



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

REKOMBİNANT İNSAN ERİTROPOETİN
VE
2-MERKAPTOETAN SÜLFONAT'IN
KARACİĞER İSKEMİ-REPERFÜZYON
HASARI ÜZERİNE SİNERJİK
KORUYUCU ETKİSİ

Dr. Pınar TAŞAR

UZMANLIK TEZİ

Bursa – 2007



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

REKOMBİNANT İNSAN ERİTROPOETİN
VE
2-MERKAPTOETAN SÜLFONAT'IN
KARACİĞER İSKEMİ-REPERFÜZYON
HASARI ÜZERİNE SİNERJİK
KORUYUCU ETKİSİ

Dr. Pınar TAŞAR

Danışman: Prof. Dr. Yılmaz ÖZEN

UZMANLIK TEZİ

Bursa – 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
SUMMARY	iii
GİRİŞ	1
GEREÇ VE YÖNTEM	9
BULGULAR	12
TARTIŞMA VE SONUÇ	22
KAYNAKLAR	29
TEŞEKKÜR	33
ÖZGEÇMİŞ	34

ÖZET

Amaç: Karaciğer cerrahisi ve transplantasyonda önemli mortalite ve morbidite nedenlerinden biri iskemi-reperfüzyon hasarıdır. Bu çalışmada, rekombinant insan eritropoetin(rhEPO) ve 2-Merkaptoetan sülfonatın(MESNA) beraber uygulanmasının karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine koruyucu etkisi araştırılmıştır.

Gereç ve yöntem: Dişi Wister albino sıçanlara 30 dakika hepatik iskemi ve iskemiye takiben 2 saatlik reperfüzyon uygulandı. İskemiden 5 dak. önce 1000IU/kg rhEPO ve iskemiden 15 dak. önce 150mg/kg MESNA yalnız ve kombine biçimde intraperitoneal uygulandı. Reperfüzyon sonunda karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmek için serumda aspartat aminotransferaz(AST), alanin aminotransferaz(ALT), laktat dehidrogenaz(LDH) ve γ -glutamil transferaza(γ -GT) bakıldı. İskemi-reperfüzyon hasarında lipid peroksidasyonunu gösteren malondialdehid(MDA) alınan serum örneklerinde ölçüldü. Sıçanların karaciğerden alınan doku örneklerindeki patolojik değişiklikler incelendi.

Bulgular: Plazma AST, ALT, LDH ve γ -GT seviyeleri kontrol grubunda çok yüksek bulundu. Özellikle rhEPO grubu olmak üzere AST ve ALT değerlerinde normal sınır aralığına giren ölçümler alındı. MESNA ve rhEPO tedavisinin beraber verildiği kombine grupta karaciğer dokusunda parankimal değişiklikler az görüldü. Nekroza ise çoğu doku örneğinde rastlanmadı.

Sonuç: Oksidatif hasarı önlemede rhEPO uygulaması, MESNA tedavisine göre belirgin daha etkilidir. Bu iki ajanın beraber kullanımı ile karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarında daha anlamlı koruyucu etki elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: İskemi-reperfüzyon, karaciğer, rekombinant insan eritropoetin, 2-Merkaptoetan sülfonat.

SUMMARY

SYNERJIC PROTECTIVE EFFECTS OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN AND 2-MERCAPTOETHANE SULFONATE ON LIVER ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY

Aim: One of the important causes on mortality and morbidity in liver surgery and transplantation is ischemia-reperfusion injury. The protective effects of recombinant human erythropoietin (rhEPO) and 2-Mercaptoethane sulfonate (MESNA), when applied together, on the injury of ischemia-reperfusion has been investigated in this study.

Material and Method: Female Wistar-Albino rats have been applied for 30 minutes duration hepatic ischemia and after that for 2 hours long reperfusion. 5 minutes before ischemia 1000 IU/kg rhEPO, and 15 minutes before ischemia 150 mg/kg MESNA alone and combined were administered intraperitoneally. At the end of the reperfusion, for estimating liver functions, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH) and gamma-glutamyl transferase (γ -GT) serum levels were measured. Malondialdehyde (MDA), which is the main indicative of lipid peroxidation in ischemia-reperfusion injury, was measured. Histological changes in tissue samples taken from rats' liver, were also evaluated.

Results: It is found that plasma ALT, AST, LDH and γ -GT levels were very high in control groups. AST and ALT levels –especially for rhEPO group– were in the range of normal limits. In the combined group, which has been given MESNA and rhEPO treatment together, parankimal alterations in liver tissue were less significant and necrosis did not occur.

Conclusion : It is clear that rhEPO treatment is quite more effective than MESNA treatment in order to prevent oxidative injury. The combination of

these two agents has obvious protective effect biochemically, and significant tissue protection hystologically in ischemia-reperfusion injury.

Key Words : Ischemia-reperfusion, liver, human recombinant erythropoietin, 2-Mercaptoethane sulfonate.

GİRİŞ

İskemi-reperfüzyon(I/R) hasarı, belli bir süre iskemik halde kalmış dokulara yeniden kan dolaşımı sağlanmasının ardından bu dokularda meydana gelen hasardır. Bu durum, doku ve organlarda oksijen bağımlı hücreleri(kalp, karaciğer, böbrek, barsak ve beyin gibi) etkilemektedir. I/R hasarı, geniş hepatik rezeksiyonlar, travmalar, transplantasyon, şok ve sepsis gibi güncel tıp uygulama alanlarında sıklıkla karşılaşılan ve ciddi problemlere yol açabilen bir sorun olmaya devam etmektedir. Karaciğer cerrahisi ve transplantasyonunda da ortaya çıkan morbidite ve mortalitenin nedenleri arasında I/R hasarının önemli bir yeri vardır(1). İskemi sonrası kan dolaşımı yeniden sağlanan karaciğerde iskeminin yarattığı hasardan çok daha büyük hasar dokuya oksijenin yeniden gelmesinin ardından oluşmaktadır. Hem iskemi hem de reperfüzyon çok sayıda ve birbiriyle yakın ilişkili karmaşık enflamatuvar olaylara yol açarlar. Bu gelişmeler ise yaygın hücre ölümü ve organ yetmezliğine yol açar. Hasarın şiddeti, iskeminin şiddeti ve süresinin yanında önceden varolan steatoz ve fibrozis gibi hasarların varlığıyla da yakından ilişkilidir.

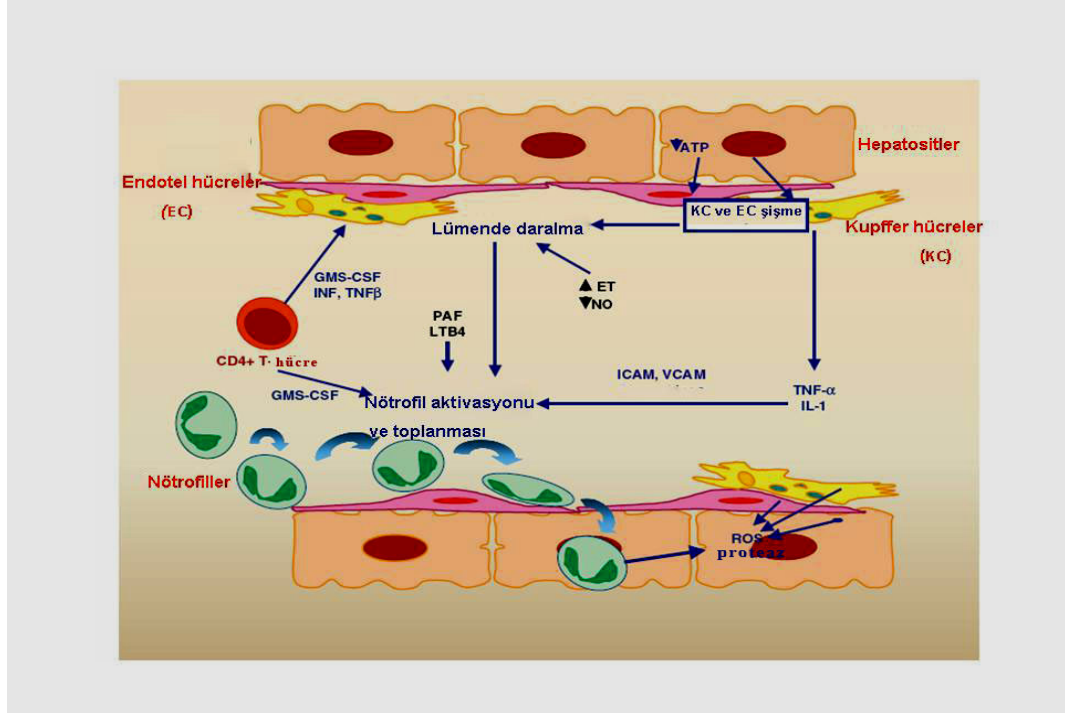
Karaciğer iskemi hasarı sıcak iskemi, soğuk iskemi ve reperfüzyon ilişkili olmak üzere üç tipte olmaktadır. Sıcak iskemi hasarı genellikle major rezeksiyonlarda ve şok benzeri klinik tablolarda gözlenirken, soğuk iskemi genellikle transplantasyon esnasında oluşmaktadır. Reperfüzyon hasarı ise hem transplantasyonda hem de pringle manevrası gibi bazı durumlarda ortaya çıkmaktadır.

Karaciğer I/R'unda rol alan parenkimal hücreler(hepatositler) ile parenkimal olmayan hücrelerin(sinuzoidal endotelial hücreler, kupffer hücreleri ve lipid depolayan Ito hücreler) hasara verdiği yanıt iskeminin tipine göre değişmektedir. Hepatositler, sıcak iskemiyeye oldukça duyarlı iken soğuk iskemiyeye cevapta sinuzoidal endotelial hücrelerin cevabı çok daha

belirgindir. I/R hasarının ana bileşenleri; hücrel aktivasyon ve sitokin salınımı, adhezyon molekül ekspresyonu ve mikrosirküler fonksiyon bozukluğudur(2). İskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisinde öncelikle hücrel değişiklikler görülmekte ve reperfüzyon fazı ile buna enflamatuvar yanıt eklenmektedir.

İskemide öncelikle hipoksiye yanıt olarak hücrel oksidatif fosforilasyondaki azalma, ATP ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfatazların sentezinde yetmezlik görülür. Bu yetmezlik hücre membranındaki ATP bağımlı Na^+/K^+ iyon pompa fonksiyonunu değiştirir. Hücre içine su ve Na^+ girişi olur. Hücre içi Na^+ birikimi sonucunda da kupffer hücrelerinde ve sinuzoidal endotel hücrelerde şişme gözlenir. İskemide aynı zamanda sitozolik Ca^{+2} seviyelerinde artma mevcuttur. Bu artış sonucunda hücre membranındaki fosfolipazlar aktive olur. Aktive fosfolipazlar, fosfolipidler üzerine etki ederek, hücre membranının yapısını bozar. Aynı zamanda Ca^{+2} seviyelerindeki bu artış, reperfüzyonda reaktif oksijen radikalleri(ROR) üretiminde role sahip olan ksantin oksidoredüktazı aktive eder. İskemi süresince ATP indirgenerek, hipoksantin birikimine de neden olur. Mitokondriyal geçirgenlik, lizozomal bozulma, hücrede şişme ve küçük molekül ağırlıklı maddelerin sızıntısı ile karakterize bu durum hepatosit ve diğer hücrelerde, hücre ölümü öncesi gelişmektedir.

