma olup, hücre nekroz ve apoptozuyla direkt ilgilidir (24,25). Artmış mitokondriyal kalsiyum, oksijenin suya olan dördüncü seviyeden redüksiyonunu engelleyerek birinci derece redüksiyon ve radikal oluşumuna neden olur (26). Ek olarak, iskemik dokuda ATP'yi daha fazla azaltıp hasarı derinleştirir (27). Kalsiyumun hücre içi birikimi reperfüzyon süresince artarak devam eder. Dolayısıyla doku iskemisi sonucu gelişen hücre içi kalsiyum artışı ve ATP azalması birbirlerini indükleyerek kısır bir döngüye neden olur. Hücre içi kalsiyum birikiminin engellenmesi bu kısır döngüyü kırarak kalsiyuma bağlı oluşan hasarları azaltır (28).

Oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü dokuyu daha fazla zedeleyen bir reaksiyon sürecini başlatır. Reperfüzyon hasarı SOR, endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizmayla gerçekleşir. Hasarı asıl tetikleyen olayın endotel hücrelerindeki zedelenme olduğu düşünülmektedir (29–32).

I/R'da doku hasarının oluşmasında rol oynayan faktörler şunlardır;

I- Ksantin Oksidaz

II- Polimorf Nüveli Lökosit (PNL) aktivasyonu

III- Endotelial faktörler

1-Arasidonik asit metabolitleri

a)-Prostasiklin (PGI₂)

b)-Tromboksan A₂ (TxA₂)

c)-Lökotrien B₄

2-Nitrik Oksit

3-Endotelin

IV- Komplemanlar

V- Sitokinler

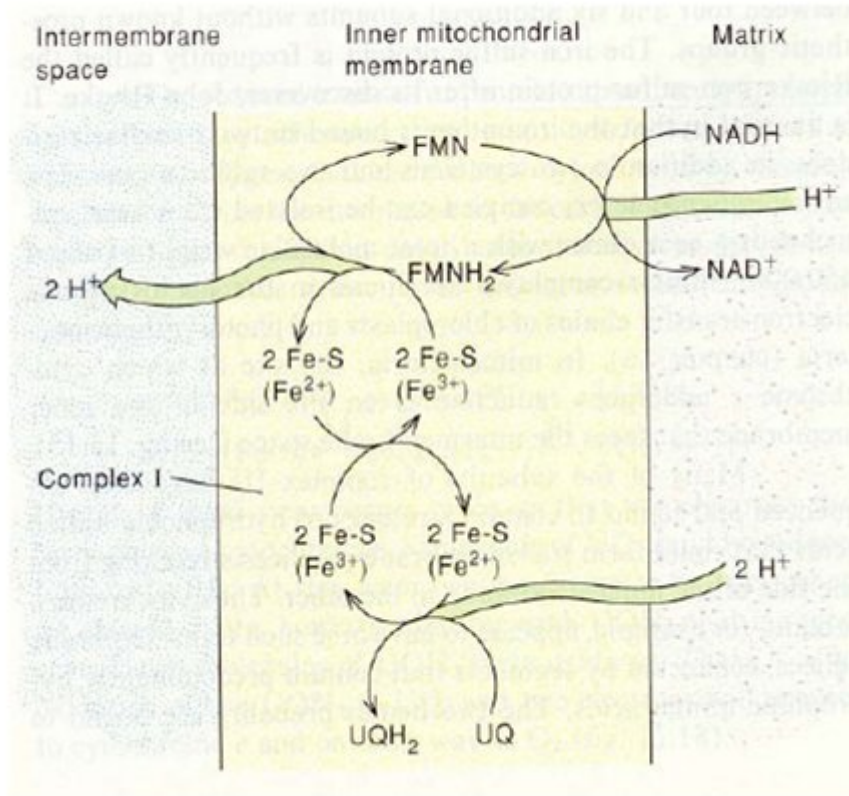
VI- Platelet Aktive Edici Faktör (PAF)

2.2. Mitokondri ve ETS

Mitokondri, oksidatif fosforilasyon yoluyla hücreye ATP sağlar. Çift zar yapısına sahip olup, iç zar elektron taşıma zinciri öğelerini içerir. Uzun süreli iskemi, elektron taşıma komplekslerinin tüm alt ünitelerinde fonksiyonel ve yapısal hasara yol açmakla birlikte, iskemik hasara en hassas olan alt üniteler NADPH dehidrogenaz ve ubiquinol cytochrome c reductase sistemleridir. Doku reperfüzyonuyla birlikte elektron taşıyıcı komplekslerde hasar artarak hücre içi ve dışına elektron sızıntısı oluşur. Mitokondri aynı zamanda hidrojen peroksit için önemli bir kaynak oluşturur.

Kompleks I (NADH dehidrojenaz kompleksi)

Kompleks I (NADH dehidrojenaz kompleksi), iç mitokondriyal membrana gömülmüştür. NADH bağlayan yeri matriks tarafındadır ki burası matrikste oluşan NADH ile etkileşebilir. Kompleks I, elektronların NADH'den ubikinona (UQ) transferini katalize eder (Şekil 2.2).



Şekil.2.2.Kompleks 1 (NADH dehidrojenaz kompleksi)

Elektron transport zincirine kompleks I üzerinden giren NADH'deki elektronlar, ubikinona (UQ, koenzim Q) aktarılırlar. Ubikinonun tamamen indirgenmiş formu olan UQH₂, membranda kompleks I'den kompleks III'e diffüze olur. Kompleks III'te de UQH₂ okside form olan UQ formuna oksitlenecektir. Elektronların kompleks I yoluyla kompleks III'e akışı, protonların mitokondriyal matriksten membranlar arası boşluğa hareketiyle eşleşmiştir ki böylece bir proton gradienti oluşur, bu proton gradienti de mitokondriyal ATP sentezi için önemlidir.

Kompleks I, bir barbitürat olan *amytal* (amobarbital), bir insektisit olan *rotenon* ve bir antibiyotik olan *piericidin A* tarafından inhibe edilir.

2.3. Apoptozis

Yaşamakta olan hücreler iki farklı mekanizma ile ölürler. Bu mekanizmalar

nekroz ve apoptozisdir. Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Apoptozis ise yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Nekroz patolojik bir olaydır. Apoptozis ise fizyolojik veya patolojik uyarılarla oluşabilir (33). Apoptozis ve nekrozun başlıca özellikleri Tablo 2.1’ de gösterilmiştir (34).

Tablo 2.1. Apoptozis ve nekrozun başlıca özellikleri

ÖZELLİKLER	NEKROZ	APOPTOZİS
Uyaran	Toksinler, ciddi hipoksi, ağır yara ve ATP tüketimi	ATP tüketimi olmaksızın fizyolojik ve patolojik koşullar
Enerji gereksinimi	Enerji gereksinimi yok	Enerji gereksinimi var, ATP’ye bağlı
Histoloji	Hücrel şişme, organel bozukluğu, doku parçalarının ölümü	Kromatin kondensasyonu, apoptotik cisimcikler, izole tek hücrenin ölümü
DNA kırık modeli	Düzensiz rastgele kırık şeklinde	185 baz çiftlik kırıklar şeklinde “ip merdiven” görüntüsünde

Tablo 2.1.(Devam)

Hücrelerin fagositozu	Fagositlerin göçüyle	Komşu hücrelerle
Doku reaksiyonu	İnflamasyon	İnflamasyon yok
Plazma zarı	Parçalanmış	Moleküler değişikliklerle birlikte parçalanmamış

Apoptozis rejenerasyon ve tamir olaylarında, hücrel homeostazın sağlanmasında ve organ büyüklüklerinin korunmasında önemlidir. Tablo 2.2' de apoptozisin arttığı ve azaldığı durumlarda oluşan hastalıklar izlenmektedir (35).

Apoptozis hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden bir olaylar zinciri olarak seyreder. Hücre içinden veya dışından gelen sinyaller, kaspazları aktive eder. Aktive olan kaspazlar hedef proteinlerini yıkarak, hücre içi değişikliklere neden olur. Sonuçta çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşmasıyla hücre parçalanarak apoptotik cisimlere ayrılır. Apoptotik cisimler fagositoz yoluyla yok edilirler (33).

Tablo 2.2. Hastalıklarda apoptozisin rolü

Apoptozisin artmasıyla ilgili hastalıklar	Apoptozisin azalmasıyla ilgili hastalıklar
1.Nörodejenaratif bozukluklar Alzheimer hastalığı Amyotrofik lateral skleroz Creutzfeld-Jakob hastalığı Huntington hastalığı Parkinson hastalığı Retinitis pigmentosa Spinal muskular atrofi	1. Kanser Blastom Karsinom Lösemi Lenfoma Malign gliom Sarkom Seminom

Tablo 2.2.(Devam)

<p>2. Hematolojik bozukluklar</p> <p>Aplastik anemi Fanconi anemisi Hodgkin hastalığı Myelodisplastik sendromlar, Polycythemia vera</p>	<p>2. Premalign hastalıklar</p> <p>Ataxia telangiectasia Paroksimal nokturnal hemoglobinüri Myelodisplastik sendromlar Xeroderma pigmentosum</p>
<p>3. Otoimmün bozukluklar</p> <p>Fulminant hepatit Graft-versus-host hastalığı Hashimoto tiroiditis İnsüline bağımlı diyabet Multipli skleroz, Romatoid artrit</p>	<p>3. Otoimmün bozukluklar</p> <p>Otoimmün lenfoproliferatif sendrom (tip I ve II) Sistemik lupus erythematosus</p>
<p>4. İskemik yaralanma</p> <p>İskemi ve reperfüzyon Böbrek enfarktüsü Miyokardial enfarktüs, İnme</p>	<p>4. Ateroskleroz</p>
<p>5. Toksinlere bağlı hastalıklar</p> <p>Alkole bağlı hepatit Pulmonar fibrozis, Sepsis</p>	<p>5. Metabolik bozukluklar</p> <p>Niemann-Pick hastalığı Osteoporozis Wilson hastalığı</p>
<p>6. Bakteriyal ve viral enfeksiyon</p> <p>Kazanılmış immün yetersizlik sendromu (AIDS) Chlamydia trachomatis Helicobacter pylori Neisseria meningitis Salmonella , Shigella flexneri</p>	<p>6. Viral enfeksiyonlar</p> <p>Adenoviruses Baculoviruses Epstein-Barr Virus Herpesviruses Poxviruses</p>

Apoptozisin Önemi

İnsan vücudunda her saniyede 100 000 hücre mitoz ile oluşurken, yine benzer sayıda hücre apoptozis ile ölür (36). Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik bir süreçtir. Programlanmış hücre ölümü, embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun gelişiminin sürdürülmesinde anahtar rol oynar. Apoptozis, hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım, yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar. Örneğin kemik iliğinden devamlı olarak hücre üretimi devam ederken, günde yaklaşık 5×10^{11} kan hücresi apoptozis yolu ile yok edilmektedir (37). Barsak epitel hücrelerinin devamlı yenilenmesi, menstruasyon esnasında uterusun iç yüzündeki hücrelerin öldürülerek uzaklaştırılması apoptozise örnektir. Apoptozis, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Örneğin virüsle enfekte hücreler bu yolla ortadan kaldırılır. Hasarlı DNA da apoptozis yolu ile ortadan kaldırılır (37,38). Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır (39). Apoptozis, doku gelişimi esnasında istenmeyen hücrelerin yok edilmesinde de rol alır. Örneğin böcek ve amfibilerin metamorfozu esnasında larva dokusunun yok edilmesine neden olur. Diğer bir örnek de memelilerde sinir sisteminin gelişimi esnasındaki programlanmış hücre ölümüdür. Fazla sayıda üretilen nöronların %50'den fazlası programlanmış hücre ölümü yoluyla ortadan kaldırılır. Ayrıca akut hücre hasarı durumunda da apoptozis rol almaktadır (37).

Apoptoziste Hücre Morfolojisi

Apoptozis, dokuda belli bir bölgedeki tüm hücreleri etkilemek yerine, dağınık olarak tek tek hücrelerde ortaya çıkar ve tipik olarak yangısal değişiklikler yoktur. Apoptoziste ana morfolojik olay, nükleusun kondensasyonu ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Kromatin, normalde mikst kondens bir yapıda olup daha diffüz görünümündedir. Apoptoziste süperkondens bir hal alarak nükleus zarı altında kresentik görünüm oluşur. Floresan boyamada DNA boncuklanmalar şeklinde görülür, bunun nedeni DNA'nın endonükleaz ile oldukça özgül şekilde internükleozomal bölgelerden 180–200 bp. (baz çifti) büyüklüğünde parçalara ayrılmasıdır. İmmün elektroforez yapıldığında "*ladder patern*" olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur (40). Normalde bir hücrede birbirini takip

eden 7 kırılma onarılrken, apoptoziste yaklaşık 300 000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz. Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, birkaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Bu görünüm, muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlıdır. Apoptotik hücrelerin bulunduğu dokulardan elde edilen kesitler ışık mikroskopunda incelendiğinde, hücreler, etrafında açık bir halo ile görülmektedir Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Hücre henüz yaşamaya devam etmektedir (41).

Apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir. Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma membranındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yaprağına göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidil serin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (42).

Diğer bir hücre ölüm şekli olan nekroz ise hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, Ultraviyole ışık gibi zararlı hücre dışı uyaranlar sonucu oluşan istenmeyen bir süreçtir. Hücre plazma membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu hücre içeriği ortama dökülür, inflamatuvar yanıt oluşur ve komşu hücreler de etkilenir (43).