Reperfüzyon periyodunun ilk 4 saatlik erken fazında ise, kupffer hücre aktivasyonu görülür. Aktive kupffer hücrelerinden proinflamatuvar sitokinlerin($\text{TNF-}\alpha$,IL-1), ROR'nin üretimi ve salınımı gerçekleşir. Diğer interlökinler de(IL-6,IL-12 gibi) bu olaya dahil olur. $\text{TNF-}\alpha$ ve IL-6, iskemik alanda intrasellüler adezyon molekülünü(ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülünü(VCAM-1) ekspresse eder. Ayrıca göç etmiş nötrofillerle, kupffer hücreleri arasındaki etkileşimi de hızlandırır. Reperfüzyondan 6 saat sonra gelişen geç fazda ise, nötrofil aktivasyonu izlenir. Nötrofiller, sinuzoidal ve postsinuzoidal venüllerde toplanır ve endotel hücrelerine yapışırlar(Şekil-1). Nötrofillerden ROR ve proteazların üretimi ve salınımı ile parenkim hasarı gerçekleşir(3,4,5).



Şekil-1: İskemi-reperfüzyon hasar patofizyolojisinin içerdiği mekanizmalar. İskemide gelişen hipoksi ATP üretiminde azalma yapar. Enerjinin azalması membrandaki aktif taşıyıcı pompaları hasarlar. Hücre içi osmotik basınç ve elektrolit dengesizliği sonucunda KC ve EC şişme olur. Bu da sinuzoidal lümen daralma yapar. Aynı zamanda ET ve NO arasındaki dengesizlik sonucunda gelişen vazokonstriksiyon daralmayı artırır. Mikrosirkülasyondaki bozukluk nötrofil aktivasyonunu ve bölgeye yığılmasını sağlar. KC'den salınan TNF- α ve IL-1 ile ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonunu sağlayarak endotel-nötrofil etkileşimi sağlanır. Böylece nötrofillerden proteaz ve ROS salınarak hücre hasarı meydana gelir. KC, kupffer hücre; EC, endotel hücre; ET, endotelin-1; NO, nitrik oksit.

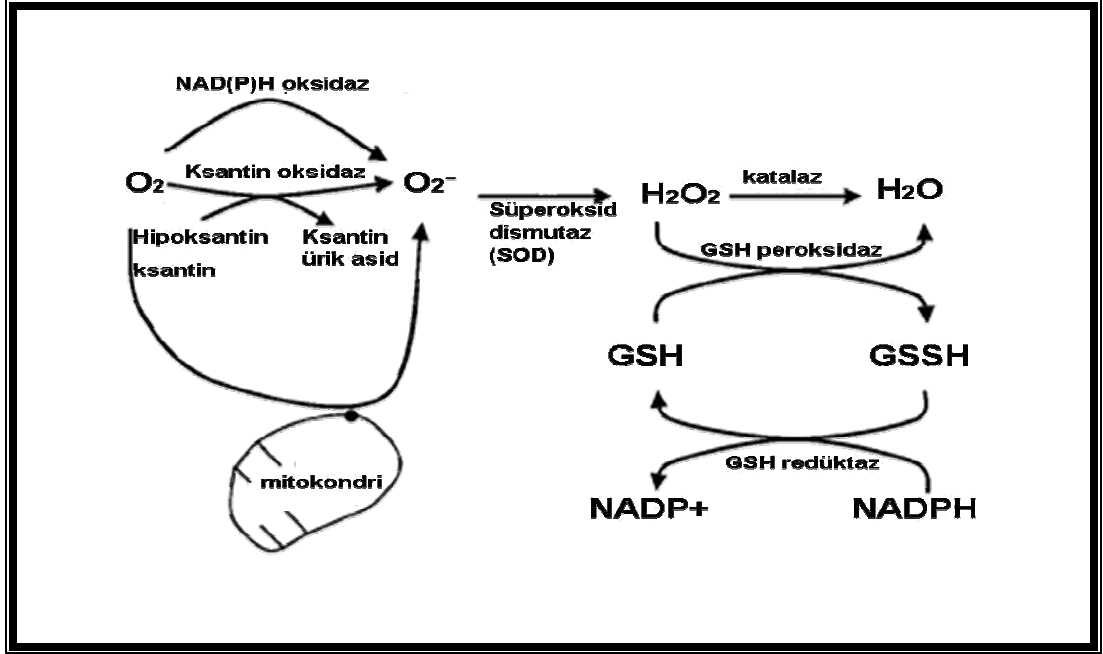
Hepatik I/R hasarında bir diğer önemli nokta, mikrosirkülasyonda meydana getirdiği değişikliklerdir(6). I/R'da sinuzoidal endotel hücrelerinde oluşan hasar, sadece sinuzoidal lümendeki daralmanın sonucu değil, aynı zamanda vazoaaktif maddelerin oluşturduğu vazokonstriksiyonun da sonucudur. Hem nötrofillerin toplanması hem de azalmış perfüzyon sinuzoidlerde daralmayı başlatır(7,8). I/R hasarında nitrik oksit(NO) ve endotelin-1(ET) olmak üzere iki vazoaaktif ajan üzerinde durulur. NO, L-arjinininden nitrik oksit sentetaz(NOS) aracılığıyla meydana gelir(9). Bu ajan, sinuzoidlerde ve presinuzoidlerde vazodilatasyon yapar(10,11). Aynı zamanda trombosit adhezyonunu, trombozu, lökositlerin toplanmasını ve

inflamatuvar mediatör salgılanmasını önler(12,13). NOS'ın, endotelial ve indüklenbilir(INOS) olmak üzere karaciğerde 2 formu mevcuttur. Endotelial NOS aktivitesi Ca^{+2} bağımlıdır. İndüklenbilir NOS ise Ca^{+2} bağımsız olarak hepatositlerden, kupffer hücrelerinden ve endotel hücrelerinden sentezlenir. Oluşan NO yağda çözünebilen bir moleküldür. Fizyolojik durumda karaciğerde sadece endotelial NOS mevcuttur. Hepatik perfüzyon için düşük seviyelerde NOS üretimi gerçekleşir. INOS hem koruyucu hem de toksik etkiler içerir. I/R'da İNOS mRNA ekspresyonu reperfüzyonun 1.saatinde başlar ve 5.saatte artar(14). NO ve süperoksit anyonunu birbirine bağlayarak, peroksinitrit üretir ve toksik etkilerini oluşturur. Peroksinitrit, lipid peroksidasyonunu başlatır ve Na^{+}/K^{+} ATP pompasını inhibe eder(15,16). Endotelin-1 ise endotelden sentezlenir ve vazokonstriksiyon yapar. Bunlar sinuzoidal yatakta vasküler tonusu etkilemektedir. Reperfüzyonun erken döneminde NO salınımı azalır ve endotelin-1 artar. Bu vazoaaktif ajanlar arasındaki dengenin bozulması lökosit birikimi ile beraber lümende daralma ile sonuçlanır.

Reperfüzyonun, özellikle erken fazında gelişen hücre hasarı iskemi fazında gözlenen hücresel değişikliklerin bir sonucudur. Reperfüzyon fazındaki hücre hasarında, reseptör üzerinden ve mitokondriyal apoptotik yollar üzerinden etkili basamaklar tanımlanmaktadır(c-Jun N terminal kinaz, nükleer faktör- κ B). Bu basamaklar üzerinden hücre hasarını tetikleyen mekanizmalar ilerler(17). İNOS, sitokinler ve adhezyon moleküllerinin en azından bir kısmı nükleer faktör- κ B(NF- κ B) tarafından kontrol edilir. Aynı zamanda ROR'nin NF- κ B gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu için de stimülatördür. Bu da I/R hasarındaki döngüyü oluşturmaktadır.

I/R hasarında ortaya çıkan reaktif oksijen radikalleri(ROR), süperoksit anyonları(O_2^{-}), hidroksil radikallerini(OH^{-}) ve hidrojen peroksidi(H_2O_2) kapsamaktadır. Normalde hipoksantin, ksantin dehidrojeniz ile ksantine dönüştürülür. İskemide ksantin dehidrojeniz, ksantin oksidaza dönüşür. Ksantin oksidaz ise substrat olarak oksijen kullanır. Bu yüzden iskemi

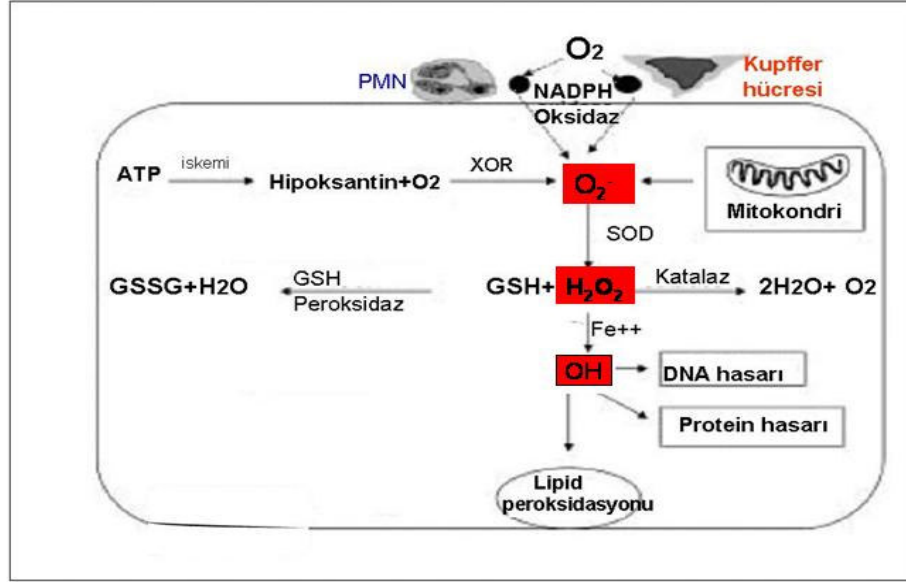
süresince, hipoksantinin ksantine dönüşümü katalizlenemez. Böylece iskemi süresinde hipoksantin seviyelerinde artış olur(18). Reperfüzyon ile tekrar oksijen sağlandığında, ksantin oksidaz tarafından fazla hipoksantinden, toksik ROR oluşur(Şekil-2).



Şekil-2: Serbest oksijen radikallerin üretimi ve temizlenmesi. Hidrojen peroksid GSH peroksidaz ve katalaz ile suya çevrilir. GSH peroksidaz aynı zamanda aktif GSH'u glutatyon disülfide dönüştürür. Bu yol, geri dönüşümlüdür. GSH redüktaz, bu geri dönüşümde rol alan enzimdir. GSH redüktaz tarafından GSSH'in GSH'a dönüşümünü sağlayan yol NADPH kullanır. GSH, glutatyon; GSSH, glutatyon disülfid.