Apoptozis ve Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α):

TNF- α , aktive olmuş makrofajlar tarafından salgılanan, proinflamatuvar, pirojen, akut faz reaktanı bir sitokindir. Endotoksin, inflamatuvar olaylar, immün kompleksler, fiziksel hasar ve toksinler salınımını uyarmaktadır. TNF- α , endotel aktivasyonuna yol açarak, nitrik oksit (NO) salınımını ve inflamasyonu körükler, prokoagülan ortam hazırlar, fibroblastları uyurarak kollagen sentezini arttırır ve lökositleri aktive ederek inflamatuvar sitokin salınımına yol açar (44).

TNF- α ayrıca, apoptozisin ekstrensek yolağında, özellikle kaspaz-3 aktivasyonunda önemli rol oynadığı gibi, intrinsek apoptozis yolağında da başlangıç kaspazlarını aktifleştirmek suretiyle etkin olduğu gözlenmiştir. Proapoptotik bir

sinyal olarak kabul edilen TNF- α 'nın antagonistleri, antiapoptotik etkinlik göstermektedirler (45).

Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanısıra apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn: aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir. İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis, 80'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlandı. 90'ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulundu. Böylece kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlarla saptanabilen apoptozis, 90'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlandı. Apoptozisin belirlenmesine yönelik geliştirilen tüm metodları 2000'li yılların başlarında, sadece apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikorların kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etti. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler Tablo 2.3' de gösterilmiştir (46).

Tablo 2.3. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Morfolojik görüntüleme yöntemleri	<ul style="list-style-type: none"> • Işık mikroskobu: H&E, Giemsa • Floresan mikroskobu • Elektron mikroskobu • Faz kontrast mikroskobu
-----------------------------------	---

Tablo 2.3.(Devam)

Biyokimyasal yöntemler	<ul style="list-style-type: none"> • Agaroz Jel Elektroforezi • "Western" Blotting • "Flow" Sitometri
İmmünojenik yöntemler	<ul style="list-style-type: none"> • ELISA • Flourimetrik Yöntem
Moleküler biyoloji yöntemleri	<ul style="list-style-type: none"> • DNA Microarrays

2.4.Rotenon:

Bitkisel kökenli insektisid olarak kullanılan *rotenon* böceklerde hem kontakt hemde mide zehiri olarak etki göstermektedir. Hemen öldürme bile böceğin ağız kaslarını felç ederek beslenmeyi durdurmaktadır. Ölümün oluşması ise daha yavaş bir seyir göstermekte ve çoğunlukla solunum metabolizmasında elektron taşıma zincirinin engellenmesi şeklinde oluşmaktadır.

Mitokondride elektron transport zincirinde rol oynayan ilk enzim kompleks I enzimidir. Bu enzim mitokondride reaktif oksijen ürünlerinin oluşmasında önemli bir fonksiyona sahiptir. Kompleks I'de oluşan NAD'dan FMN'ye iki elektron transferi reaksiyonunu katalizler. Kompleks I elektron transfer enerjisi tarafından yönetilen bir proton pompası gibi çalışır. Bu ilk basamağın inhibe olması elektron transport sisteminin fonksiyonlarının aksamasına yol açar. Mitokondrial elektron transport inhibitörü olan *rotenon*, bir antibiyotik olan *antimisin-A*, barbitüratlardan *amital* ve *siyanid* gibi oksidatif fosforilasyonu inhibe ederek antioksidatif savunma mekanizmasında rol alır (47).

Rotenon antioksidan olarak çeşitli organ hasarlarında kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda intestinal mukozada (48), hepatositlerde (49) ve kardiyomyosit hücrelerinde (50) oksidatif hasarı azalttığı belirtilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi T.I.C.A.M. (Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi) laboratuvarında 13.05.2009 tarihli 109-19 sayılı etik kurul kararıyla yapıldı.

Çalışmada TICAM'dan temin edilen 5–6 aylık, ağırlıkları 250–300 gr. arasında değişen her iki cinse ait *Sprague-Dawley* türü sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar standart sanayi yemi ve musluk suyu ile beslenmiştir. Çalışma 3 gruptan oluşmuştur ve her bir grupta 10 adet sıçan olacak şekilde toplam 30 adet sıçan kullanılmıştır.

Grup I. Kontrol Grubu (n=10)

Grup II. İskemi-Reperfüzyon Grubu (n=10)

Grup III. İskemi-Reperfüzyon + Rotenon Grubu (n=10)

Sıçanlar yeni ortam ve koşullarına uyum sağlamaları için kafeslere yerleştirildikten bir hafta sonra deneye başlanmıştır.

Tüm ratlara 8 saatlik açlık sonrasında, subkutan (sc) olarak 50 mg/kg Sodyum Pentotal anestezisi verildi. Anestezinin ardından ratlar supin pozisyonda yatırılarak %10'luk povidon iodin ile bölge temizliği ve median laparotomi kesisi yapıldı.

1.gruptaki sıçanların kontrol amacıyla orta ve sol lobu besleyen hepatik arterler, portal ven ve safra yolu eksplore edilip, başka bir işlem yapılmadan 90 dakika sonra intrakardiyak girişimle yaklaşık 2 ml kan örneği alındı, ardından ratların karaciğerlerinden doku örneği alınarak sıçanlar dekapite edildi.

2.gruptaki (iskemi-reperfüzyon grubu) sıçanların; vasküler klemple karaciğerin orta ve sol lobunu besleyen hepatik arterleri, portal ven ve safra yolu klempe edilerek 45 dakika iskemi gerçekleştirildi. Reperfüzyon'dan 45 dakika sonra intrakardiyak girişimle yaklaşık 2 ml kan örneği alındı, ardından ratların karaciğerlerinden doku örneği alınarak sıçanlar dekapite edildi.

3.gruptaki (iskemi-reperfüzyon + rotenon grubu) sıçanlara iskemiden 2 saat önce *rotenon* (1,5mg/kg; *Sigma R-8875, Chemical Co. St. Louis, MO, USA.*) intraperitoneal olarak verildi. 45 dakika reperfüzyon sonrasında 2cc kan ve karaciğerden doku örneği alındı.

Çıkarılan karaciğer dokusunun bir kısmı soğuk %0,09 NaCl ile yıkayıp alüminyum folyo içine sarılarak -80 C° 'de muhafaza edildi. Dondurulan örnekler oda ısısında çözüldükten sonra doku MDA ve TNF- α düzeyleri saptandı. Alınan kan örneği 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra ayrılan plazma -80 C° 'de muhafaza edildi. Dondurulan serum örnekleri oda ısısında çözüldükten sonra serum AST, ALT, LDH ve MDA düzeyleri ölçüldü.

Çalışmanın biyokimyasal değerlendirilmesinde; doku örneklerinin homojenizasyonu 1/10 oranında 0.1 M, fosfat tamponu (pH: 7,4) ile IKA T18 Basic marka (Wilmington NC, USA) homojenizatör ile yapıldı. Homojenizatlar 8000 rpm, +4 °C de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar nümune olarak kullanıldı.

Dokuda TNF- α , Biosource firmasına ait ELISA kitleri kullanılarak ölçüldü. Doku ve serum MDA düzeyleri ise Agilent 1100 Series marka HPLC sisteminde Chromsystems Diagnostics (Munich, Germany) firmasına ait kolon ve kitler kullanılarak ölçüldü. Tüm doku örneklerinde sonuçlar gram doku proteini başına verilmiştir. Doku proteinleri Fluka marka kit ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Serum ALT, AST ve LDH düzeyleri Hithachi Modular P Otoanalizöründe Roche Diagnostic Firmasına ait kitler ile çalışıldı.

Çalışmanın histopatolojik değerlendirilmesinde; incelenecek olan karaciğer dokuları, nötral formalinde 24 saat fikse edildikten sonra, doku takip cihazı ile rutin histolojik takipleri yapıldı. Parafin blokları hazırlanan dokuların her birinden 4 μ m kalınlığındaki seri kesitler, poly-L-lysin kaplı lamlara alındı. Parafin bloklardan elde edilen kesitlere iki değişik histolojik boyama yöntemi uygulandı.

Karaciğerlerin genel yapı özelliklerini ortaya koymak için Hematoksilen-Eozin (H&E) boyama yöntemi kullanıldı. Karaciğerin histolojik değerlendirilmesinde skorlama kullanıldı. Bu skorlamada hepatik hasar; (-): yok, (+): hafif, (++) : orta ve (+++) : şiddetli olarak değerlendirildi. Hepatik hasarın incelenmesinde; vena centralis, portal alan ve sinuzoidlerdeki konjesyon, hepatositlerdeki balonlaşma dejenerasyonu ve yeri, parenkimdeki fokal nekrozun varlığı, PMNL ve MNL infiltrasyonu, hepatosit nükleuslarında karyoliz, piknoz varlığı, intersellüler sınır kaybı ve hepatik kordlardaki bozulma skorlanarak değerlendirildi.

Apoptozis gösteren hücreleri belirlemeye yönelik TUNEL boyaması yapıldı. Kesitler DP70 dijital kamera ekli Olympus marka fotomikroskop ile görüntülendi. Her bir sıçana ait rasgele seçilmiş 25 parafin kesitte X40 objektif ile 50 alanda, oküler mikrometresi yardımıyla, kahverengi boyanmış apoptotik hücreler sayıldı. Her bir sıçana ve daha sonra da her bir gruba ait apoptotik indeks aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{Apoptotik İndeks (AI)} = \frac{\text{Apoptotik Hücre Sayısı}}{50}$$

Daha sonra elde edilen bulgular, istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

İstatiksel değerlendirme Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı tarafından yapıldı. İstatistiksel değerlendirmede SPSS 13,0 (Statistical Package for Social Sciences) paket programı kullanıldı.

Karaciğer örneklerinde ölçülen serum ALT, AST, LDH ve MDA düzeylerinin ve doku MDA ve TNF- α düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık TUKEY HSD çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi. Elde edilen veriler ortalama ve standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel yönden $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

Histopatolojik inceleme sonucunda her sıçanın karaciğer spesmenlerinde apoptozis gösteren hücreler sayılarak tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabi tutuldu. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık TUKEY HSD çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi.

Elde edilen veriler ortalama ve standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel yönden $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Serum AST, ALT, LDH ve MDA Düzeyleri

Kontrol grubunun, iskemi-reperfüzyon ile karaciğer hasarı oluşturulan grubun ve iskemi-reperfüzyon öncesi *rotenon* uygulanan grubun serum AST, ALT, LDH ve MDA değerleri Tablo-4.1’de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. Gruplara göre serum AST, ALT,LDH VE MDA değerleri

GRUP 1	SIÇAN NO	ALT(U/L)	AST(U/L)	LDH(U/L)	MDA(nmol/ml)
(KONTROL)	1	53	41	347	1,5
	2	61	72	335	1
	3	56	91	391	1,9
	4	75	174	648	0,7
	5	38	199	1933	1,3
	6	54	84	418	2,2
	7	55	67	226	1,3
	8	65	51	442	1,7
	9	56	79	480	1
	10	75	101	491	1,1

Tablo 4.1.(Devam)

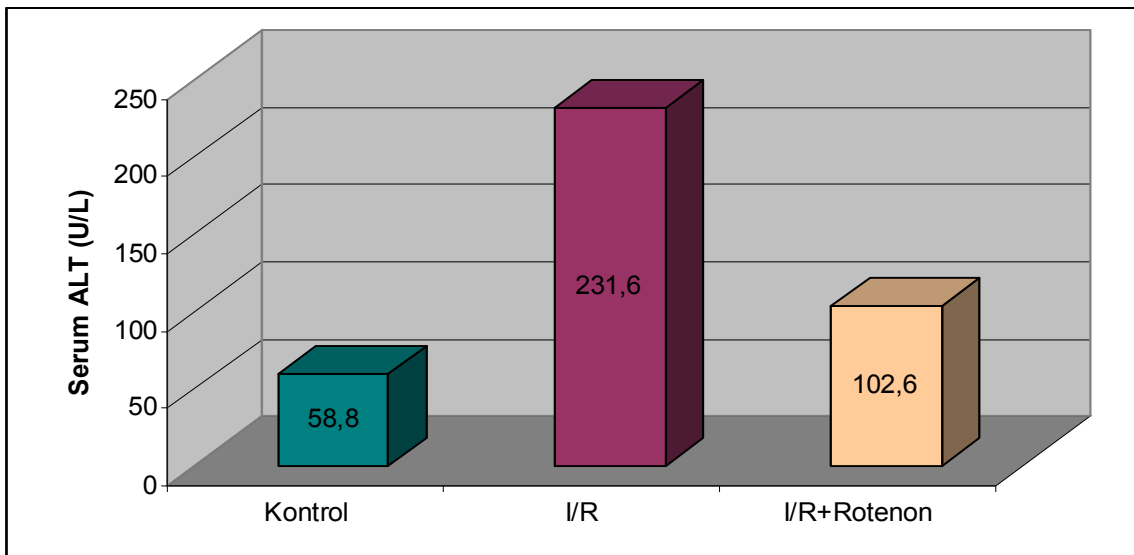
GRUP 2	SIÇAN NO	ALT(U/L)	AST(U/L)	LDH(U/L)	MDA(nmol/ml)
	1	483	1170	2619	2
	2	125	332	2497	1,4
	3	186	186	4424	2,1
	4	117	401	4183	1,7
	5	113	402	2672	1,9
	6	328	740	2875	3
	7	479	1188	3207	2,1
	8	168	1403	5261	1,8
	9	196	1765	3204	1,6
	10	121	307	2741	2,3
GRUP 3	SIÇAN NO	ALT(U/L)	AST(U/L)	LDH (U/L)	MDA(nmol/ml)
	1	56	130	1925	0,5
	2	106	334	2394	0,7
	3	81	182	1749	1,1
	4	99	206	3719	0,6
	5	79	157	1151	0,8
	6	110	418	1981	1,6
	7	119	323	2820	1,2
	8	160	365	1838	0,9
	9	117	271	2103	1
	10	99	218	1573	0,5

Kontrol grubunun, İ/R ile karaciğer hasarı oluşturulan grubun ve iskemi-reperfüzyon öncesi *rotenon* uygulanan grubun serum ALT, AST, LDH ve MDA ortalama değerleri Tablo 4.2’de gösterilmektedir.

Tablo 4.2. Gruplara göre serum ALT, AST, LDH ve MDA ortalama değerleri

SERUM	ALT (U/L)	AST (U/L)	LDH (U/L)	MDA (nmol/ml)
Kontrol (n=10)	58,8	95,9	571,1	1,37
I/R (n=10)	231,6	753,4	3368,3	1,99
I/R+Rotenon (n=10)	102,6	260,4	2125,3	0,88

Rotenonun serum ALT d¼zeyi üzerine etkisi Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

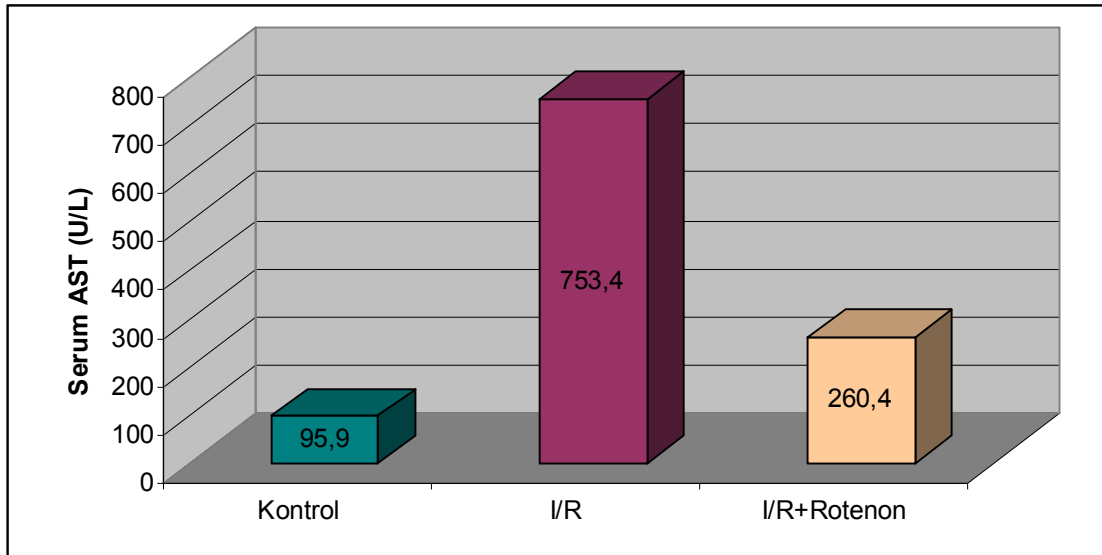


Şekil 4.1. *Rotenonun* serum ALT d¼zeyi üzerine etkisi ; * $p < 0,05$;

I/R+*Rotenon* grubu, I/R grubundan anlamlı düzeyde farklıdır. *** $p < 0,001$; I/R grubu kontrol grubundan anlamlı düzeyde farklıdır.

Kontrol grubunda serum ALT d¼zeyi 58,8 (U/L) iken, I/R grubunda yükselerek 231,6 (U/L)'ye çıktı. Rotenon verilen grupta ise 102,6 (U/L)'ye kadar düştü ve bu sonuç; kontrol grubuna göre yüksek olmakla beraber, I/R grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha düşük ($p < 0,001$) saptandı.

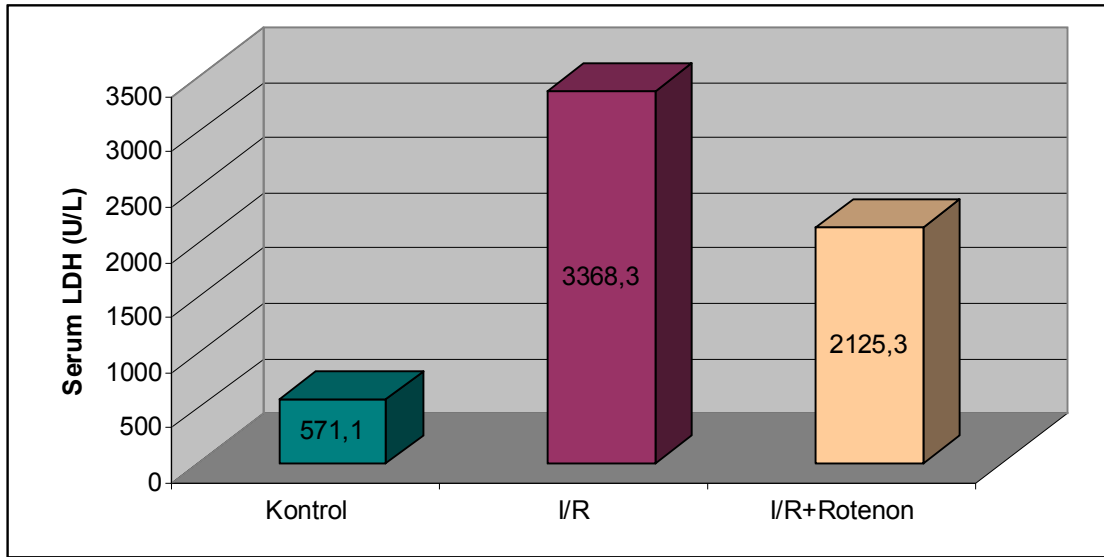
Rotenonun serum AST düzeyi üzerine etkisi Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. *Rotenonun* serum AST düzeyi üzerine etkisi; * $p < 0,05$; I/R+*Rotenon* grubu, I/R grubundan anlamlı düzeyde farklıdır. *** $p < 0,001$; I/R grubu kontrol grubundan anlamlı düzeyde farklıdır.

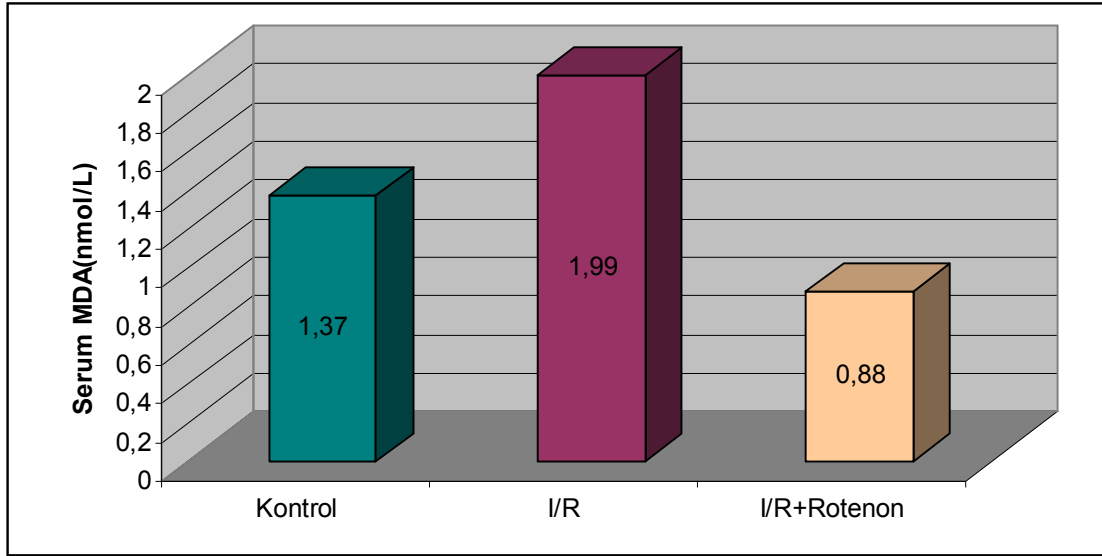
Kontrol grubunda serum AST düzeyi 95,9(U/L) iken, I/R grubunda yükselerek 753,4 (U/L) ‘ye çıktı. *Rotenon* verilen grupta ise 260,4 (U/L)’ye kadar düştü ve bu sonuç; kontrol grubuna göre yüksek olmakla beraber, I/R grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha düşük ($p < 0,001$) saptandı.

Rotenonun serum LDH düzeyi üzerine etkisi Şekil 4.3 'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. *Rotenonun* serum LDH düzeyi üzerine etkisi; *** $p < 0,001$; I/R grubu, kontrol ve I/R+*Rotenon* grubundan anlamlı düzeyde farklıdır.

Rotenonun serum MDA düzeyi üzerine etkisi Şekil 4.4 'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. *Rotenonun* serum MDA düzeyi üzerine etkisi; *** $p < 0,001$; I/R grubu, kontrol ve I/R+*Rotenon* grubundan anlamlı düzeyde farklıdır.

Kontrol grubunda serum LDH düzeyi 571,1 (U/L) iken, I/R grubunda yükselerek 3368,3 (U/L)'ye çıktı. *Rotenon* verilen grupta ise 2125,3 (U/L)'ye kadar düştü ve bu sonuç; kontrol grubuna göre yüksek olmakla beraber, I/R grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha düşük ($p < 0,001$) saptandı.

Kontrol grubunda serum MDA düzeyi 1,37 (nmol/L) iken, I/R grubunda yükselerek 1,99 (nmol/L)'ye çıktı. *Rotenon* verilen grupta ise 0,88 (U/L)'ye kadar düştü ve bu sonuç; kontrol grubu ve I/R grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak düşük ($p < 0,001$) saptandı.

Doku MDA ve TNF- α Düzeyleri

Kontrol, I/R ve I/R+ *Rotenon* gruplarının doku MDA değerleri Tablo 4.3'de gösterilmektedir.

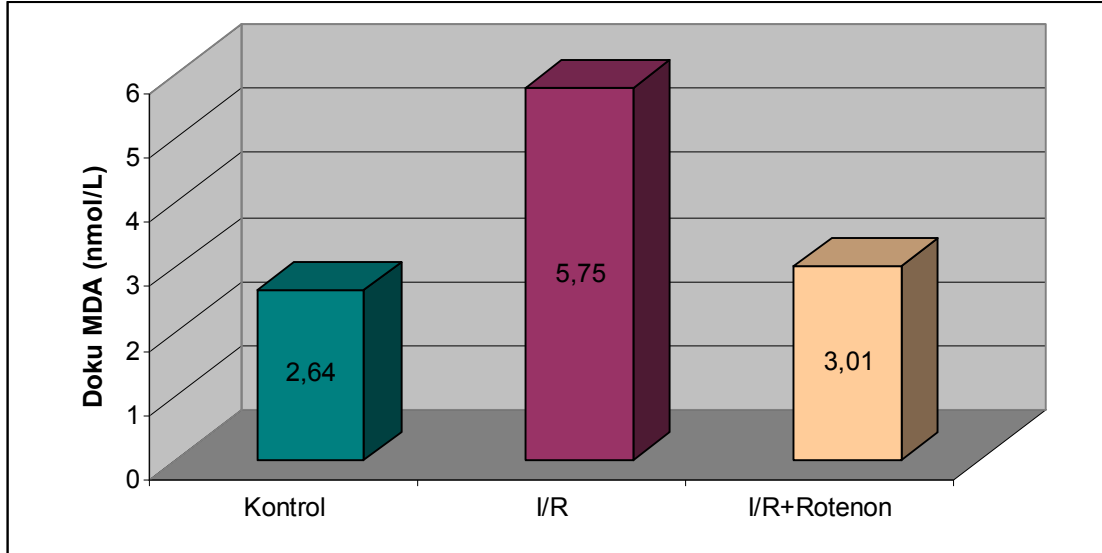
Tablo 4.3. Gruplara göre doku MDA değerleri

SIÇAN NO	GRUP1	GRUP 2	GRUP 3
1	1,63	6,88	3,24
2	1,10	2,5	1,8
3	2,1	5,00	2,43
4	2,60	6,50	5,00
5	1,5	6,58	3,1
6	4,8	7,2	4,3
7	4,6	7,6	3,3
8	4,03	6,3	1,95
9	2,3	5,1	3,8
10	1,8	3,9	1,2

Tablo 4.4. Gruplara göre doku MDA ortalama değerleri

DOKU	MDA (nmol/ml)
Kontrol (n=10)	2,64
I/R (n=10)	5,75
I/R+Rotenon (n=10)	3,01

Rotenonun doku MDA düzeyi üzerine etkisi Şekil 4.5’de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Rotenonun doku MDA düzeyi üzerine etkisi; *** $p < 0,001$; I/R grubu, kontrol ve I/R+Rotenon grubundan anlamlı düzeyde farklıdır.

Kontrol, I/R ve I/R+ Rotenon gruplarının doku TNF- α değerleri Tablo 4.5’de gösterilmektedir.