ROR'i hücre membranında lipid peroksidasyonuna yol açar ve nükleer ve mitokondrial DNA hasarı meydana getirerek, direkt hücre hasarını yaparlar. Ek olarak ROR, lökosit aktivasyonu ve kemotaksisi uyarır. Vücutta bu ROR'in üretimini önleyen, ROR'in oluşumunu sağlayan enzimleri sınırlayan veya oksidatif hasarı başlangıcında önleyebilen savunma mekanizmaları vardır. Bunlar antioksidanlar olarak bilinir. Antioksidanlar farklı organlarda farklı konsantrasyonlarda bulunurlar. Bu nedenle I/R hasarına karşı organlar değişik direnç gösterir. Antioksidanlar; mekanizmaları (ROR temizleyen veya ROR katalizleyerek ortadan kaldıran), orjinlerine (doğal veya

sentetik), özelliklerine(lipofilik veya hidrofilik) ve etki alanlarına(hücre içi, membran ve hücre dışı) göre sınıflandırılabilirler(19)(Şekil-3)



Şekil-3: Endojen antioksidan sistemlerin mekanizması. Ksantin oksidoredüktaz(XOR) ve mitokondri reaktif oksijen radikallerin üretiminde ana intrasellüler kaynaklardır. Kupffer hücreleri ve aktive nötrofiller reperfüzyonun erken ve geç fazında reaktif oksijen radikallerinin üretiminde ana ekstrasellüler kaynaklardır. Süperoksit dismutaz(SOD), katalaz ve GSH peroksidaz ana intrasellüler antioksidan enzimlerdir. PMN, polimorfonükleer hücre; NADPH, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

Literatürde I/R hasarını önlemede ve bu hasarı sınırlandırmak için birçok deneysel çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda antioksidan tedavi, antikompleman tedavi, antilökosit tedavi ve iskemik ön hazırlık gibi tedavi modaliteleri mevcuttur. İskemik ön hazırlık, uzun I/R periyodundan önce kısa süreli iskemi zamanlarından oluşmaktadır. Diğer tedavilerde ise bu basamaklara etki eden ajanlar kullanılmıştır.

Literatürde I/R hasarında koruyucu etkinliği araştırılan çeşitli ajanlar arasında 2-Merkaptoetan sülfonat(MESNA) ve insan rekombinant eritropoetinden(rhEPO) bulunmaktadır. MESNA, sıklıkla kemoterapi

toksitesine karşı koruyucu ajan olarak kullanılan küçük sentetik bir moleküldür. Yapısındaki sülfidril grubu sayesinde, ROR ortadan kaldırılmasını sağlar ve hidrojen peroksid yapımı üzerine direkt inhibe edici rol oynar(20,21). Bu etkileri nedeniyle oksidatif hasar üzerine antioksidan ajan olarak kullanımını gündeme gelmiştir. ROR, lipid peroksidasyonu yaparak hücre membran hasarı üzerinde etkili olmaktadır. Lipid peroksidasyonu ile glutatyon(GSH) indirgenerek, glutatyon disülfide(GSSH) dönüşür. GSH oksidatif hasara karşı, hücrel defans sistemine katılan, hasara karşı koruyucu, enzimatik olmayan hücrel antioksidandır.(22,23) GSH, karaciğerde yüksek konsantrasyonda mevcuttur. MESNA, bu alandaki etkisi ile in vivo ve in vitro çalışmalarda etkili bir antioksidan ajan olarak bilinmektedir(24).

rhEPO ise, düşük molekül ağırlıklı glikoprotein yapıya sahip bir hormondur. Fetal hayatta karaciğer tarafından üretilir. Takiben yetişkin dönemde, böbrek kaynaklı olup, eritropoez için stimülatördür(25). İnsan rekombinant eritropoetin, etkisini spesifik bir reseptör üzerinden gerçekleştirir. Bu reseptör sitokin reseptör üst ailesinin bir üyesidir(26). Yapılan çalışmalarda rhEPO için spesifik reseptörün birçok dokuda bulunduğu gösterilmiştir. rhEPO'nun apoptozisi önleyici etkisi, anjiogenes üzerindeki pozitif etki, I/R hasarındaki doku koruyucu etkisi ve anti-inflamatuar etkisi yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. rhEPO, iskemi sonrası oluşan lökosit birikimini azaltır. Pro-inflamatuar sitokinler olan TNF- α ve IL-6 salınımını ile ICAM-1 ekspresyonunu azaltır(27,28). rhEPO proinflamatuar sitokin(TNF- α) üzerindeki azaltıcı etkisini direkt ve indirekt olarak gösterebilir. rhEPO'nun doku hasarında endotel progenitör hücre üzerine de rolü vardır. rhEPO endotel progenitör hücrelerin adhezyonunu artırır. Aynı zamanda endotel onarımına da katkısı vardır. Yan etki olarak, rhEPO'nin hücre içi Ca^{+2} düzeyini arttırdığı ve damar düz kas hücrelerinde kontraksiyona neden olduğu bilinmektedir. Özellikle periferik vasküler rezistansı artırır. Aynı zamanda rhEPO direkt veya indirekt olarak NO sentetaz değişikliklerini indükler(29).

Bu alışmada, KC I/R hasarına karşı kullanılan birçok ajandan en popüler olan iki ajanın kombine kullanımının meydana getireceği etkilerin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanları

Bu çalışmada ağırlığı 250-300 gr arasında değişen 40 adet dişi Wistar-Albino cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar uygun ısı, rutubet ve havalandırması olan odalarda 12 saat aydınlık /12 saat karanlık periyodunda standart sıçan yemi ile beslendi. Çalışma Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanı Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi.

DeneySEL Protokol

Tüm deney gruplarında sıçanlar, intramusküler(i.m.) 5mg/kg Xylazin (Romphun) ve 60mg/kg Ketamin(Ketalar) anestezisi altında deney masasına alındı. Standart 5 cm'lik orta hat laparotomi uygulandı. Hepatoduodenal ligaman(Portal ven, hepatik arter ve ana safra kanalı) vasküler klemp ile 30 dak. klemlenerek, total hepatik iskemi oluşturuldu. Karaciğer yüzeyinde iskemi ile oluşan renk değişikliği gözlemlendi. İskemi dönemini takiben vasküler klemp açılarak, 2 saatlik bir zaman periyodunu içeren reperfüzyon fazına geçildi. Reperfüzyon döneminde sıvı kaybını en aza indirmek için, batın cilt stapler ile kapatıldı. Tüm gruplara 2 saatlik reperfüzyon döneminden sonra re-laparotomi uygulanarak, tüm sıçanların karaciğer sol lobu patolojik inceleme için %10 formalin solüsyonuna alındı. İskemi ve reperfüzyon süresince sıçanlar devamlı anestezisi altında tutuldular. Kardiyak pankçır ile sakrifikasyon tamamlanırken, 5 ml kan örneği biyokimyasal tetkikler için alınarak deney sonlandırıldı(Tablo-1).

Tablo-1: Gruplara göre deneysel protokol modeli

Grup A (Kontrol grubu)		30 dak. iskemi	2 saat reperfüzyon
Grup B (rhEPO verilen grup)	İskemiden 5 dak. önce 1000IU/kg rhEPO intraperitoneal	30 dak. iskemi	2 saat reperfüzyon
Grup C (MESNA verilen grup)	İskemiden 15 dak. önce 150mg/kg MESNA intraperitoneal	30 dak. iskemi	2 saat reperfüzyon
Grup D (rhEPO+MESNA verilen grup)	İskemiden 15 dak. önce 150 mg/kg MESNA + iskemiden 5 dak. önce 1000 IU/kg rhEPO intraperitoneal	30 dak. iskemi	2 saat reperfüzyon

Biyokimyasal Analizler

Tüm sıçanlardan alınan 5 ml kan örnekleri, 2000 devirde 10 dak. satrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri -80°C saklandı. Karaciğer hasarını belirlemek için toplanan serum örneklerinde aspartat aminotransferaz(AST), alanin aminotransferaz(ALT), laktat dehidrogenaz(LDH), gama-glutamil transferaz(γ-GT) değerleri ölçüldü. Dokudaki lipid peroksidasyonunda yol gösterici olarak ise serumda malondialdehid(MDA) seviyeleri değerlendirildi.

Histolojik Analiz

İki saatlik reperfüzyon periyodunu takiben tüm sıçanların karaciğer sol lobu %10'luk formaldehid solüsyonuna alındı. Formolden çıkarılan karaciğer sol lob dokuları parafin ile tespit edildi. Elde edilen örneklerden alınan kesitler xylene ile deparafinize edilerek, Hemotoksilen-Eozin(HE) ile boyandı. Santral ven dilatasyonu, sinüzoidal konjesyon, hepatositlerdeki dejenerasyon ve

nekroz HE ile boyanan tüm karaciğer dokularında ışık mikroskobu altında incelendi. Hasarı derecelendirmede, gözlenen her parenkimal değişiklik için yüzdeler belirlendi. İncelenen karaciğer dokularının sahip olduğu patolojik değişikliklerdeki yüzdeler hesaplandı. Buna göre, %75'den daha yüksek oranda değişiklikler gözlenen durumlar şiddetli, bu değer altındakiler hafif olmak üzere sınıflandırma yapıldı.

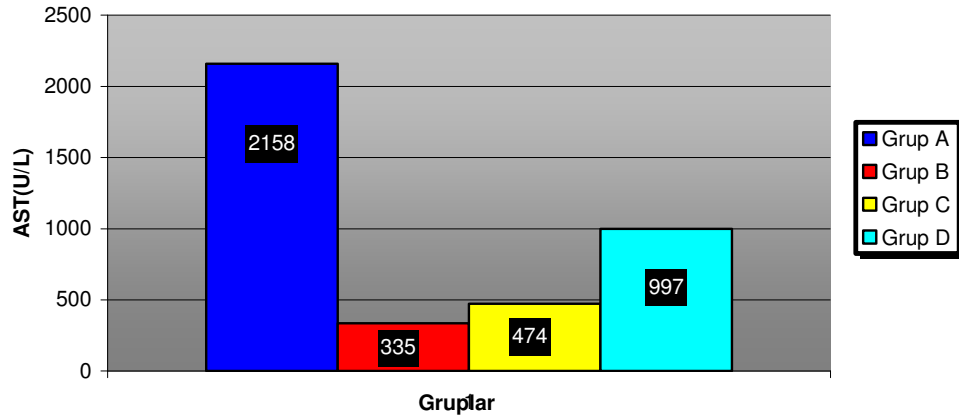
İstatistiksel Analiz

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi Uludağ Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı tarafından SPSS for Windows Ver. 11.0 istatistik paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma, medyan(ortanca) ve çeyrekler arası aralık(interquartile range - 25.-75. persentil) olarak; kategorik veriler sıklık ve yüzde olarak(n,%) sunuldu. İstatistiksel analizlerde Pearson ki-kare test, Fisher'in Kesin ki-kare testi ve Kolmogorov-Smirnov test, Kruskal-Wallis test ve Mann-Whitney U test kullanıldı. Anlamlılık düzeyi 0.05 olarak kabul edildi.

BULGULAR

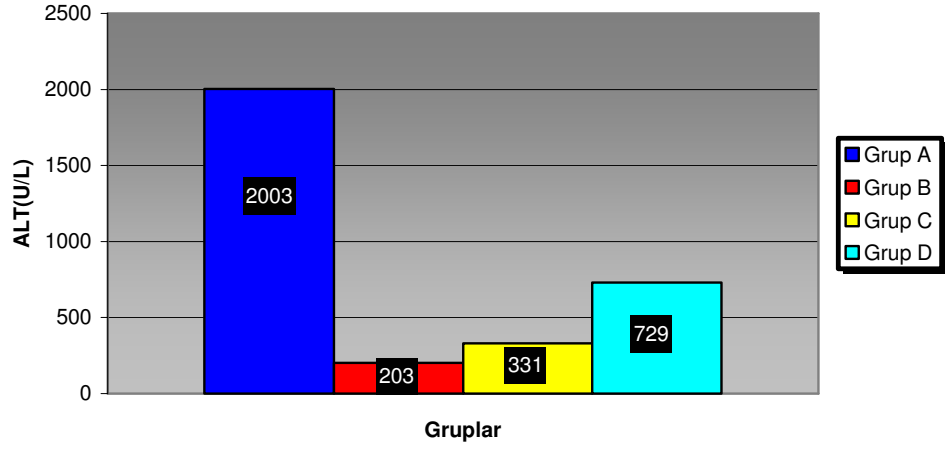
Karaciğer I/R Hasarını Gösteren Biyokimyasal Parametreler

Sadece I/R uygulanan grup A'da AST değerleri oldukça yüksekti. Grup A'da AST için ölçülen en düşük değer 1650U/L bulundu. Buna karşın grup B, grup C, grup D'de ortalama AST değerleri 1000U/L'nin altında olup, özellikle iskemi öncesi rhEPO verilen grupta belirgin düşük değerler bulundu(Grafik-1).

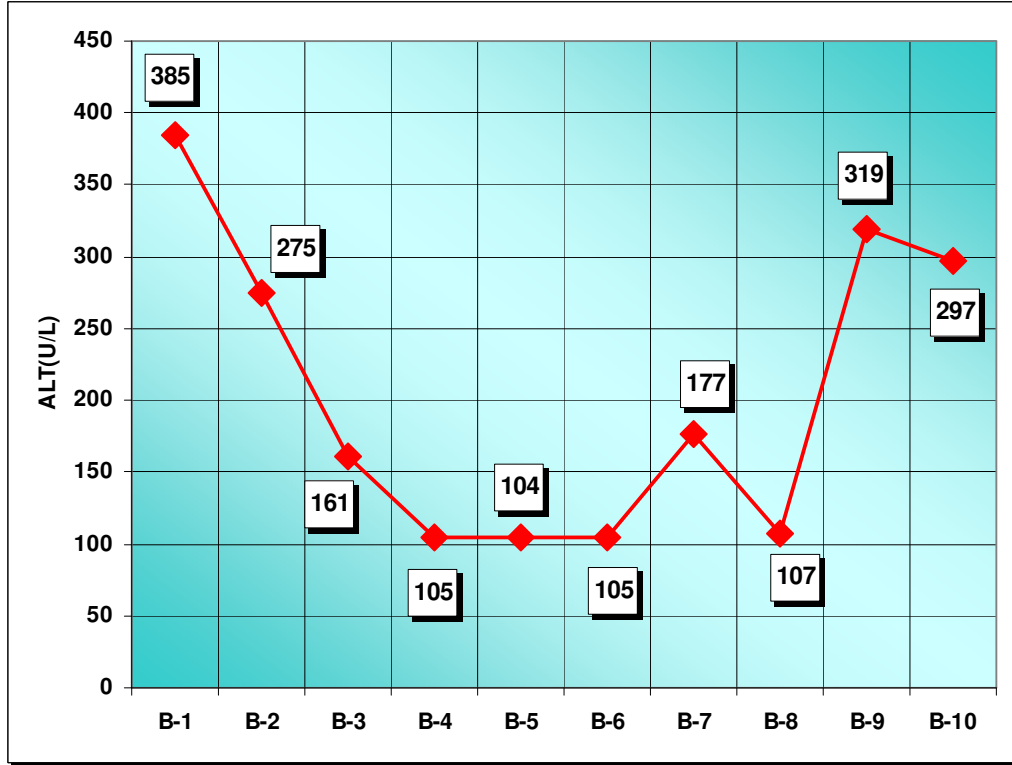


Grafik-1: Gruplara göre ortalama AST(U/L) değerleri

Karaciğer I/R hasarında daha spesifik olan ALT değerlerinde de, AST'de gözlenenlere benzer sonuçlar elde edildi. Fakat ALT 'de kontrol grubu ile diğer gruplardaki ortalama değerler arasındaki oran artmıştır. rhEPO uygulanan grup B'deki ortalama değer kontrol grubunun 1/10'u kadardır. Kontrol grubunda ALT değerleri 1455-2645 aralığı içindedir. Diğer gruplarda ölçülen ALT'nin ortalama %70'i 500U/L altındadır(Grafik-2). rhEPO uygulanan grup B'de tüm değerler <500U/L olup, genelde 100U/L civarında seyretmiştir(Grafik-3).



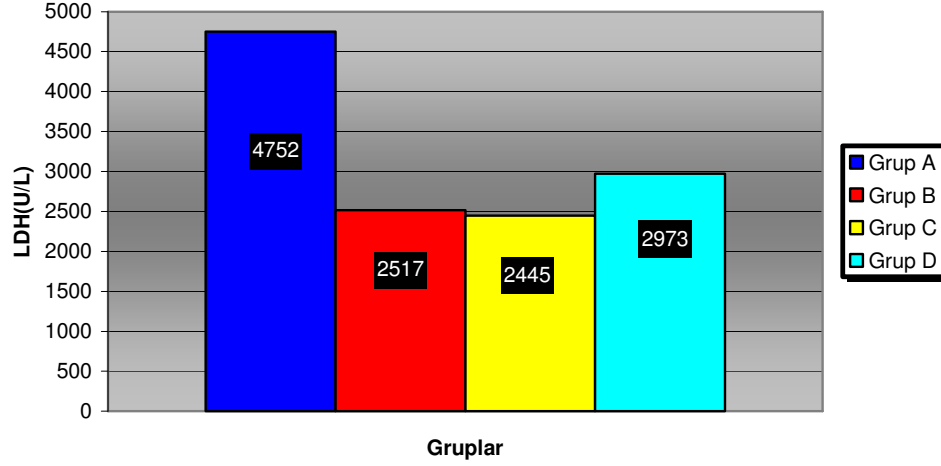
Grafik-2: Gruplara göre ortalama ALT(U/L) değerleri



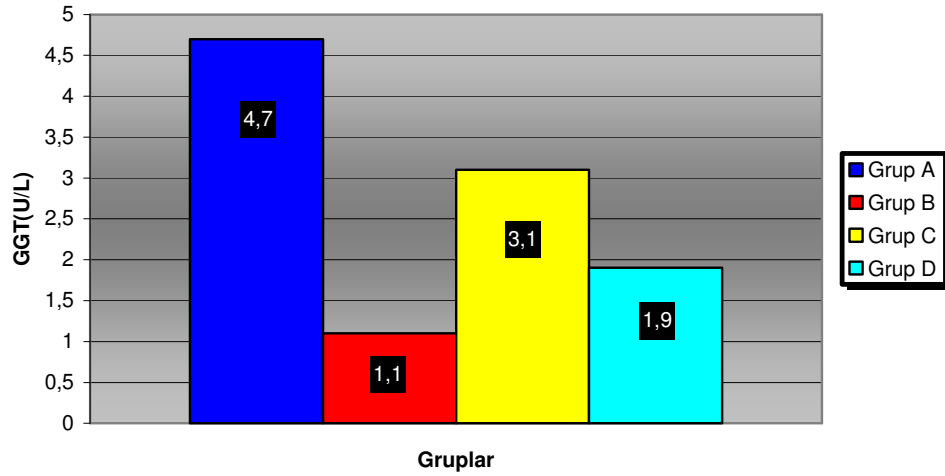
Grafik-3: Karaciğer I/R hasarında rhEPO grubundaki ALT değerleri

LDH değerlerinde ise kontrol gruba göre anlamlı, ancak kendi aralarında belirgin fark yaratmayan değerler lld. Kontrol grubunda ortalama LDH değeri 4752 ± 1245 U/L olup, tek ajanlı rejimlerin 2 katı ortalama değere sahipti(Grafik-4). Gama-glutamil transferaz için tüm gruplar normal değer

aralığında(0-50U/L) dağılım gösterdi. Ortalama değerlere bakıldığında <1U/L değere sahip tek grup rhEPO verilen A grubudur. Kontrol grubundaki γ -GT değerleri 5-16 U/L arasında değişti(Grafik-5).



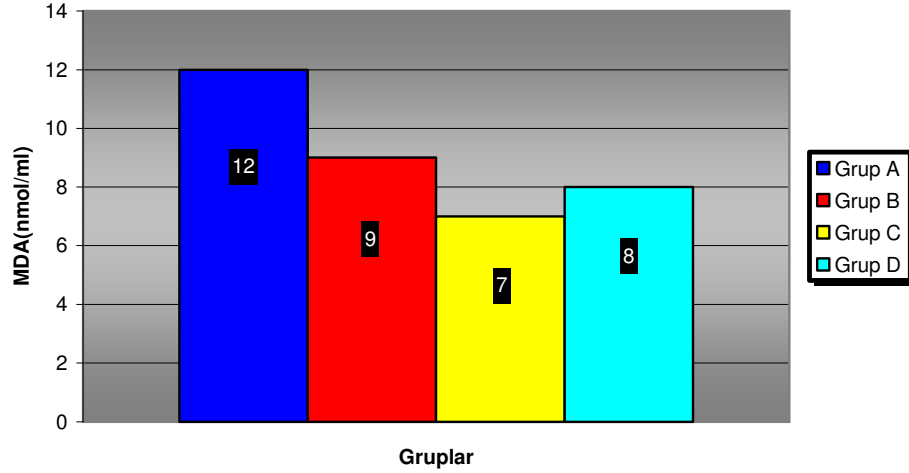
Grafik-4: Gruplara göre ortalama LDH(U/L) değerleri



Grafik-5: Gruplara göre ortalama γ -GT(U/L) değerleri

Karaciğer parankim hasarı haricinde, lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA değerindeki en belirgin yükseklik grup A'dadır. Kontrol grubunda, MDA değerleri 10,7-13,5 nmol/ml iken MESNA uygulanan grupta MDA düzeyi 1,4

nmol/ml gibi çok düşük değerlere sahipti. rhEPO uygulanan grupta ortalama MDA 9nmol/ml, kombine grupta ise 8nmol/ml olarak ölçüldü(Grafik-6).