Tablo 4.5. Gruplara göre doku TNF- α değerleri

SIÇAN NO	GRUP1	GRUP 2	GRUP 3
1	1	21	4
2	7	24	14
3	10	50	7
4	12	32	9
5	8	47	6
6	11	58	55

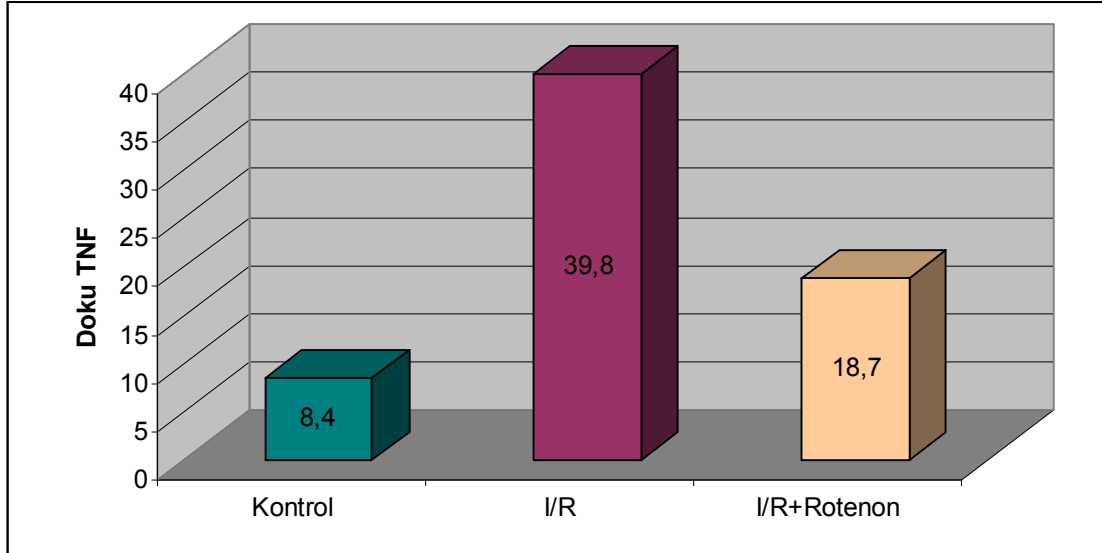
Tablo 4.5.(Devam)

SIÇAN NO	GRUP1	GRUP 2	GRUP 3
7	9	32	25
8	7	30	11
9	4	55	17
10	15	49	39

Tablo 4.6. Gruplara göre doku TNF- α ortalama değerleri

DOKU	TNF (pg/ml)
Kontrol (n=10)	8,4
I/R (n=10)	39,8
I/R+Rotenon (n=10)	18,7

Rotenonun doku TNF- α düzeyi üzerine etkisi Şekil 4.6 'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. *Rotenonun* doku TNF- α düzeyi üzerine etkisi; *** $p < 0,001$; I/R grubu, kontrol ve I/R+*Rotenon* grubundan anlamlı düzeyde farklıdır.

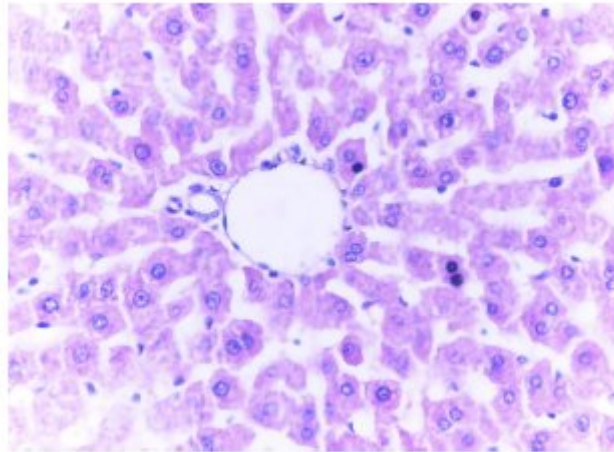
Kontrol grubunda doku MDA düzeyi 2,64(U/L) iken, I/R grubunda yükselerek 5,75 (U/L)'ye çıktı. *Rotenon* verilen grupta ise 3,01 (U/L)'ye kadar düştü ve bu sonuç; kontrol grubuna göre yüksek olmakla beraber, I/R grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha düşük ($p < 0,001$) saptandı.

Kontrol grubunda doku TNF- α düzeyi 8,4 (pg/ml) iken, I/R grubunda yükselerek 39,8 (pg/ml) 'ye çıktı. *Rotenon* verilen grupta ise 18,7 (pg/ml)' ye kadar düştü ve bu sonuç; kontrol grubuna göre yüksek olmakla beraber, I/R grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak ($p < 0,01$) daha düşük saptandı.

4.2. Histopatolojik Bulgular

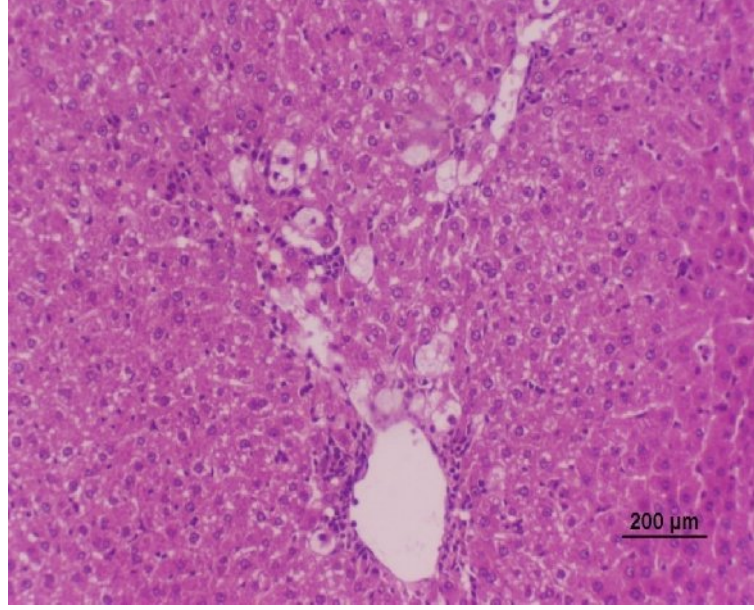
Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyama Bulguları

Kontrol grubunda konjesyon gözlenmedi. Hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu ve fokal nekroz alanları görülmemiştir. PMNL ve MNL infiltrasyonları görülmemiştir. Hücre nükleuslarında karyoliz ve piknoz, intersellüler sınır kaybı ve hepatik kordlarda bozulma görülmemiştir (Şekil 4.7)

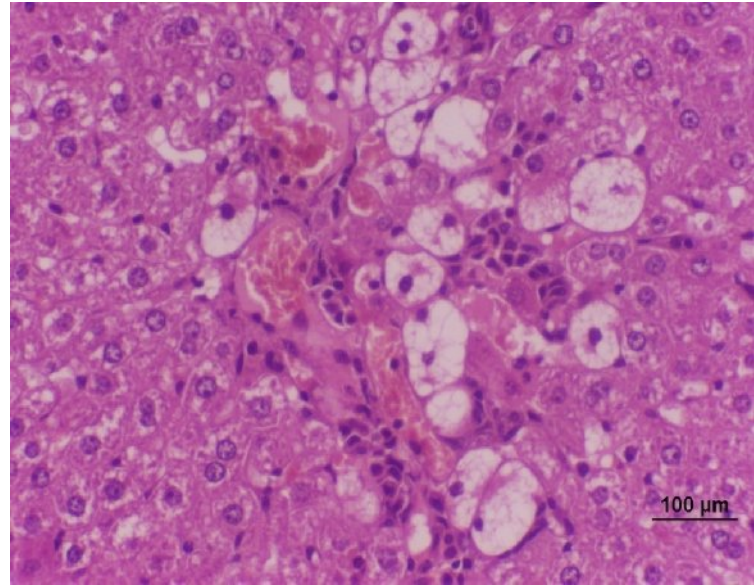


Şekil 4.7: Kontrol grubunda karaciğer dokusunun H-E ile boyanması (x400); normal karaciğer histolojisi görülmektedir.

I/R grubundaki incelemede konjesyonun sentral vende orta düzeyde, portal alan ve sinuzoidlerde şiddetli olduğunu ve kontrol grubuna göre arttığını gözledik. Hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu makroveziküler olup; sentrilobüler alanda (Zon-3'te) şiddetli, midzonal alanda (Zon-2'de) orta düzeyde idi. Parankimde fokal nekroz alanlarına rastlanmadı (Şekil 4.8, 4.9).



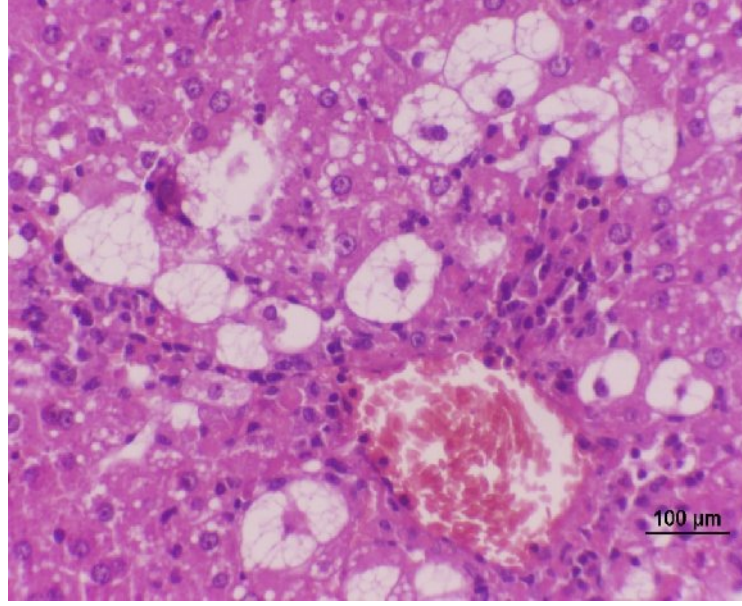
Şekil 4.8. I/R grubuna ait balonlaşma dejenerasyonu. H-E. Bar 200 µm.



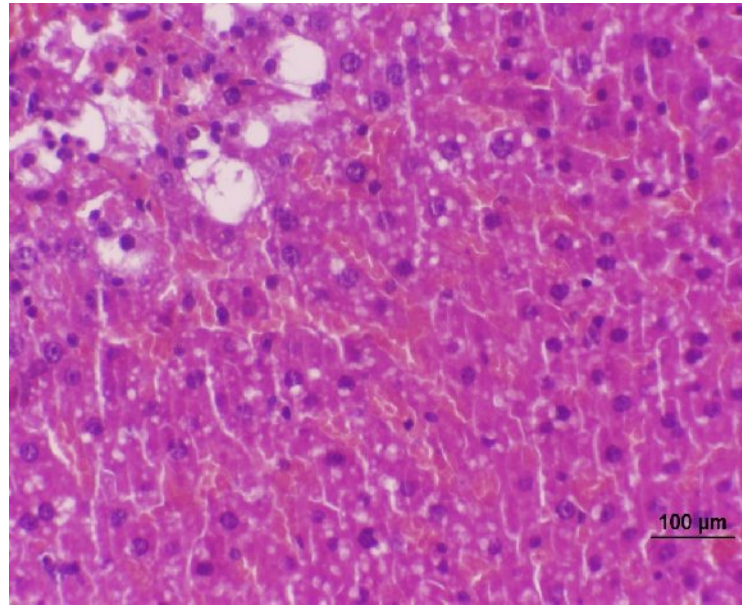
Şekil 4.9. I/R grubuna ait balonlaşma dejenerasyonu. H-E. Bar 100 µm.

PMNL infiltrasyonu hafif, MNL infiltrasyonu sentral vende hafif, portal alanda şiddetli, sinuzoidlerde orta düzeydeydi. Hücrelerde karyoliz ve piknoz orta düzeyde, intersellüler sınır kaybı ve hepatik kordlarda bozulma şiddetliydi.

I/R + *Rotenon* grubunda balonlaşma dejenerasyonu Şekil 4.10 ve 4.11’de gösterilmiştir.



Şekil 4.10. I/R+ *Rotenon* grubunda balonlaşma dejenerasyonu, konjesyon ve MNL infiltrasyonu. H-E. Bar 100 µm.



Şekil 4.11. I/R+ *Rotenon* grubunda balonlaşma dejenerasyonu. H-E. Bar 100 µm.

Rotenon verilen grupta ise sentral vende ve sinuzoidlerde orta, portal alanda şiddetli düzeyde konjesyon görüldü. Hepatositlerdeki balonlaşma dejenerasyonu mikroveziküler, az miktarda makroveziküler olup; sentrilobüler alanda (Zon-3'te)

orta düzeyde idi. Fokal nekroz alanları görülmedi. PMNL infiltrasyonu görülmezken, MNL infiltrasyonu sentral vende hafif, portal alan ve sinuzoidlerde orta düzeyde görülmüştür. Hücre nükleuslarındaki karyoliz ve piknoz hafif düzeyde idi. İntersellüler sınır kaybı hafif ve hepatik kordlardaki bozulma orta olarak skorlandı.