Grafik-6: Gruplara göre ortalama MDA(nmol/ml) değerleri

AST, ALT, LDH ve MDA değerlerinde gruplar arası yapılan multivaryant analizde istatistiksel anlamlılık vardı. Tablo-2’de gruplardaki ortalama değer \pm standart sapmaları(SS) gösterilmiştir.

Tablo-2: Gruplara göre biyokimyasal parametrelerin ortalama değerleri(\pm SS)

	Grup A	Grup B	Grup C	Grup D
AST (U/L)	2158 \pm 483	335 \pm 183	474 \pm 292	997 \pm 587
ALT (U/L)	2003 \pm 491	203 \pm 106	331 \pm 286	729 \pm 378
LDH (U/L)	4752 \pm 1245	2517 \pm 2085	2445 \pm 2171	2973 \pm 1522
MDA (nmol/ml)	12,1 \pm 0,8	9,5 \pm 1,9	7,3 \pm 2,4	8,5 \pm 2,9

Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında yapılan univaryant analizlerde AST, ALT, LDH, MDA değerleri için istatistiksel anlamlılık vardı. MESNA verilen grup ile rhEPO grubu arasındaki karşılaştırmada sadece MDA(nmol/ml) değerlerinde istatistiksel anlamlılık olduğu görüldü($p=0,035$). Diğer

biyokimyasal parametreler için bu iki grup arasında fark yoktu. Bunun sonucunda MESNA uygulanan grup C'nin MDA değeri üzerine daha etkili olduğu görüldü(Tablo-3).

Tablo-3: Gruplar arasındaki istatistiksel veriler

	AST	ALT	LDH	MDA
Grup 1*	p< 0,001	p< 0,001	P= 0,002	p= 0,002
Grup 2**	p< 0,001	p< 0,001	P= 0,004	p< 0,001
Grup 3***	p< 0,001	p< 0,001	P= 0,019	p= 0,002
Grup 4****	p= 0,165	p= 0,19	P= 0,63	p= 0,035

* Kontrol grubu ile rhEPO uygulanan grup arasında Mann-Whitney U test

** Kontrol grubu ile MESNA uygulanan grup arasında Mann-Whitney U test

*** Kontrol grubu ile kombine grup arasında Mann-Whitney U test

**** rhEPO ile MESNA uygulanan grup arasında Mann-Whitney U test

Tek ajanlı tedavi rejimleri ile kontrol grubu arasında AST, ALT, LDH ve MDA değerlerinde istatistiksel anlamlılık gözlenirken, kombine grupla yapılan karşılaştırımda sadece AST ve ALT parametrelerinin anlamlılığı mevcuttu. ALT ve AST değerinde rhEPO ile kombine grup eşleştirmesi, MESNA ile kombine grup eşleştirmesinden istatistiksel açıdan daha anlamlıdır(Tablo-4).

Tablo-4: MESNA ve rhEPO ile kombine grubun istatistiksel analizi

	AST	ALT	LDH	MDA
Grup-1*	p= 0,002	p< 0,001	P= 0,353	p= 0,436
Grup-2**	p=0,043	p= 0,015	P= 0,190	p= 0,481

* rhEPO ile kombine grup arasındaki Mann-Whitney U testi

** MESNA ile kombine grup arasındaki Mann-Whitney U testi

I/R Hasarındaki Patolojik Parankimal Değişiklikler

Doku değişikliklerinin incelenmesinde, gruplardaki tüm karaciğer dokularının tamamına yakınında sinüzoidal konjesyon mevcuttu. Santral ven dilatasyonu ise en fazla kontrol grubuna ait karaciğer dokularında gözlemlendi. Grup A'da gözlenen santral ven değişikliğinin yarısı şiddetli dilatasyon niteliğindedi.

Buna karşın diğer gruplarda şiddetli santral ven dilatasyonu gözlenmedi. Dokudaki hepatosit dejenerasyonuna bakıldığında grup A'ya göre grup D'de anlamlı ölçüde düşük düzeyde olduğu görülmektedir. Grup A'nın %40'inde normal hepatosit yapısı gözlenirken, grup B'de hepatositlerin %70'i iskemi-reperfüzyondan hiç etkilenmemiştir. Grup C'de karaciğerde nekroz sadece bir dokuda tanımlanırken grup A'nın %60'ında yaygın nekroz vardı. Grup D'de ise nekroz görülen 4 karaciğer dokusu mevcuttu. Buna karşın SVD, sinüzoidal konjesyon ve hepatosit dejenerasyonuna bakıldığında gruplar arasında istatistiksel anlamlılık saptanmadı(Tablo-5).

Tablo-5: Karaciğer dokusunda gözlenen değişikliklerin gruplar arasındaki dağılımı

	Santral ven dilatasyonu		Sinüzoidal konjesyon		Dejenere hepatosit		Nekroz	
	yok	var	yok	var	yok	var	yok	var
Grup A	2	8	5	5	4	6	4	6
Grup B	7	3	4	6	7	3	6	4
Grup C	6	4	1	9	4	6	9	1
Grup D	8	2	3	7	8	2	6	4
p değeri*	=0,113		=0,475		=0,678		=0,518	

* Kolmogorov- Smirnov Test

Fakat grupların, kontrol grubu ile birebir karşılaştırılmasında sadece SVD yönünden istatistiksel anlamlılık mevcuttu. Kombine grup ve kontrol gruptaki SVD'una bakıldığında bu iki grup arasında istatistiksel anlamlılık olduğu görüldü(p=0,007) (Tablo-6).

Tablo-6: Gruplar arası parankimal değişiklikler

	Santral Ven Dilatasyonu	Sinüzoidal konjesyon	Hepatosit dejenerasyonu
Grup-1*	p=0,11	P=0,09	p=0,74
Grup-2**	p=0,17	P=0,14	p=1,0
Grup-3***	p=0,007 ♦	P=0,65	p=0,17

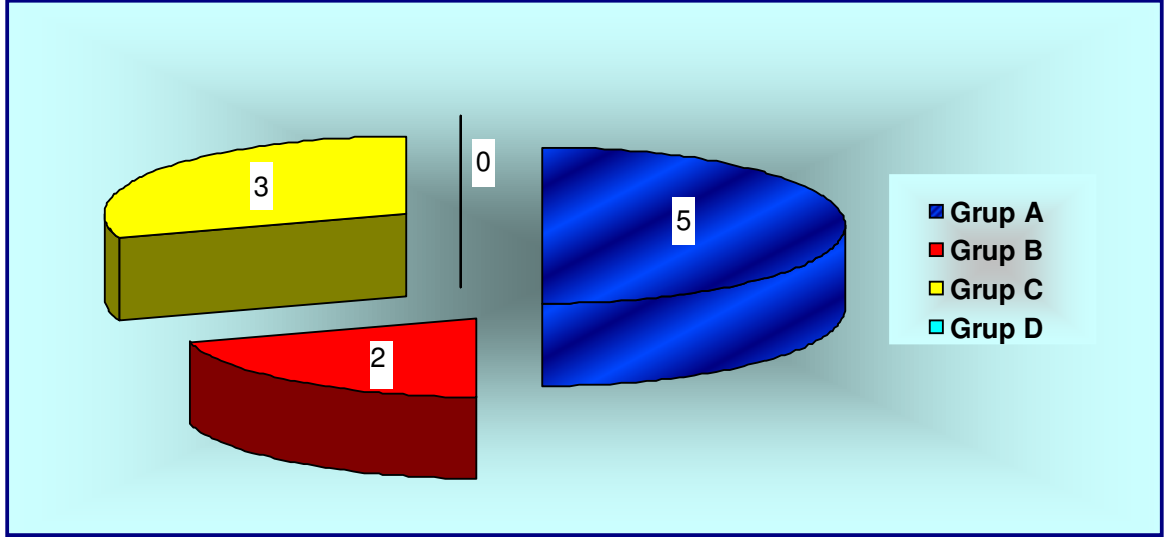
* Kontrol grubu ile rhEPO arasında Pearson ki-kare test

** Kontrol grubu ile MESNA arasında Fisher's Kesin ki-kare test

*** Kontrol grup ile kombine grup arasında Fisher's Kesin ki-kare test

♦ Kontrol grup ile kombine grup arasında Pearson ki-kare test

Kontrol grubunun yarısında, parenkimdeki değişikliklerin şiddetli(>%75) olduğu görüldü. rhEPO verilen grup B'de 2 dokuda, MESNA verilen grup C'de 3 dokuda şiddetli parenkimal hasar olduğu görüldü(Grafik-7).



Grafik-7: Parankimdeki >%75 değişikliğin gruplara dağılım sayısı

Kontrol grubu ile kombine grup arasında parenkimal değişiklikler yönünden ciddi fark vardı. Kombine grupta I/R hasarı sonrası görülen değişikliklerin tümü %75'in altındaydı. İki grup arasındaki şiddetli hasarda istatistiksel analizde anlamlılık mevcuttu($p=0,03$)(Tablo-7).

Tablo-7: Grup A ile Grup D arasındaki parenkimal değişiklikler

	Karaciğer Parenkimal Değişiklik	
	Hafif (\leq%75)	Şiddetli (>%75)
Grup A	5	5
Grup D	10	Ø

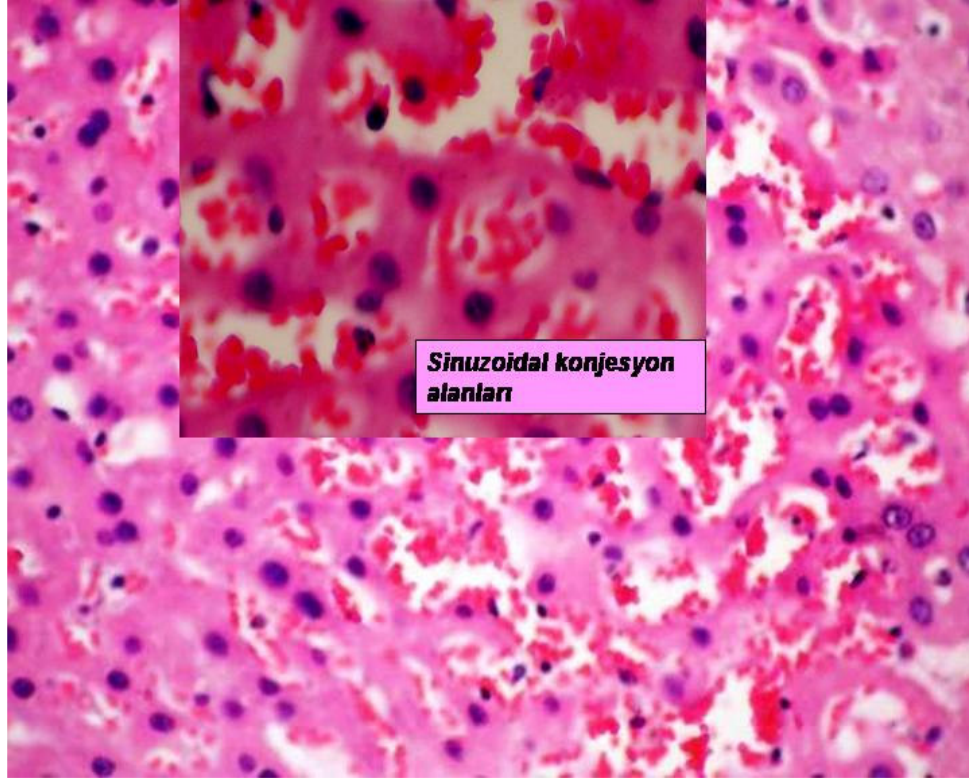
Kontrol grubunda görülen ileri derecede genişlemiş santral ven ve tüm alanlarda görülen yaygın nekroz hasar için oldukça patognomoniktir(Resim-1). Buna karşın rhEPO grubunda ve özellikle kombine grupta SVD görülme

sıklığı sırasıyla %30 ve %20'e düşmektedir. rhEPO ve kombine gruptaki SVD minimal düzeydedir.



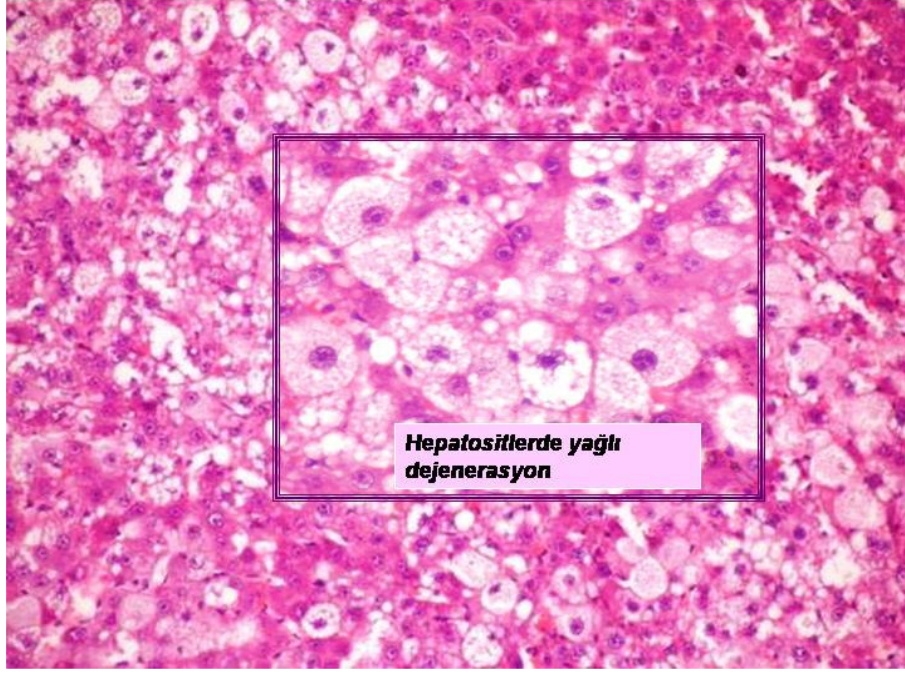
Resim-1: Kontrol grubunda gözlenen ciddi santral ven dilatasyonu ve geniş nekroz alanları

Değerlendirilen karaciğer dokularında genellikle sinuzoidal konjesyon mevcut. Grup B ve grup C'de sinuzoidal konjesyon diğer parenkimal değişikliklerden daha fazla görülmektedir(Resim-2).



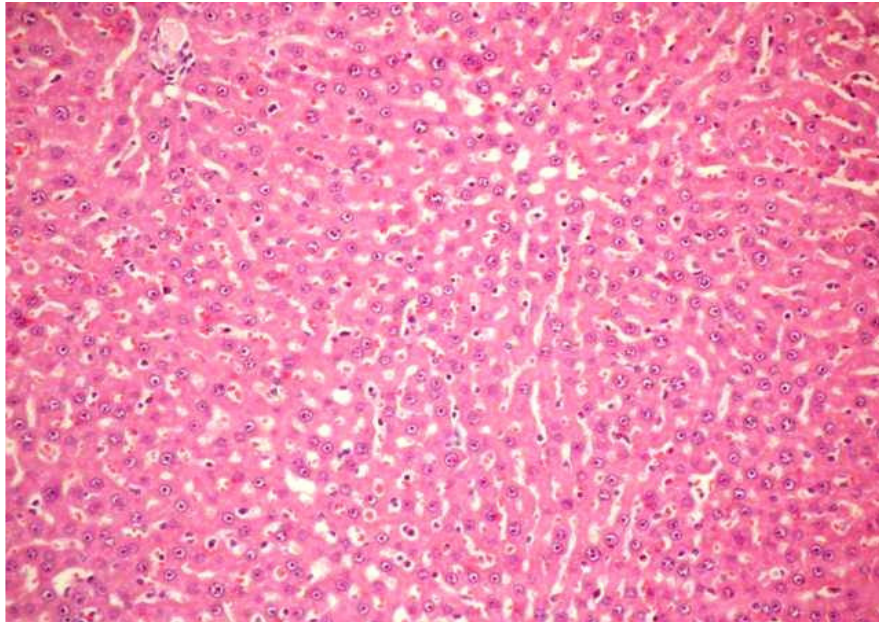
Resim-2: rhEPO uygulanan grupta ciddi sinuzoidal konjesyon

Parenkimal değişiklikleri değerlendirmede en önemli paya sahip olan hepatosit görünümü, kombine grubun %80'inde tamamen normal olarak izlendi. Kontrol ve MESNA grubunda belirgin yağlı dejenerasyon içeren hepatositler görüldü(Resim-3).



Resim-3: MESNA uygulanan grupta yağlı hepatosit dejenerasyonu

Grup D'de gözlenen karaciğer dokularında çoğu zaman minimal sinuzoidal konjesyon dışında I/R hasarından korunmuş görünüm izlendi. Bazı preparatlarda nekroz gözlenmiş, fakat oldukça fokal yerleşimliydi(Resim-4).



Resim-4: Grup D'de normal izlenen karaciğer dokusu

TARTIŞMA VE SONUÇ

I/R hasarı ile ilgili çalışmaların genelinde tek mediatörlü yaklaşımlar denenmiştir. Multipl hasar mekanizmasının basamakları üzerine inhibitör etki ile kimi zaman endojen koruyucu ajanların konsantrasyonları arttırılmaya çalışılmış, kimi zaman ise hasarı tetikleyen inflamatuvar ve toksik mediatörlerin oluşması engellenmiştir. Tek mediatör ile inhibisyonların(TNF- α , IL-1, P-selectin ve ICAM-1 gibi başlıca moleküller gibi) deneysel çalışmalarda, I/R hasarı için koruyucu etkileri gösterilmiştir(30,31). Fakat bu tek ajan mediatörler ve moleküler yaklaşımlar klinik pratikte uygun değildir. Birden çok inhibitör uyarıcı etkili tek tip farmakolojik bileşikler hem klinik uygulamada hem de deneysel modelde oldukça başarılı olabilir. Son zamanlarda yapılan deneysel çalışmalar bu bileşiklerin(rhEPO, Hemoksigenaz-1 ve L-glisin) iskemi-reperfüzyon sonrası hasarı azaltmada etkili olduklarını ve ek olarak az yan etki potansiyeli oluşturduklarını göstermişlerdir(32).

Aynı zamanda literatürde, farmakolojik ajanlar dışında ön iskemi uygulaması ile iskemik toleransın arttırıldığı görülmektedir. Hem aralıklı klemp yöntemi(örneğin, 15 dak. iskemi ve 5 dak. reperfüzyon gibi) hem de iskemik hazırlık(uzun iskemi periyodundan önce 10 dak. iskemi ve 10 dak. reperfüzyon gibi) hepatic mikrosirkülasyonun üzerine etkili bilinmektedir. Literatürde ise eritropoetin'in iskemik ön hazırlıkta kullanılmasının, benzer etkisi olduğundan bahsedilmektedir. rhEPO'nin, özellikle doku üzerine hasarlayıcı potansiyeli olan TNF- α ve diğer proinflamatuvar sitokinlere karşı sınırlayıcı etkisini, NF- κ B üzerinden gösterdiği belirtilmektedir(33).

rhEPO'nin literatürde I/R hasarındaki koruyucu etkisi ile ilgili birden çok mekanizma gösterilmektedir. Özellikle nöron hasarı, myokard iskemisi ve böbrek I/R hasarı üzerindeki koruyucu etkilerini üzerinde sıklıkla

durulmaktadır. Bu çalışmalarda, hedef dokulardaki rhEPO'nin reseptör varlığı önemli bir sorun olarak belirmektedir. Genellikle rhEPO ve eritropoetik olmayan doku koruyucu sitokinler, normal dokularda EPO reseptör düzeyinde değişiklik göstermezler. Bununla birlikte, hipoksi başladığında EPO endotel hücrelerinde kendine özgü reseptörde mesaj artışı gösterir(34).

rhEPO ile ilgili çalışmalarda apoptozisde etkili ajan olduğu ve doku koruyucu olduğu belirtilirken 3 farklı konu halen tartışmalıdır. Bunlardan ilki uygulanan rekombinant eritropoetin dozudur. Doz-bağımlı olduğu düşünülen ajanın anemi tedavisinde kullanılan en düşük dozları ile yan etkilerinin görüldüğü dozlar arasındaki sınır belirsiz kalmaktadır. Bazı yayınlarda yüksek doz rhEPO kullanımının trombozu, kan viskozitesini ve kan basıncını arttırdığı belirtilmektedir(35). rhEPO'nin I/R neden olduğu karaciğer hasarını önemli ölçüde azalttığına dair ilk kanıt olarak gösterilen bir çalışmada, rhEPO çeşitli zaman dilimlerinde uygulanmıştır. Bu çalışmada 1000IU/kg dozunda ve iskemiden 5 dak. önce uygulanan rhEPO'nin oksidatif stresi ve kaspaz-3 aktivitesini azalttığını bildirmektedir(36). Literatürde bu konu ile ilgili diğer bir yayında; santral sinir sistemi gibi sıkı endotel bariyerlerine sahip dokularda, intraperitoneal veya intravenöz uygulanan ~500 U/kg-bw gibi çok yüksek rhEPO tedavisi ile hasardan korumada minimum etkili doz elde edilmektedir(37). Kalp ve böbrek gibi dokularda minimum etkili dozlar için rhEPO tedavisi, anemide uygulanan(10-50U/kg-bw) klinik doz aralığına düşürülebilmektedir(35). Yine bu konuda renal hasar üzerine yapılan çalışmada, rhEPO 1000 IU/kg da oksidatif stresi azalttığı(38), düşük doz rhEPO(300 IU/kg) apoptotik hücre ölümünü ve kaspaz-3 aktivitesini azalttığı gösterilmiştir(39). Yüksek doz rhEPO'nin(3000-5000 IU/kg) ise Bcl-2 ve HSP70 ekspresyonunu arttırdığı ve apoptozisi azalttığı gösterilmiştir(40).