Tüm gruplar karşılaştırıldığında; parenkimde fokal nekroz alanları hiçbir grupta gözlenmedi. Sentral ven ve portal alandaki konjesyon açısından I/R grubu ve *rotenon* verilen grup arasında bir fark gözlenmezken, *rotenon* verilen grupta sinüzoidal konjesyonda I/R grubundakine göre bir azalma gözlenmiştir. MNL infiltrasyonu açısından sentral ven ve sinuzoidlerde bir farklılık gözlenmezken, portal alandaki MNL infiltrasyonunda *rotenon* verilen grupta, I/R grubuna göre bir azalma gözlenmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Gruplarda H&E İncelemelerinin Karşılaştırılması –I

GRUPLAR	Konjesyon			PMNL			MNL			Fokal Nekroz
	CV	PA	SİN	CV	PA	SİN	CV	PA	SİN	
Kontrol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
I/R	++	+++	+++	+	+	+	+	+++	++	–
I/R+<i>Ro</i>tenon	++	+++	++	–	–	–	+	++	++	–

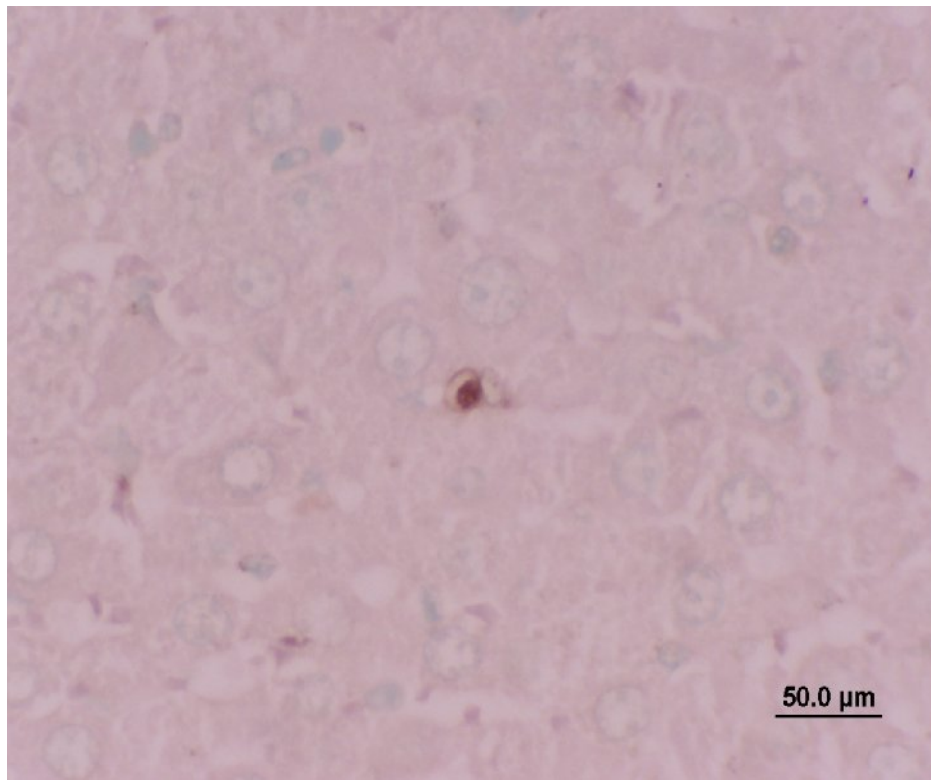
Yine tüm gruplar karşılaştırıldığında; balonlaşma dejenerasyonunda *rotenon* verilen grupta, I/R grubuna göre bir azalma gözlenmiş olup, sadece sentrilobüler zonda (Zon-3) balonlaşma dejenerasyonuna rastlanmıştır. PMNL infiltrasyonunda *rotenon* verilen grupta, I/R grubuna göre bir azalma gözlenmiştir. I/R grubundaki balon dejenerasyonu makroveziküler, *rotenon* verilen gruptaki balon dejenerasyonu ise mikroveziküler, az miktarda makroveziküler idi. Karyoliz ve piknoz, intersellüler sınır kaybı ve hepatik kordlarda bozulma açısından *rotenon* verilen grupta, I/R grubuna göre bir azalma gözlenmiştir (Tablo 4.8). Bu gözlemler ışığında rotenonun varlığında skorların azalmaya yönelik olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 4.8. Gruplarda H&E İncelemelerinin Karşılaştırılması -II

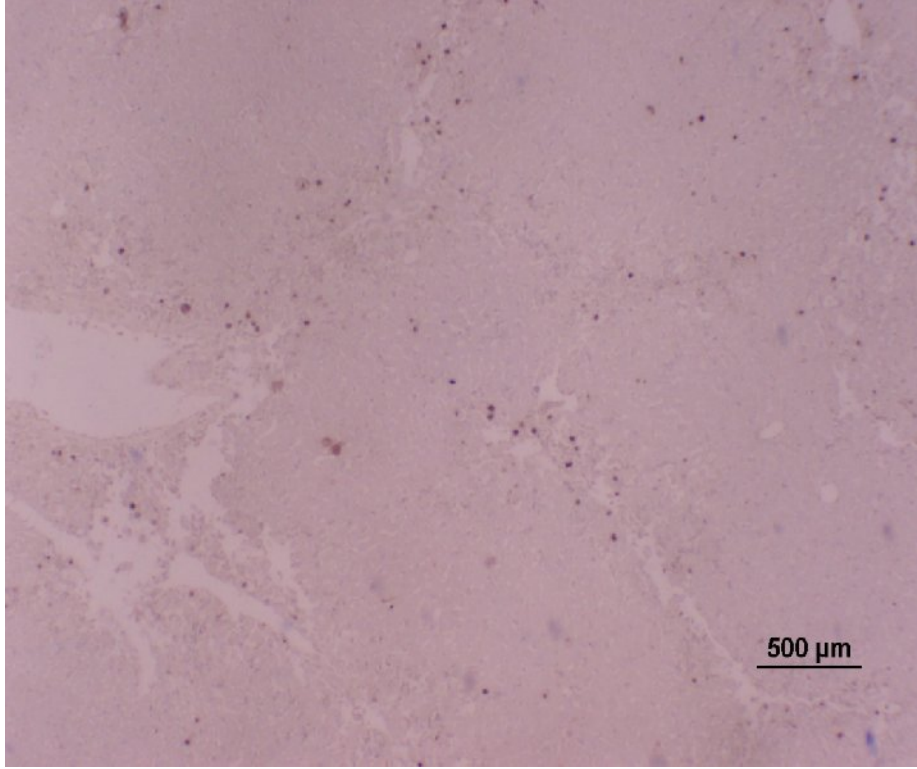
GRUPLAR	Balon Dejenerasyonu Ve Yeri	Karyoliz, Piknoz	İntersellüler Sınır Kaybı	Hepatik Kord Bozukluğu
Kontrol	–	–	–	–
I/R	+++ Z3,SL ++ Z2,MZ	++	+++	+++
I/R+Rotenon	++ Z3,SL	+	+	++

TUNEL Boyama Bulguları

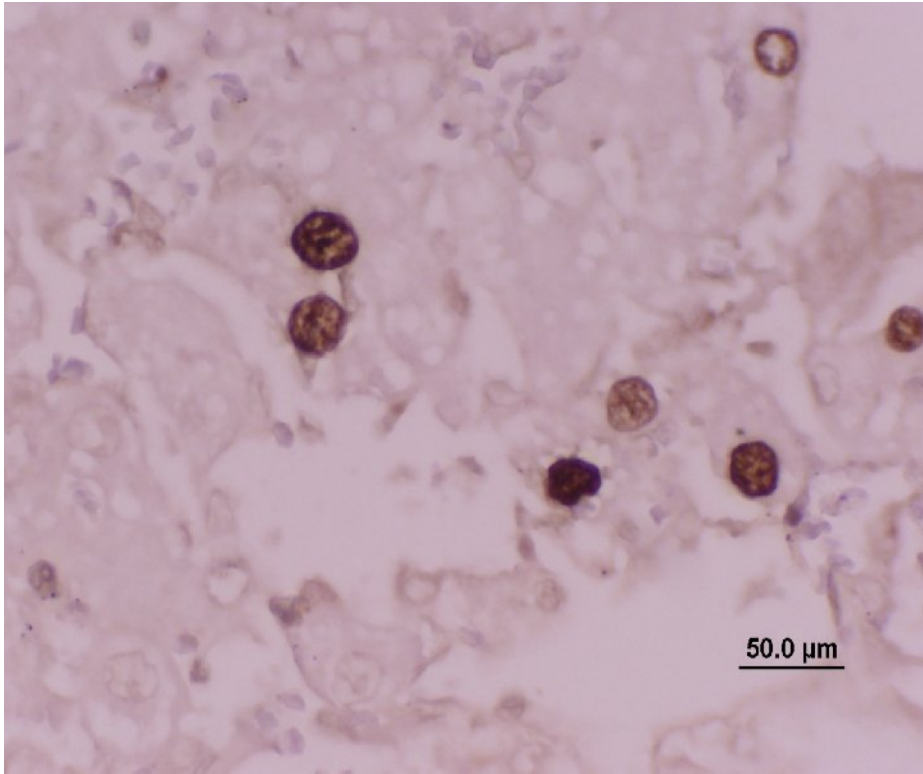
Işık mikroskobu ile her bir hayvana ait rastgele seçilmiş 25 parafin kesitte x40 objektif ile 50 alanda oküler mikrometresi yardımıyla kahverengi boyanmış apoptotik hücreler ve boyanmamış hücreler sayılmıştır. Gruplarda TUNEL boyama ile boyanan apoptotik hücreler aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir. (Şekil 4.12-4.16).



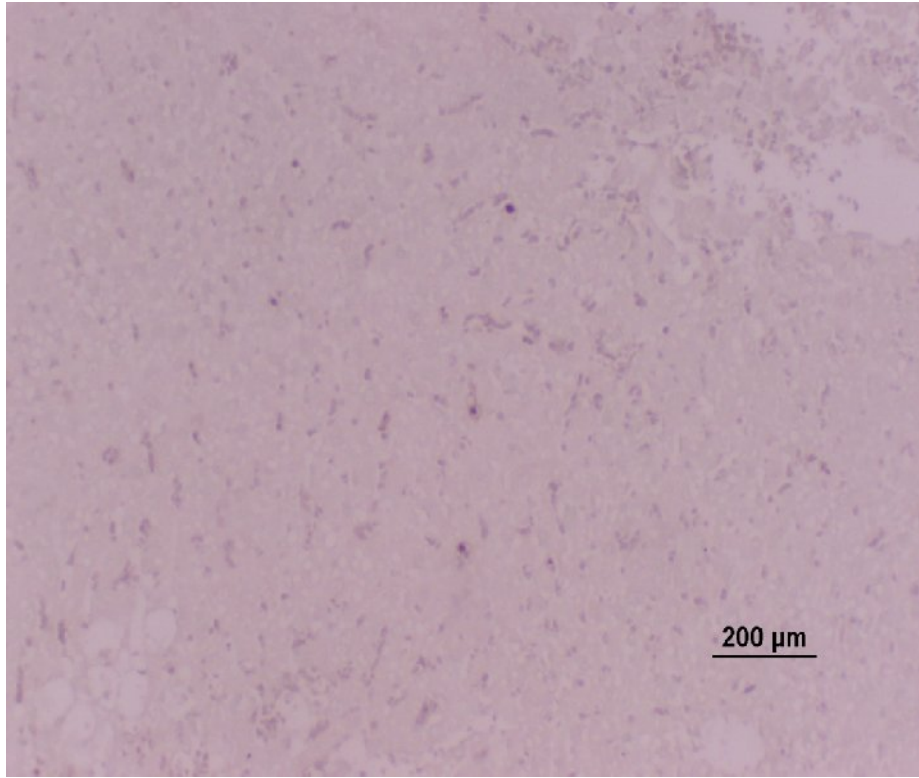
Şekil 4.12. Kontrol grubunda apoptotik bir hücrenin görünümü. TUNEL. Bar 50 µm.



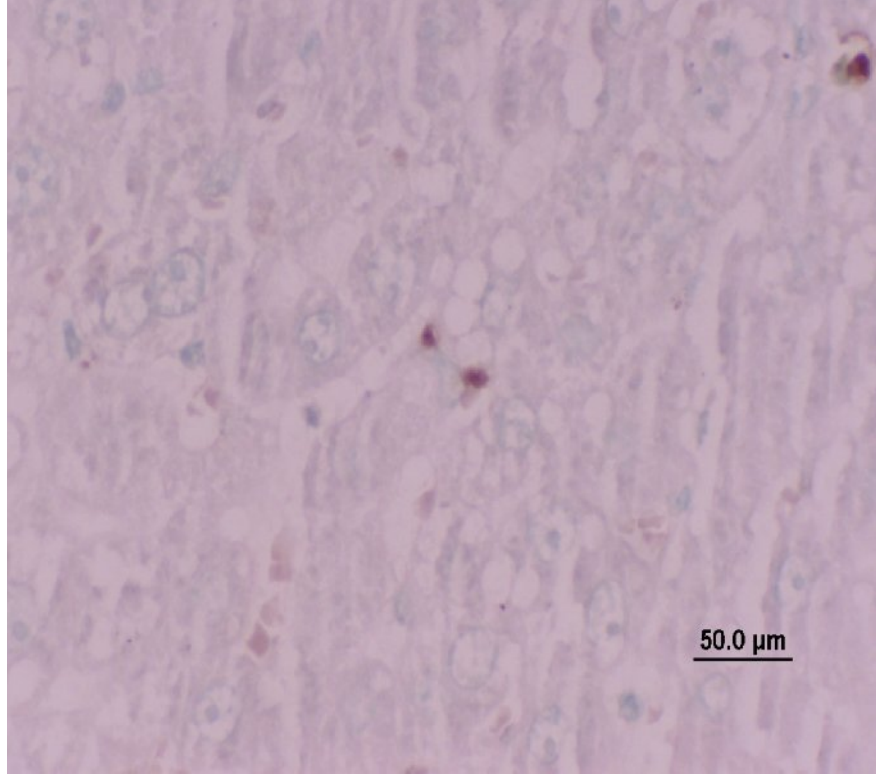
Şekil 4.13. I/R grubunda apoptotik hücreler I. TUNEL. Bar 500 µm.



Şekil 4.14. I/R grubunda apoptotik hücreler II. TUNEL. Bar 50 µm.



Şekil 4.15. I/R+*Rotenon* grubunda apoptotik hücreler I. TUNEL. Bar 200 μm.



Şekil 4.16. I/R+*Rotenon* grubunda apoptotik hücreler II. TUNEL. Bar 50 μm.

Ardından her bir sıçana ve daha sonra da her bir gruba ait apoptotik indeks; Apoptotik Hücre Sayısı / 50 olarak hesaplanmış ve bulgular Tablo 4.9 'de gösterilmiştir.

Tablo 4.9. Grupların Apoptotik Hücre Sayısı ve Apoptotik İndeks.

	Sıçan No.	Toplam Apoptotik Hücre Sayısı	Apoptotik İndeks (AI)	Grubun Ortalama Apoptotik İndeksi
KONTROL	1	33	0.66	0.66
	2	28	0.56	
	3	41	0.82	
	4	50	1	
	5	45	0.9	
	6	30	0.6	
	7	22	0.44	
	8	25	0.5	
	9	27	0.54	
	10	29	0.58	
I/R	1	231	4.62	6.83
	2	680	13.6	
	3	450	9.00	
	4	309	6.18	
	5	298	5.96	
	6	216	4.32	
	7	351	7.02	
	8	292	5.84	
	9	309	6.18	
	10	279	5.58	
Rotenon	1	121	2.42	2.01
	2	157	3.14	
	3	79	1.58	
	4	83	1.66	
	5	87	1.74	
	6	91	1.82	
	7	101	2.02	
	8	92	1.84	
	9	85	1.7	
	10	110	2.2	

Elde edilen bulgulara göre; I/R grubunda apoptotik indeks oldukça belirgin bir düzeyde gözlenmiştir. Buna karşılık; I/R+*Rotenon* grubunun apoptotik indeksinin azaldığı ve kontrol grubunun apoptotik indeks değerine yaklaştığı gözlenmiştir (Tablo 4.9).

5.TARTIŞMA

Birçok araştırmacı tarafından, hem karaciğer hasarındaki mekanizmaları ortaya koymaya yönelik hem de bu mekanizmaları önlemeye yönelik klinik ve deneysel çalışmalar yapılmaktadır.

Fizyolojik ya da birçok stres ve hasar tarafından başlatılan programlı hücre ölümü süreci olan apoptozisin, birçok sistemde uygun fonksiyon ve homeostazın devamı için önemli olduğu bilinmektedir (8). Apoptozis ile diğer dokularda olduğu gibi karaciğerde de hasar görmüş veya tehlike potansiyeli olan hücreler, çevreye zarar vermeksizin ortadan kaldırılır. Apoptozisin klasik tanımlaması otonomik ve programlı hücre intiharı olarak ifade edilebilir. Apoptozis, hücre dışı ve hücrenel seviyede oluşan çeşitli sinyaller yoluyla tetiklenebilir (51). Apoptozis büyüme faktör ya da hormon eksikliği, viral enfeksiyonlar, bakteriyel toksinler, ekzotoksinler, onkogenler, kemoterapötikler, radyasyon gibi bazı faktörler ile de başlatılabilir (52).

Deneysel karaciğer hasarı oluşturabilmek için günümüze kadar birçok model üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu modellerden birisi olan iskemi-reperfüzyon ile deneysel olarak karaciğer hasarı oluşturulması da yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (1, 53-56).

Dokuda kanlanmanın kesilmesine iskemi denir. Hücre ölümü ve organ yetmezliği ile birlikte olan iskemi genellikle dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının dolaşım tarafından sağlanamaması ve oluşan artık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması sonucu oluşur. Sonuçta akut hücrenel şişme, intertisyel ödem ve hücrenel disfonksiyon meydana gelir. Tekrar dokunun kanlanması sağlanamazsa sonunda hücrenel ölüm gerçekleşir. Kan akımının yeniden sağlanması yani reperfüzyon, iskemik dokunun iyileşebilmesi için ön koşuldur. Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu bir taraftan iskemi sırasında kaybolan bazı fonksiyonların geri gelmesini sağlarken bir taraftan da hücre kaybı devam ederek daha ileri hasarlara neden olmaktadır. Bu durum I/R hasarı olarak adlandırılan önemli bir klinik olaydır (12,17). I/R hasarının yaygın bir nekroz aracılığıyla oluştuğu düşünülür. Bu olayın mekanizması henüz tam aydınlatılmamış olmakla beraber arterlerin tıkanması ve reperfüzyonu sonucunda hasar mekanizmasında rol oynayan lokal ve sistemik kaynaklı serbest oksijen radikalleri, NO, transkripsiyon

faktörleri, serotonin ve pankreatik proteazlar gibi sitotoksik metabolitler salınır ve nötrofil ile endotel hücreler arasındaki etkileşim artar (1).

I/R'a bağlı doku hasarını başlatan en önemli faktör SOR'dir. Aerobik canlılar metabolizmaları sırasında fizyolojik olarak oksidatif strese maruz kalırlar. Dokuların tükettiği oksijenin büyük bir kısmı (%95) aerobik metabolizma için kullanılırken, %5'inin SOR'ne çevrildiği tahmin edilmektedir. Oksijenden üretilen en önemli reaktif türler arasında süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^\cdot), peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) vardır. Bu radikaller membran hasarı, DNA yıkımı, proteaz aktivasyonu, lipid ve protein peroksidasyonu, takiben apoptozis ve nekrozla sonuçlanan hücre ölümü meydana getirmektedirler (57). Oksijen hücre fonksiyonları için kritik bir öneme sahiptir. Oksijen yokluğu, anaerobik metabolizma ve lokal laktik asit konsantrasyonunun artışına neden olur. Meydana gelen asidoz, normal enzim kinetiklerini değiştirerek daha az sayıda yüksek enerjili fosfat bağı oluşumuna neden olur ve sonuçta hücre homeostazını devam ettirebilmek için gerekli olan enerjiden yoksun kalır (58). Dokular hipoksiye farklı sürelerde dayanıklılık gösterirler. Çizgili kaslar saatler süren iskemiden etkilenmezken, nöronal hasar iskemi oluşumundan sadece dakikalar sonra meydana gelmektedir (53). Önceki yapılan çalışmalar incelendiğinde iskemi ve reperfüzyon süreleri farklılık göstermektedir. Korosec ve Jezernik farklı iskemi sürelerini uygulayarak rat karaciğerinde meydana gelen erken sellüler ve ultrastrüktürel değişiklikleri araştırdıkları bir çalışmada, 30 dk iskemi sonucu parankimde sadece hücrelerde tek tek ayrılma, 120 dk iskemi sonrası ise dokuda irreversible değişiklikler meydana geldiğini bildirmişlerdir. 40 dk iskemi ve sonrasında 60 dk reperfüzyon uygulandığında ise parankimde hasarın daha belirgin olduğunu ve bu hasarın da reperfüzyon uygulanan gruplarda daha fazla olduğunu saptamışlardır. Ayrıca 1 saat iskemi uygulanmasının karaciğer hücrelerinin ATP içeriğinde %80 azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir (54).

Karaciğer iskemisi reperfüzyon hasarı karaciğer cerrahisi ve transplantasyonunun en bilindik komplikasyonlarından biridir. Karaciğer iskemisinde sekel oluşması riskini tanımlanması ve azaltılması için yeni çalışmalar yapılmaktadır. Saidi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ; ratların karaciğerine 75 dakikalık iskemi ve sonrasında 3 saatlik reperfüzyon uygulanmıştır. İskemi

oluşturmadan önce farelere intravenöz metilprednizolon veya normal salin verilmiştir. Hasar belirlenmesinde serumda AST, IL6 ve histopatolojik olarak hemotoksilen-eozin boyaları kullanılmıştır. Sonuç olarak; metilprednizolon uygulanmasının normal steatotik olmayan karaciğerlerde erken iskemik durumlarda etkili olduğu, ayrıca inflamatuvar cevabı karaciğerde azalttığı saptanmıştır(55).

Bizde bu bilgiler ışığında hazırladığımız deneysel modelde, iskemi-reperfüzyon oluşturulan karaciğerde rotenonun inflamasyona ve apoptoza etkisini araştırdık.

Rotenon mitokondrial elektron taşıma zinciri kompleks I'ı inhibe eden bir insektisitir. Kompleks I enzimi mitokondride elektron transport zincirinde rol oynayan ilk enzimdir ve mitokondride reaktif oksijen ürünlerinin oluşmasında önemli bir kaynaktır. Mitokondrial elektron transport inhibitörü olan *rotenon*, antioksidatif savunma mekanizmasında rol alır(11). Elektron transport zincirine kompleks I üzerinden giren NADH'deki elektronlar, ubikinona (UQ, koenzim Q) aktarılırlar. Ubikinonun tamamen indirgenmiş formu olan UQH₂, membranda kompleks I'den kompleks III'e difüze olur; kompleks III'te de UQH₂, okside form olan UQ formuna oksitlenir. Elektronların kompleks I yoluyla kompleks III'e akışı, protonların mitokondriyal matriksten membranlar arası boşluğa hareketiyle eşleşmiştir ki böylece bir proton gradienti oluşur; bu proton gradienti de mitokondriyal ATP sentezi için önemlidir. Kompleks I bir insektisit olan rotenone tarafından inhibe edilir. Sellüler respirasyonun genel bir inhibitörü olarak rol oynayarak, toksik aksiyonunu göstermektedir.(11).

Ichikawa ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; mitokondriyal elektron transport inhibitörü olan rotenonun antioksidatif defansının rat bağırsak iskemi reperfüzyonundaki etkisi araştırılmıştır. Farelerde bu iskemi 30 dakika boyunca superior mezenterik arterin obstruksiyonu ile oluşturulmuştur. Rotenon oral olarak iskemiden 2 saat önce verilmiştir. Sonuç olarak; Ichikawa ve arkadaşları intestinal mukozada I/R hasarını değerlendirdikleri çalışmalarında rotenon tedavisi alan grupta biyokimyasal analizler sonucunda hasarı meydana getiren ürünlerin iskemi grubuna oranla belirgin azaldığını göstermişler ve rotenonun bu olumlu etkisini lipid peroksidasyonunu inhibe ederek ve mukozal inflamasyonu azaltarak gösterdiğini

belirtmişlerdir . Reperfüzyon tedavisinde rotenon yeni bir tedavi yöntemi olarak önerilmiştir(56).

Ilan ve arkadaşları ratlarda hepatositlerdeki oksidatif stresi başlatan ajanlar içinde NO'in çok önemli rolü olduğunu vurgulamışlardır. Antioksidan tedavi ile hücre içi serbest oksijen radikallerinin anlamlı derecede düşürülebileceğini gösterdikleri çalışmalarında, antioksidan olarak rotenon ve buthiocine vermişler ve NO sentezinin azaldığını belirtmişlerdir. Bu etkiyi de serbest oksijen radikallerini arttırarak NOS enzimleri üzerindeki “down regülasyon” sayesinde yaptıklarını bildirmişlerdir (49).

Vanden Hoek ve arkadaşları kardiyomyosit hücrelerinde oksidatif stres sonucu meydana gelen hasarı kompleks 1 inhibitörleriyle azaltmaya çalışmışlar ve bu amaçla rotenon, siyanid ve antimisin kullanmışlar, sonuçta rotenonun diğer ajanlara göre daha etkili olduğunu göstermişlerdir (50). Biz de benzer olarak sıçanlarda karaciğer I/R hasarının rotenon tedavisiyle azaldığını gözlemledik.

Yaptığımız literatür taramasında antiapoptotik etkileri birçok kez gösterilen rotenonun, karaciğerdeki iskemik hasar sonucu gelişen apoptozise etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlayamadık. Bu bilgiler ışığında, biz de çalışmamızda iskemi-reperfüzyon ile karaciğer hasarı oluşturduğumuz ve apoptozisi indüklediğimiz sıçanlarda yine i.p. olarak tek doz rotenon uygulamasının karaciğer hasarına ve apoptozise etkilerini araştırdık. Karaciğerde oluşan hasarı belirlemek amacıyla, serumda AST, ALT, LDH ve MDA düzeylerini, doku örneklerinde ise TNF- α ve MDA düzeylerini, histopatolojik bulguları ve TUNEL boyama bulgularını inceledik.

Karaciğer hasarı oluşturulan diğer modellerde izlendiği gibi, serum transaminazlarının hepatosit hasarını göstermede duyarlılığı çok yüksektir. Transaminazlar normal hücre döngüsünü yansıtacak şekilde dolaşımda az miktarda bulunurken, transaminazlardan zengin dokuların etiyolojik faktörden bağımsız olarak zedelenmesinin sürdüğü tüm durumlarda serum seviyeleri yükselmiştir (2, 59).