Bizim çalışmamızda, I/R öncesi uygulanan 1000IU/kg rhEPO'nun doku hasarının spesifik ve nonspesifik göstergeleri olan biyokimyasal parametrelerin normale yakın değerlerde seyretmesini sağlamıştır. Tekli rejimlerde ortaya konulan AST ve ALT değerlerini karşılaştırmada, kombine

gruba göre daha anlamlı istatistiksel veriler bulunduğu düşünülürse ve tekli rejimlerden rhEPO'nun ALT üzerinde ciddi etkisi de göz önüne alındığında, rhEPO oldukça etkili bir ajandır. Fakat bu çalışmamızdaki patolojik verilerle tam destek bulamamaktadır. Çünkü patolojik açıdan kombine grup hariç, hiçbir grupta istatistiksel anlamlılık elde edilememiştir. Bunda da ilacın doz-bağımlı etkisinin ilgili olduğu görüşünderiz.

İkinci önemli nokta, rhEPO'nin uygulama zamanıdır. Henüz bu konu tam olarak netleşmemekle beraber, çoğu literatür verisi iskemiden önce uygulandığında koruyucu etkinin daha anlamlı olduğunu göstermiştir. Uygulama zamanı ile yapılan bir çalışmada, renal iskemiden 30dak. önce, reperfüzyondan 5 dak. önce ve reperfüzyondan 30 dak. sonra olmak 3 farklı zaman diliminde 300U/kg dozunda rhEPO uygulandığı görülmektedir. rhEPO'nun iskemi ve reperfüzyondan önce verildiğinde tübül hücrelerinde apoptotizisi azalttığını, reperfüzyondan 30dak. sonra verilen rhEPO'nun ise apoptotik hücre sayısını azaltmada anlamlı etkinliği olmadığını gösterdiler. Bunlar arasında iskemiden 30 dak. önce rhEPO uygulanan grupta AST değerleri 500U/L 'nin altında olup, bu sonuçlar çalışmamızla birebir örtüşmektedir. Fakat yine aynı çalışmada renal tübül morfolojisinin korunması açısından reperfüzyondan 30 dak. sonra uygulanan rhEPO tedavisinin diğerlerine göre daha etkili olduğu belirtilmiştir(40).

rhEPO'nin verilme zamanı üzerine yapılan başka bir çalışmada ise, iskemiden 12-24 saat veya 2saat önce, iskemi başladığı zaman veya reperfüzyon başladığı zaman uygulanmasının kalp üzerine koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir(41). rhEPO'nin koruyucu etkisinde verilme zamanı farklılıklarını karşılaştıran iki çalışmada ise, sonuçlar tartışmalı bulunmuştur(42).

rhEPO ile ilgili yapılan çalışmalar arasındaki uygulama zamanı arasındaki farklar, doku farklılıkları ile beraberlik göstermektedir. Karaciğer I/R hasarı üzerine koruyucu etki iskemiden 5 dak.önce görülürken, renal

hasar için iskemiden 30 dak. öncesi, kalp dokusu üzerine etki iskemiden 1 gün öncesinden reperfüzyon başlangıcına kadar olan herhangi bir zaman diliminde gösterilmektedir. Bu nedenle, rhEPO'nun uygulama zaman penceresinin oldukça geniş olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızdaki patolojik verilerde rhEPO uygulanan grupta hepatositlerdeki dejenerasyonun oldukça az ve hafif olduğu görülmektedir. Her ne kadar I/R hasarının olduğu kontrol grubuna göre daha pozitif veriler elde edilse de, istatistiksel anlamlı bir sonuca varılmamıştır. Çalışmalarda hem karaciğer dokusundaki kaspaz aktivitesine bakılarak hemde nekrotik değişiklikler incelenerek, rhEPO'nin ciddi koruyucu etkisi gündemdedir. Bu rhEPO için 1000 IU/kg uygulanması ile hücrel oksidatif stresin azalmakla birlikte, dozdaki düşüklüğün antiapoptotik etkiyi yeterli düzeyde ortaya çıkarmadığını gösterebilir. Karaciğer I/R hasarı üzerine rhEPO uygulama zamanı ve dozu ile ilgili daha fazla deneysel çalışmalara ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

rhEPO uygulama yeri olarak literatürde farklı alanlarda kullanımı olsa da arada etkili farkın olduğu gösterilmemiştir. İntraperitoneal, lokal, subkutan ve damar içi uygulamaları çeşitli organlarda kullanılmıştır. Karaciğer I/R hasarında, lipid peroksidasyonu ile ilişkili karaciğer koruyucu etkisini intraperitoneal uygulanan rhEPO ile göstermiştir. Aynı zamanda literatürde akciğer I/R hasarında intraperitoneal kullanımı ile rhEPO koruyucu etkisi gösterildiği gibi(43), laparoskopide de oksidatif hasardaki iyileştirici etkisi subkutan kullanım ile gösterilmiştir(44).

MESNA'nın karaciğer iskemi-reperfüzyon üzerine yapılan çalışmada oksidatif hasarda koruyucu etkisinden bahsedilmektedir. İskemiden 15 dakika önce ve reperfüyondan hemen önce uygulanan intraperitoneal MESNA ile AST ve ALT ve karaciğer dokusunda ölçülen MDA değerlerinde anlamlı sonuçlar elde edilmiştir(45). Bizim çalışmamızda da intraperitoneal iskemiden 15 dak. önce uygulanan MESNA'da I/R nedeniyle yükselen AST, ALT değerlerinde belirgin azalma ve serum MDA değerlerinde de etkili sonuçlar elde edilmiştir. MESNA özellikle lipid peroksidasyonu üzerindeki negatif

etkisini serum MDA düzeylerindeki diğer gruplara göre daha anlamlı istatistiksel veriler ile göstermektedir.

Literatürde, MESNA'nın barsak mukozası üzerine koruyucu etki ile ilgili uygulama zamanı açısından yapılan çalışmada, iskemiden 60 dak. önce intraperitoneal verilen 100mg/kg dozun anlamlı olduğu gösterilmiştir(46). Çalışmada süperior mezenterik arterde oklüzyon oluşturarak 30 dak. iskemi uygulanmaktadır. Bu iskemiyi takibeden 60 dak. reperfüzyon periyoduna girilmektedir. İskemiden 60 dak. önce, iskemi başladığında ve reperfüzyon başlangıcında olmak üzere 3 noktada MESNA uygulanmıştır. İskemi başladığında ve reperfüzyon sırasındaki MESNA uygulamasında fark bulunmamıştır. Aynı çalışmada MESNA'nın tedavi edici etkisi için intraperitoneal uygulamadan bahsedilmektedir. Pratik kullanımda intraperitoneal uygulamanın, yüksek intravenöz enjeksiyona tercih edildiği ve her iki uygulama için absorpsiyonun eşit olduğunu belirtilmiştir. MESNA'nın iskemi başladığında veya reperfüzyon sırasındaki uygulama arasında fark olmamasını ise SMA oklüze edildiği için iskemide enjekte edilse bile bu etkinin reperfüzyonda görüleceğidir. MESNA'nın pik yaptığı plazma konsantrasyonuna ilk 10 dak. içinde ulaşılmakta, buna karşın mesna disülfid(MESNA'nın barsak ve renal epitelyum hücrelerinde indirgenmiş aktif formu) serum yarılanma ömrü farelerde intraperitoneal uygulanmasından 1,5 saat sonra olmaktadır. MESNA'nın iskemiden önce uygulamasından intestinal biopsiye kadar yaklaşık 2,5 saatlik bir süre geçtiğinden, MESNA'nın intestinal epitelyum üzerindeki koruyucu etkisi yalnızca ROR üzerindeki direkt temizleme eylemi ile değil, ek olarak enterositlerin I/R stresini tolere etmesi için bir çeşit hazırlık sağlamasıdır. Bu nedenle iskemiden 60 dak. önce etkinliği daha belirgindir. MESNA'nın peritoneal kaviteden hızlı absorpsiyona uğradığı için, iskemi periyodu süresince biriken ve reperfüzyonda üretilen ROR'ni temizlediği bildirilmiştir. Doz açısından 150 mg/kg kullandığımız ve iskemiden 15 dak. önce uyguladığımız MESNA tedavisinde, parankim hasarını gösteren biyokimyasal parametreler istatistiksel anlamlılık göstermektedir. Aynı zamanda MDA(lipid peroksidasyonunda önemli

gösterge) için MESNA tedavisinin diğer gruplara üstünlüğü görülmektedir. Parankim hasarında kullanılan parametreler için rhEPO ve MESNA arasında bir yakınlık varken, lipid peroksidasyonunu önlemede MESNA tedavisinin üstünlüğü dikkati çekmektedir($p<0,05$). Patolojik olarak istatistiksel anlamlılık göstermese de, nekrozun MESNA grubunda sadece 1 dokuda gözlenmesi bu sonucu desteklemektedir.

Çalışmamızda tek ajanlı veya kombine tedavi içeren tüm gruplarda kontrol grubuna göre AST, ALT, LDH ve MDA değerlerinde istatistiksel anlamlılık saptandı. Ama tekli tedavi modaliteleri ile kombine tedavi birebir karşılaştırıldığında AST ve ALT değerlerinde tekli ajan üstünlüğü gözlenirken, LDH ve MDA'da arada fark yoktu. Patolojik verilerde ise sadece kombine grubun kontrol grubu ile arasındaki farkı belirgindir. Biyokimyasal değerler ve patolojik sonuçlar birlikte ele alındığında tek anlamlı grup kombine tedavinin uygulandığı grup D olarak gözükmetedir. Sonuçta her ne kadar AST ve ALT değerlerindeki yüksekliği azaltmada tekli tedavilerin etkinliği daha belirgin olsa da, bunların patolojik verilerde yetersizliği söz konusudur.

MESNA ve rhEPO iki farklı ajan gibi gözükse de, NF- κ B reseptör üzerindeki etki bazında ve lipid peroksidasyonunu önlemede etki mekanizmaları benzerdir. Bu iki farklı görünen ama etki mekanizmalarındaki birlikteğin sinerjik etkiye sebep olduğu düşünmekteyiz. Kombine tedavinin akciğer I/R hasarı üzerindeki sinerjik etkinin varlığını araştıran bir çalışmada, tek ajan rejimli tedavilerden daha düşük dozda bile koruyucu etkinin görüldüğü bildirilmektedir. Tabii ki bu etki için, iki farklı ajanın ayrı basamaklara aynı mekanizmalarla etkili olmasının önemi belirtilmektedir. Literatürde geçen bir başka kombine tedavide ise karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine melatonin ve N-asetilsisteinin yararlı etkisinden bahsetmektedir(47). Yine literatürde N-asetilsistein ile mannitolün beraber kullanıldığı akciğer reperfüzyon hasarındaki etkiden bahsedilmektedir(48). Bu iki ajanda farklı basamaklarla antioksidan etki oluşturmaktadır. Bu çalışmada da kombine tedavi tek ajan uygulamalarından daha etkili gözükmetedir.

I/R hasarında birden çok yola etki eden ve özellikle klinik kullanımda pratik olması nedeniyle bileşik ajanlarla tedavilere değinilmiştir. rhEPO bunlardan biri olarak oldukça etkili bir ajandır. Sadece doku spesifik reseptörlerinin tanımlanması, zamanlamanın netliği ve doz-bağımlı etkisinin net bir şekilde ortaya konulması gereklidir. Bu anlamda, çalışmamızdaki verilerle iskemiden önce 3000 IU/kg ile 5000IU/kg verilen dozun etkilerini daha net ortaya koyacağı görüşündeyiz. Tabii ki bunun üzerine eklenebilecek yine aynı yapıda başka bir molekül ile kombine edilmesinin sonuçları görülmeye değerdir.

Sonuç olarak, her ne kadar pleotropik ajanlar(birden fazla yolda etkili tek bileşik) klinik kullanımda daha avantajlı olarak gösterilse de, kombine tedavi etkilerin ortaya çıkmasında daha anlamlı gibi gözükmektedir. Reperfüzyon fazındaki tetiği çeken mekanizmada birçok yolda etkili bir ajan olan rhEPO yerine, hem iskemideki hücresel değişiklikleri stabilize eden hem de enflamatuar sürece etkili kombine tedaviler daha akla yatkın olabilir..

KAYNAKLAR:

1. Taniguchi M, Magata S, Suzuki T, et al. Dipyridamole protects the liver against warm ischemia and reperfusion injury. *J Am Coll Surg* 2004;198:758.
2. Banga NR, Homer-Vanniasinkam S, Graham A, Al-Mukhtar A, White SA, Prasad KR. Ischaemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver. *British Journal of Surgery* 2005; 92:528–538.
3. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:15-26. Review.
4. Jaeschke H. Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998;5:402-8. Review.
5. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000;32:169-73.
6. Cutrn JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Rosell Catafau J, Poli G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1200–1208.
7. Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery* 1995; 117:195–200.
8. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia–reperfusion. *Am J Pathol* 1994;145: 1421–1431.
9. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-2012.
10. McCuskey RS. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. *Liver* 2000;20:3-7.
11. Ming Z, Han C, Lutt WW. Nitric oxide mediates hepatic arterial vascular escape from norepinephrine-induced constriction. *Am J Physiol* 1999;277:1200–1206.
12. Gauthier TW, Davenpeck KL, Lefer AM. Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1994;267:562–568.
13. Mittal MK, Gupta TK, Lee FY, Sieber CC, Groszmann RJ. Nitric oxide modulates hepatic vascular tone in normal rat liver. *Am J Physiol* 1994;267:416–422.
14. Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, Seok JH, Lee JH. Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:917-922.

15. Doulias PT, Barbouti A, Galaris D, Ischiropoulos H. SIN-1-induced DNA damage in isolated human peripheral blood lymphocytes as assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay). *Free Radic Biol Med* 2001;30:679-685.
16. Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett* 2003;140-141:105-112.
17. de Groot H, Rauen U. Ischemia-Reperfusion Injury: Processes in Pathogenetic Networks: A Review. *Transplantation Proceedings* 2007;39: 481–484.
18. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, Clinical Manifestations and Prevention of Ischemia–Reperfusion Injury. *Anesthesiology* 2001;94:1133–8.
19. Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, Davidson BR, Seifalian AM. The Contemporary Role of Antioxidant Therapy in Attenuating Liver Ischemia-Reperfusion Injury: A Review. *Liver Transpl* 2005;11:1031-1047.
20. Gressier B, Lebegue S, Brunet C, Luyckx M, Dine T, Cazin M, Cazin JC. Pro-oxidant properties of methotrexate: evaluation and prevention by anti-oxidant drug. *Pharmazie* 1994;49:679–81.
21. Sener G, Sehirli O, Cetinel S, Yeğen BG, Gedik N, Ayanoğlu-Dülger G. Protective effects of MESNA(2-mercaptoethane sulphonate) against acetaminophen-induced hepatorenal oxidative damage in mice. *J. Appl. Toxicol.* 2005;25: 20–29.
22. Adams JD, Lauterburg BH, Mitchell JR. Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat: regulation and response to oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* 1983;227:749.
23. Briviba K, Sies H. Non enzymatic antioxidant defense system. In: Frei B,ed. *Natural antioxidants in human health and disease*. San Diego: Academic Pres, 1994:107-128.
24. Gressier B, Lebegue N, Brunet C, Luyckx M, Dine T, Cazin M, et al. Scavenging of reactive oxygen species by letosteine, a molecule with two blocked -SH groups. Comparison with free -SH drugs. *Pharm World Sci* 1995: 17: 76–80.
25. Schuster SJ, Koury ST, Bohrer M, Salceda S, Caro J. Cellular sites of extrarenal and renal erythropoietin production in anaemic rats. *Br. J Haematol.* 1992;81:153-159.
26. Lacombe C, Mayeux P. Biology of erythropoietin. *Haematologica* 1998;83:724-732.
27. Liu X, Xie W, Liu P, et al: Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion. *Life Sci* 2006;78:2255.
28. Liu X, Shen J, Jin Y, Duan M and Xu J. Recombinant human erythropoietin (rhEPO) preconditioning on nuclear factor-kappa B (NF -kB) activation & proinflammatory cytokines induced by myocardial ischaemia-reperfusion. *Indian J Med Res.* 2006: 124: 343-354.

29. Coleman TR, Westenfelder C, Tögel FE, et al. Cytoprotective doses of erythropoietin or carbamylated erythropoietin have markedly different procoagulant and vasoactive activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:5965-5970.
30. Menger MD, Vollmar B: Role of microcirculation in transplantation. *Microcirculation* 2000;7:291.
31. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 1994;55:662.
32. Menger MD, Vollmar B. Pathomechanisms of ischemia-reperfusion injury as the basis for novel preventive strategies: Is it time for the introduction of pleiotropic compounds? *Transplantation Proceedings* 2007;39:485-488.
33. Ambros JT, Herrero-Fresneda I, Borau OG, Boira JM. Ischemic preconditioning in solid organ transplantation: from experimental to clinics. *European Society for Organ Transplantation* 2007;20:219–229.
34. Beleslin-Cokic BB, Cokic VP, Yu X et al. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood* 2004;104:2073-2080.
35. Chatterjee PK. Pleiotropic renal actions of erythropoietin. *Lancet* 2005;365:1890–92.
36. Sepodes B, Maio R, Pinto R, Sharples E, Oliveira P, McDonald M, Yaqoob M, Thiemermann C and Mota-Filipe H. Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *European Society for Organ Transplantation* 2006;19:919–926.
37. Brines M, Cerami A. Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: Biology and clinical promise. *Kidney International* 2006;70:246–250.
38. Patel NS, Sharples EJ, Cuzzocrea S, et al. Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney in vivo. *Kidney Int* 2004;66:983.
39. Sharples EJ, Patel N, Brown P, Stewart K, Mota-Philipe H, Sheaff M, Kieswich J, Allen D, Harwood S, Raftery M, Thiemermann C, And Yaqoob MM. Erythropoietin Protects the Kidney against the Injury and Dysfunction Caused by Ischemia-Reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2115–2124.
40. Yang CW, Li C, Jung JY, Shin SJ, Choi BS, Lim SW, Sun BK, Kim YS, Kim J, Chang YS, Bang BK. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB J* 2003;17:1754.
41. Bogoyevitch MA. An update on the cardiac effects of erythropoietin cardioprotection by erythropoietin and the lessons learnt from studies in neuroprotection. *Cardiovasc Res* 2004;63:208-16.

42. Lipsic E, van der Meer P, Henning RH, Suurmeijer AJ, Boddeus KM, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG. Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44:473-9.
43. Wu H, Ren B, Zhu J, Dong G, Xu B, Wang C, Zheng X, Jing H. Pretreatment with recombinant human erythropoietin attenuates ischemia—reperfusion-induced lung injury in rats. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 2006;29:902—907.
44. Ates E, Yilmaz S, Ihtiyar E, Yasar B, Karahuseyinoglu E. Preconditioning-like amelioration of erythropoietin against laparoscopy-induced oxidative injury. *Surg Endosc.* 2006;20:815–819.
45. Sener G, Sehirli O, Ercan F, Sirvanci S, Gedik N, Kacmaz A. Protective effect of MESNA (2-Mercaptoethane Sulfonate) against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Surg. Today* 2005;35: 575-580.
46. Ypsilantis P, Lambropoulou M, Tentis I, Kortsaris A, Papadopoulos N, Simopoulos C. Mesna Protects Intestinal Mucosa from Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of Surgical Research* 2006;134:278–284.
47. Sener G, Tosun O, Sehirli AO, Kaçmaz A, Arbak S, Ersoy Y, Ayanoğlu-Dülger G. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sci.* 2003;72:2707-18.
48. Weinbroum AA. Concomitant administration of mannitol and N-acetylcysteine for the prevention of lung reperfusion injury. *J Trauma* 2006;60:1290-6.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim esnasında bilgi, beceri ve deneyimleriyle bana ışık tutan başta Prof. Dr. Yılmaz ÖZEN olmak üzere tüm Genel Cerrahi AD öğretim üyelerine en içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Eğitimim boyunca beraber olmaktan keyif aldığım araştırma görevlisi arkadaşlarıma, deney hayvanları çalışma ortamında destek veren Dr. Cem ARSLAN, çalışmamdaki patolojik sonuçların oluşturulmasında emeği geçen Prof. Dr. Ömer YERCİ ve Uzm.Dr.Berna ÇALIŞIR'a, istatistiksel analizler için Dr. Semra AKGÖZ'e, biyokimyasal verilerin elde edilmesinde Dr. Emre SARANDÖL'e ve tüm Genel Cerrahi çalışanlarına gösterdikleri yakın dostluk için teşekkürlerimi sunarım.

UÜTF Genel Cerrahi yolculuğum boyunca sığındığım tek limanım olan abim Dr. Ersin ÖZTÜRK'e sonsuz teşekkürler.

En önemlisi hayatımın her nefesinde bana oksijen sağlayan eşsiz aileme ve tüm yüreğiyle yolumu aydınlatan Dr. Birol SARKUT'a teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

7.Haziran.1979 tarihinde İzmir'de doğdum. İlköğrenimimi Emlak Bankası İlkokulu'nda, orta öğrenimimi Emlak Bankası Ortaokulu'nda ve lise öğrenimimi Karşıyaka Gazi Lisesi'nde tamamladım. 1995 yılında girmeye hak kazandığım Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 2001 yılında mezun oldum. 2002 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Genel Cerrahi AD'da göreve başladım.