Soya bitkisinin, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulmuş kronik karaciğer hasarı üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, hasar uygulanmasından sonraki 24. saatte elde edilen serum, ALT, AST, LDH ve dokuda da MDA düzeylerindeki artışla karaciğer hasarı değerlendirilmiştir (68). Benzer şekilde Chen ve arkadaşları

da yaptıkları deneysel karaciğer hasarının etkilerini serum AST, ALT, TNF- α ve doku MDA düzeylerindeki artışla değerlendirmişlerdir (60).

Bizim çalışmamızda da karaciğerde inflamatuvar süreci ve hücre yıkımını gösteren en güvenilir parametrelerden olan, serum ALT, AST ve LDH düzeylerinin her biri serumda karaciğer hasarı ile birlikte kontrol grubuna göre anlamlı olacak düzeyde artmıştır ve rotenon tedavisi ile birlikte gerileyerek I/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha düşük saptanmıştır. Bu durum rotenonun karaciğer hasarını azalttığı şeklinde yorumlanabilir.

Hepatosellüler hasarın anlaşılmasının merkezinde inflamatuvar hücrelerden salınan sitokinler ve reaktif oksijen ürünleri yer alır. Günümüze dek karaciğer hasarının, hepatositlerdeki biyolojik ajan veya toksinlerin direkt biyokimyasal etkilerinden kaynaklandığı düşünülmekteydi, artık karaciğer hasarının çok büyük kısmının inflamatuvar hücrelerin ürünleriyle tetiklendiği bilinmektedir. Hücresel düzeyde etkili ana fizyolojik aktivatörler, Fas Ligant (FasL) ve Tümör Nekrozis Faktör (TNF) isimli proteinlerdir. Ölüm faktörü olarak da adlandırılan bu proteinlerin, ilgili reseptörlerine bağlanması ile hücre ölümü gerçekleşir (52). Proapoptotik sitokinler arasında, toksikasyon ile indüklenen karaciğer hasarının ve apoptozisin baskın medyatörü TNF- α 'dır (61). Birçok çalışmada artan TNF- α stimülasyonunun hücre ölümünden sorumlu olduğu gösterilmiştir (62). TNF- α 'nın proapoptotik etkileri ve dolayısıyla hücre ölümünü arttıran etkileri nedeniyle geçmişte sistemik antikanser kemoterapi tedavisi denenmiş ancak teropatik doza ulaşmadan ortaya çıkan ciddi yan etkilerinden dolayı bu tedavi yönteminden vazgeçilmiştir. En önemli yan etkilerinden birinin karaciğer hücre hasarına bağlı serum transaminazları ve bilirubin düzeylerindeki artış olduğu görülmüştür (63).

Osawa ve arkadaşları X- ray ile indüklenen ve immediate early response factor-1 (IEX-1) olarak isimlendirilen proapoptotik bir geni tariflemişlerdir. Hepatik hasarla birlikte TNF- α düzeyindeki artışın bu geni indüklediğini ve böylece apoptotik yolların aktive olarak hepatik hücrelerde apoptozisin arttığını göstermişlerdir (64).

Birçok çalışmada, TNF- α düzeylerindeki artış viral hepatitler, alkolik karaciğer hastalığı ve fulminan hepatik yetmezlikle ilişkilendirilmiştir (65). Sheron ve ark, yaptıkları bir çalışmada bu hastalıklardan ölen kişilerin TNF- α düzeylerinin, iyileşen hastaların TNF- α düzeylerinden daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (66).

TNF- α 'nın kronik hepatit B ve C infeksiyonlarında da rol sahibi olduğu düşünülmektedir. Her iki virüs te karaciğerde TNF- α salınımını arttırmaktadır (67). Artan TNF- α düzeyleri alkolik ve nonalkolik steatohepatitle de ilişkilendirilmektedir, hasar TNF- α 'nın hepatik sentezini arttırarak etkili olurken; TNF- α da diğer sitokinlerin hepatik sentezini arttırarak etki eder (68). Yapılan bir çalışmaya göre alkolik hepatitli hastalarda serum TNF- α düzeyleri artmaktadır ve bu artış hastanın sağkalımı ile ters orantılı olarak seyretmektedir (67).

Feldstein ve ark, alkolik olmayan steohepatitli hastalarla yaptığı klinik çalışmalarında TNF- α reseptörlerinin ekspresyonun arttığını ve buna bağlı olarak oksidatif stres ve artmış apoptozis reseptör aktivasyonun bu hastalıktaki hepatosellüler hasara neden olduğunu göstermişlerdir (69).

Streetz ve arkadaşları yaptıkları in-vitro bir çalışma ile TNF- α reseptörlerinin TNF- α sinyal yolları ile etkileşiminin inhibe edilmesiyle apoptozisin engellenebileceğini ve böylece karaciğer hasarının azaltılabileceğini göstermişlerdir (70).

Robert ve ark, in-vitro çalışmalarında yaptıkları karaciğer hücre hasarıyla apoptozisi indüklemişler ve buna paralel olarak TNF- α düzeylerindeki artışı göstermişlerdir. Ardından farmakolojik Lityum Klorür (LiCl) tedavisi ile karaciğer hücrelerindeki apoptozisin azaldığını ve TNF- α düzeylerindeki buna paralel olarak gerilediğini immünhistokimyasal yöntemlerle göstermişlerdir (71).

Veal ve ark, lipopolisakkaritlerle TNF- α stimülasyonunu arttırarak oluşturdukları in-vitro karaciğer hasarında, karaciğeri koruyucu birçok özelliği olduğu bilinen *S-adenosylmethionine* (SAM)'in hepatik makrofajlardan TNF- α salınımını azaltarak bu etkiyi sağladığını göstermişlerdir (72).

Karaciğer hasarı oluşturulan diğer modellerde olduğu gibi bizim çalışmamızda da serum ve dokuda inflamatuvar sürecin ve apoptozisin parametresi olan TNF- α düzeyinin kontrol grubuna göre artmış olması oluşturulan karaciğer hasarından dokunun etkilendiğini göstermektedir. Artan TNF- α düzeyleri rotenon tedavisi ile birlikte, rotenon verilmeyen I/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha düşük saptanmıştır. Bu durum rotenonun apoptozisi ve dolayısıyla karaciğer hasarını azalttığı şeklinde açıklanabilir.

İ/R hasarı sonucu oluşan serbest radikallerin en önemli hedef yapılarından biri

de lipidlerdir (2,7). Lipid peroksidasyonun karaciğer hasarında anahtar faktörlerden biri olduğu araştırmacılar tarafından kabul edilmektedir (73). Serbest oksijen radikalleri çoklu doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen atomu alarak lipid peroksidasyonunu başlatır ve sonuçta hidroperoksitler oluşur. Bu reaksiyonlar sonucunda hücre membranı akışkanlığını yitirir ve membran bütünlüğü bozulur. Bu durum hücre fraksiyonlarının çevreye salıverilmesine ve hücre ölümüne yol açar. Diğer taraftan çevreye salıverilen bu subsellüler yapılar inflamatuvar olayları tetikler ve hasarı daha da kötüleştirir (74). Dokuda lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak farklı metodlar kullanılmaktadır. Bu metodların en çok kullanılanlardan biri de dien konjugatları olan malondialdehit tayinidir (75-78). Bizim çalışmamızda da oksidan hasarın parametresi ve lipid peroksidazın bir ürünü olan MDA konsantrasyonu serumda ve karaciğer dokusunda, I/R ile hasar oluşturulan grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselmiş ve bu da dokuda hasarın oluştuğunu açık olarak göstermiştir.

Gruplar H&E boyama sonrası mikroskopik olarak incelendiğinde I/R grubundaki incelemede konjesyonun sentral vende orta düzeyde, portal alan ve sinuzoidlerde şiddetli olduğunu ve kontrol grubuna göre arttığını gözledik. Yine kontrol grubundaki hepatositlerde rastlamadığımız balonlaşma dejenerasyonunu, PMNL ve MNL infiltrasyonunun hasar yapılan grupta arttığını izledik. Ayrıca kontrol grubunda göremediğimiz hücre nükleuslarındaki karyoliz ve piknozu, intersellüler sınır kaybını ve hepatik kordlarda bozulmayı hasar yaptığımız grupta izledik.

Bizde yaptığımız TUNEL boyaması sonrası apoptozisi değerlendirdiğimizde iskemik hasar yapılan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış apoptotik hücre gözledik. İskemik hasar yapılan grupta artan TNF- α düzeyine paralel olarak apoptotik indeksinde kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla olduğunu hesapladık. Tüm bu bulgular bizim uyguladığımız iskemi sonucu karaciğerde bir hasar başladığını ve apoptozisi arttırdığını göstermektedir.

İskemik hasar yapılan gruba rotenon verilmesiyle birlikte sentral ven ve portal alandaki konjesyon açısından I/R grubu ve rotenon verilen grup arasında bir fark gözlenmezken, rotenon verilen grupta sinüzoidal konjesyonda I/R grubundakine

göre bir azalma gözlenmiştir. MNL infiltrasyonu açısından sentral ven ve sinuzoidlerde bir farklılık gözlenmezken, portal alandaki MNL infiltrasyonunda rotenon verilen grupta, I/R grubuna göre bir azalma gözlenmiştir. PMNL infiltrasyonunda rotenon verilen grupta, I/R grubuna göre bir azalma gözlenmiştir. Karyoliz ve piknoz, intersellüler sınır kaybı ve hepatik kordlarda bozulma açısından rotenon verilen grupta, I/R grubuna göre bir azalma gözlenmiştir.

Yaptığımız TUNEL boyama sonucunda elde ettiğimiz bulgularda aynı doğrultuda olup iskemik hasar yapılan I/R grubunda istatistiksel olarak anlamlı oranda artmış olan apoptotik indeks, rotenon tedavisi ile birlikte istatistiksel olarak anlamlı oranda gerileyerek kontrol grubuna yaklaşmıştır. Bu gözlemler ışığında, rotenon varlığında karaciğerde hasar sonucu oluşan tüm histopatolojik skorların ve apoptotik indeksin azalmaya başladığı gösterilmiştir.

Nianyu Li ve arkadaşlarının yaptığı HLA-60 hücrelerindeki invitro çalışmada; mitokondriyel solunum zinciri inhibitörü rotenonun apoptozisi uyarması onun reaktif oksijen türlerinin oluşumuyla yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir(79).

Bizim çalışmamızın sonuçlarından da anlaşılacağı üzere apoptotik sürecin iskemi-reperfüzyon ile aktivasyonu, hem serum ve karaciğer dokusundaki ALT, AST, LDH, TNF- α ve MDA düzeylerinin artışına hem de karaciğer dokusundaki apoptotik indeksin artışına paralel olarak belirgin hepatosellüler hasara neden olmuştur. Yapılan çalışmalarda, apoptotik sinyal yollarının aşırı aktivasyonu ve oksidan hasarın artması nedeni karaciğer hasarının tedavisi apoptozis sinyal yollarının inhibisyonuna ve antioksidan etkinliğe dayandırılmıştır. Bizim de bu nedenle, antiapoptotik ve antioksidan etkilerini bildiğimiz rotenonu tedavi amacıyla kullandığımız çalışmamızda; rotenon, karaciğer dokusundaki TNF- α düzeylerinin artışını ve karaciğer dokusundaki apoptotik indeksin artışını gerileyerek antiapoptotik etkinliğini ayrıca serum ve karaciğer dokusundaki MDA düzeylerinin artışını gerileyerek de antioksidan etkinliğini göstermiştir. Bu modelde oluşturduğumuz karaciğer hasarında, rotenonun anti-apoptotik ve antioksidan etkinliği gösterilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

a. Çalışmamızda serum AST düzeylerine bakıldığında; I/R+rotenon tedavi grubu, I/R grubundan anlamlı düzeyde farklıdır ($p < 0,05$). I/R grubu kontrol grubundan anlamlı düzeyde farklı bulundu ($p < 0,001$).

b. Serum ALT düzeylerine bakıldığında; kontrol ve I/R+rotenon tedavi grubu arasında anlamlı düzeyde fark vardır ($p < 0,05$). I/R grubu, kontrol ve I/R+rotenon tedavi grubundan anlamlı düzeyde farklı bulundu ($p < 0,001$).

c. Serum LDH düzeylerine bakıldığında; I/R grubu, kontrol ve I/R+rotenon tedavi grubundan anlamlı düzeyde farklı bulundu ($p < 0,001$).

d. Çalışmamızda serum MDA düzeylerine bakıldığında; I/R grubu, kontrol ve I/R+rotenon tedavi grubundan anlamlı düzeyde farklı bulundu ($p < 0,01$).

e. Doku TNF- α düzeylerine bakıldığında; I/R grubu, kontrol ve I/R+rotenon tedavi grubundan anlamlı düzeyde farklı bulundu ($p < 0,05$).

f. Çalışmamızda doku MDA düzeylerine bakıldığında; I/R grubu, kontrol ve I/R+rotenon tedavi grubundan anlamlı düzeyde farklı bulundu ($p < 0,05$).

g. H&E boyamada iskemik karaciğer hasarının patolojik bulguları olan ve I/R grubunda izlenen sentral ven, portal alan ve sinuzoidlerde konjesyon, PMNL ve MNL infiltrasyonu, hücre nükleuslarındaki karyoliz ve piknoz, intersellüler sınır kaybı ve hepatik kordlarda bozulma rotenon tedavisi ile birlikte I/R+rotenon grubunda gerilemiştir.

h. Çalışmamızda TUNEL boyama sonucu elde ettiğimiz doku apoptotik hücre sayılarına bakıldığında; I/R grubu, kontrol ve I/R+rotenon grubundan da anlamlı düzeyde farklı bulundu ($p < 0,05$).

Apoptozis sinyal yollarının inhibisyonu veya aktivasyonu için hücre tipine spesifik stratejilerle karaciğer hastalıklarının tedavisinde ileri aşamalar kaydedilebilir.

Apoptozis yollarının modülasyonunu hedefleyen yeni ilaçlar, çevreleyen sağlıklı dokuları yan etkilerden korumak için bir hücre popülasyonuna yönlendirilebilir.

Günlük uygulama içerisinde I/R tıbbın pek çok alanında karşılaşılan bir olaydır. Şok, yanık, sepsis, pankreatit, serebrovasküler olaylar, miyokard infarktüsü, travma ve travma cerrahisi, ortopedik cerrahi, kardiyovasküler cerrahi,

transplantasyon cerrahisi İ/R olayının görüldüğü durumlardan sadece bazılarıdır. Pratikte bütün cerrahi işlemler sırasında dokuların iskemisi ve bunu takiben bir reperfüzyon periyodu vardır. Karaciğer İ/R hasarı ise, karaciğer transplantasyonu ve hepatik rezeksiyon sırasında uygulanan pringle manevrası veya hemorajik şok sonrasında görülen primer hepatik disfonksiyon veya yetmezlikten sorumludur. *Rotenon* da antioksidan ve antiapoptotik etkilerinden dolayı karaciğer I/R hasarını ortadan kaldırmak amacıyla klinik kullanıma girebilir.

KAYNAKLAR

1. Vinas JL, Sola A, Genesca M, Alfaro V, Pi F, Hotter G. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia/ reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40(6):992-1003.
2. McMillen MA, Huribal M, Sumpio B. Common pathway endothelial leukocyte interaction in shock, ischemia and reperfusion. *Am J Surg.* 1993;166(5):557–62.
3. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol.* 1986; 250(6):749–53.
4. Levin RM, Leggett R, Whitbeck C, Horan P. Effect of calcium and calcium chelator on the response of the hepatocellular in vitro ischaemia. *Br J Physiol.* 1998;82(6):882–7.
5. Ohnishi N, Liu SP, Horan P, Levin RM. Effect of repetitive stimulation on the contractile response of rabbit urinary bladder subjected to in vitro hypoxia or in vitro ischemia followed by reoxygenation. *Pharmacology.* 1998;57(3):139–47.
6. Wang JH, Chen HS, Wang T, Tian KL, Diao YF, Role of oxygen-derived free radicals in superior mesenteric artery occlusion shock in rats. *Chin Med J (Engl)* 1990;103(4):278-82.
7. Boll M, Weber LWD, Becker E, Stampfl A. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. *Z Naturforsch.* 2001; 56:649- 659.
8. Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J.* 1999; 13:155–68.
9. Alison M, Sarraf E . Liver cell death: patterns and mechanisms. *Gut* 1994; 35; 577-581.
10. Torre F, Bellis L, Delfino A. Peripheral blood serum markers for apoptosis and liver fibrosis:Are they trustworthy indicators of liver realness. *Digestive and Liver Disease.* 2008; 441–445.
11. Feldkamp T, Kribben A, Roeser NF, Senter RA, Kemner S, Venkatachalam MA, Nissim I, Weinberg JM. Preservation of complex I function during

- hypoxiareoxygenation- induced mitochondrial injury in proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;286(4):749-59.
12. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British J of Surgery.* 1994;81:637–647.
 13. Lin E, Lowry SF, Calvano SE. The systemic response to injury. In: Schwartz SI, ed. *Principles of Surgery.* 7th Edition, Volume 1. New York: Mc Graw-Hill; 1999.p.13–32.
 14. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. *Circ Res.* 2000;86:117–8.
 15. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 2000;39:1529–42.
 16. Aker H. Hücre zedelenmesi, ölümü ve adaptasyonu. Çeviri: Çevikbas U. *Temel Patoloji.* İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2000.s.6–12.
 17. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am.* 1992;72(1):65–83.
 18. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985;312(3):159-63.
 19. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 2000;190:255–66.
 20. Horton JW, Walker PB. Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischaemia and reperfusion. *J Appl Physiol.* 1993;74(4):1515–20.
 21. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The “no-reflow” phenomenon after temporary coronary occlusion in dog. *J Clin Invest.* 1974;54(6):1496–508.
 22. Quiñones-Baldrich WJ, Chervu A, Hernandez JJ, Colburn M, Moore WS. Skeletal muscle function after ischemia: "no reflow" versus reperfusion injury. *J Surg Res.* 1991;51(1):5–12.
 23. Mangino MJ, Anderson CB, Murphy MK, Brunt E, Turk J. Mucosal arachidonate metabolism and intestinal ischemia–reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1989; 257(2):299–307.

24. Hatanaka N, Kamike W, Shimizu S, Miyata M, Inoue T, Yoshida Y, Tagawa K, Matsuda H. Ca²⁺ release from mitochondria induces cytosolic enzyme leakage in anoxic liver. *J Surg Res.* 1995; 58(5):485–90.
25. Shibasaki F, McKeon F. Calcineurin functions in Ca(2+)-activated cell death in mammalian cells. *J Cell Biol* 1995;131(3):735–43.
26. Parr Dr, Wimshurst JM, Harris EJ. Calcium-induced damage of rat heart mitochondria. *Cardiovasc Res.* 1975;9(3):366-72.
27. Steenbergen C, Murphy E, Watts JA, London RE. Correlation between cytosolic free calcium contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res.* 1990;66(1):135-46.
28. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ: Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1997;14(3):195-203.
29. Parvums DV. The pathology of ischemia-reperfusion. In: Grace PA, Mathie RT, eds. *Ischemia-Reperfusion Injury.* London: Blackwell Science. 1999.p. 3–19, is preserved in adhesion molecule deficient mice. *Am J Physiol.* 1997;273(6 Pt 2):2721–5.
30. Jerome SN, Kong L, Korthuis RJ. Microvascular dysfunction in postischemic skeletal muscle. *J Invest Surg.* 1994;7(1):3–16.
31. Bathe OF, Chow AWC, Phang PT. Splachnic origin of cytokines in a porcine model of mesenteric ischemia-reperfusion. *Surgery.* 1998;123(1):79–88.
32. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1988;255(6 Pt 2):1269–75.
33. Thompson CB. Apoptosis. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology.* Lippincott-Raven Publishers. 1999; 342-346.
34. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today.* 1993; 14:126–130.
35. Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: A new skin for the old ceremony? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 266:699-717.
36. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell.* 1999; 96:245–254.

37. Cooper GM. Programmed cell death. *The cell*. In: Cooper GM ed. Washington: ASM Pres;1994; 14:592–596.
38. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997;88: 355–65.
39. Perkins AS, Stern DF. Apoptosis. In: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. *Cancer Principle and Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1997:96–100.
40. Gavrieli Y, Sherman Y, Sasson SAB. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*. 1992; 119: 493–501.
41. Wyllie AH. What is apoptosis? *Histopathology*. 1986; 10: 995–998.
42. Kam PC, Ferch N. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia*, 2000;15: 1081-1093.
43. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis. *Pathology Annual*. 1982;17: 229–259.
44. Ferraz J, Tgley A. TNF-alpha contributes to the pathogenesis of ethanol-induced gastric damage in cirrhotic rats. *Am J Physiol*. 1997; 272:809-14.
45. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in human disease. *J Intern Med*. 2005; 258:479-517.
46. Wyllie AH. The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin Genet Dev*. 1995; 5:97–104.
47. Feldkamp T, Kribben A, Roeser NF, Senter RA, Kemner S, Venkatachalam MA, Nissim I, Weinberg JM. Preservation of complex I function during hypoxiareoxygenation- induced mitochondrial injury in proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286(4):749-59.
48. Ichikawa H, Tagaki T, Uchiyama K, Higashihara H, Katada K, Isozaki Y, Naito Y, Yoshida N, Yoshikava T. Rotenone, a mitochondrial electron transport inhibitor, ameliorates ischemia-reperfusion-induced intestinal mucosal damage in rats. *Redox Rep*. 2004;9(6):313-6.
49. Ilan E, Tirosh O, Madar Z. Triacylglycerol-mediated oxidative stress inhibits nitric oxide production in rat isolated hepatocytes. *J Nutr*. 2005;135(9):2090-5.

50. Vanden Hoek TL, Shao Z, Li C, Schumacker PT, Becker LB. Mitochondrial electron transport can become a significant source of oxidative injury in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29(9):2441-50.
51. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995; 267:1456–1462.
52. Lewin B. Apoptosis. In: Lewin B (ed). *Genes VI*, New York: Oxford University Press. 1997; 36:1122–1129.
53. Chervu A, Moore WS, Homsher E, Quinones-Baldrich WJ. Differential recovery of skeletal muscle and peripheral nerve function after ischemia and reperfusion. *J Surg Res.* 1987;47(1):12-9.
54. Korosec P, Jezernik K. Early cellular and ultrastructural response of the Mouse liver to ischemia. *Virchows Arch.* 2000;436(4): 377–83.
55. Reza F, Jennifer C, Steve V, Steve B, İlke N, Volkan A, Michael J.J. The effect of methylprednisolone on warm ischemia-reperfusion injury in the liver. *The American Journal of Surgery.* 2007;193(3):345-348.
56. Ichikawa H, Tagaki T, Uchiyama K, Higashihara H, Katada K, Isozaki Y, Naito Y, Yoshida N, Yoshikava T. Rotenone, a mitochondrial electron transport inhibitor, ameliorates ischemia-reperfusion-induced intestinal mucosal damage in rats. *Redox Rep.* 2004;9(6):313-6.
57. Sahna E, Deniz E, Aksulu HE. Myocardial ischemia-reperfusion injury and melatonin. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2006;6(2):163–8.
58. Rhodens RS, DePalma RG. Mitochondrial dysfunction of the liver and hypoglycemia in hemorrhagic shock. *Surg Gynecol Obstet.* 1980;150(3):347-52.
59. Kömüroğlu U, Noyan T, Şekeroglu R: Karbon Tetraklorür İle Karaciğer Toksikitesi Oluşturulan Farelerde Melatonin ve Pentoksifilin Serum Lipidleri Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması. *Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci.* 2007; 19:21-26.
60. Wu Y, Wang F, Zheng Q: Hepatoprotective effect of total flavonoids from *Laggera alata* against carbon tetrachloride-induced injury in primary cultured neonatal rat hepatocytes and in rats with hepatic damage. *Journal of Biomedical Science.* 2006; 13:569–578.

61. Robert F, David A. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF- α Induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 290: 583–589.
62. Nathan W, Guicciardi M, Steven F and Gregory J. Tumor necrosis factor- α -associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002; 283: 947–956.
63. Schattenberg JM, Galle PR, Schuchmann M. Apoptosis in liver disease. *Liver International* 2006; 26: 904-911.
64. Expression of the NF- κ B Target Gene X-Ray-Inducible Immediate Early Response Factor-1 Short Enhances TNF- α Induced Hepatocyte Apoptosis by Inhibiting Akt Activation. Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Brenner A, Nozawa Y, Moriwaki H. *J. Immunol.* 2003; 170: 4053-4060.
65. Muto Y, Nouri-Aria T, Meager A, et al. Enhanced tumour necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. *Lancet.* 1998; 352: 72–74.
66. Sheron N, Goka J and Williams R. Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Ann. Intern. Med.* 1990; 112: 917–920.
67. Cynthia A, Michael P, David A. Brenner, and Christian Trautwein. Mechanisms of Hepatic Toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am. J. Physiol.* 1998; 275: 387–392.
68. Diehl A et al. Nonalcoholic Steatohepatitis. *Seminars in Liver Diseases.* 1999; 19:221-229.
69. Feldstein A, Canbay A, Angulo P. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2003; 125: 437–43.
70. Streetz K, Leifeld L, Grundmann D. Tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. *Gastroenterology.* 2000; 119:446-60.
71. Robert F, David A. Role of glycogen synthase kinase-3 in TNF- α induced NF- κ B activation and apoptosis in hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002; 283: 204–211.

72. Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated TNF- α promoter activity by S-adenosylmethionine and 5'-methylthioadenosine. N. Veal, L. Hsieh, S. Xiong, J. Mato, S. Lu and H. Tsukamoto. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 287:352-362.
73. Jaeschke H., Smith C. W., Clemens M.G., Ganey P. A., Roth R. A.: Mechanism of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996; 139: 213-226.
74. Tappel A. L.: Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.* 1973; 32: 1870-1874.
75. Tandon S, Singh S, Prasad S, Khandekar K, Dwivedi V. Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat. *Toxicology Letters.* 2003; 145: 211–217.
76. Bujanda L, Hijona E, Larzabal M, Beraza M, Aldazabal P, Urkia G. Resveratrol inhibits nonalcoholic fatty liver disease in rats. *BMC Gastroenterology.* 2008; 8:40.
77. Oxidative Stress of Liver in Hamsters Infected with *Leishmania Chagasi* Oliveira A, Cecchini R. *Journal of Parasitology.* 2000; 86:1067-1072.
78. Murray R.K., Dropper H.H.: Comparative studies on different methods of monoaldehyde determination. *Meth. Enzymol.* 1984; 105:299-305.
79. Nianyu L, Kathy R, Gretchen L, Jennie S, Bartek R. Mitochondrial complex 1 inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *The Journal of Biological Chemistry.* 2003; 278:8516-8525.