

Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarında Karnozinin Profilaksi ve Sağaltım Etkileri

Prophylactic and Therapeutic Effects of Carnosine in Ischemia Reperfusion Injury of Liver

Dr. Başak BAYKARA,^a
Dr. Işıl TEKMEK,^a
Serap CİLAKEK MİCİLİ,^a
Dr. Ülker SÖNMEZ,^a
Dr. Güven ERBİL,^a
Dr. Seda ÖZBAL,^a
Dr. Candan ÖZOĞUL^b

^aHistoloji ve Embriyoloji AD,
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,
İzmir

^bHistoloji ve Embriyoloji AD,
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Ankara

Geliş Tarihi/Received: 09.06.2009
Kabul Tarihi/Accepted: 12.01.2010

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Başak BAYKARA
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji AD, İzmir,
TÜRKİYE/TURKEY
basak.baykara@deu.edu.tr

ÖZET Amaç: Karaciğer iskemisi ve ardışık reperfüzyon, hepatosit hasarı ve apoptozis ile sonuçlanmaktadır. Bu çalışmanın amacı ratlarda karaciğer iskemisi/reperfüzyon (İR) hasarında, antioksidan karnozinin profilaksi ve sağaltım uygulamasının etkilerini incelemektir. **Gereç ve Yöntemler:** Bu çalışmada Wistar Albino dişi sıçanlardan oluşan beş grup oluşturuldu: I: Kontrol grubu, II: İR grubu, III: Profilaksi grubu (Karnozin + İR), IV: Sağaltım grubu (İR + Karnozin), V: Profilaksi+Sağaltım grubu (Karnozin +İskemi/ reperfüzyon+ Karnozin). Total hepatic iskemisi 30 dakika, reperfüzyon bir hafta uygulandı. Karnozin 100mg/gün/bir hafta verildi. Alınan doku örnekleri histopatolojik, immünohistokimyasal ve ultrastrüktürel inceleme için hazırlandı. Ayrıca serumda ALT ve AST düzeyleri ölçüldü. **Bulgular:** İR grubunda nötrofilik infiltrasyon, sinuzoidal dilatasyon ve konjesyon, bazı alanlarda nekrotik hepatositler izlendi. Ultrastrüktürel incelemelerde ise mitokondriyal şişme ve granüllü endoplazmik retikulum (GER) sistemlerinde dilatasyon görüldü. Profilaksi grubunda birkaç Disse aralığında lokalize kollagen fibrilleri saptandı. Sağaltım grubunda da GER sistemleri dilatatedi. Profilaksi+Sağaltım grubunda tüm hücresel yapılar kontrol grubuyla benzerlik gösterdi. İR grubunda TUNEL-pozitif hepatosit sayısı kontrol grubuna göre fazlaydı. Bax işaretlemesinde ise İR grubundaki hepatositlerde kuvvetli boyanma saptandı. Bununla birlikte apoptotik hücre sayısı, en az Profilaksi+Sağaltım grubundaydı. Bunu Profilaksi grubu, sonrasında Sağaltım grubu takip etmekteydi. İR grubundaki hücrelerde Bcl-2 immunreaksiyonu gözlenmezken, Profilaksi+Sağaltım grubunda kuvvetli boyanma saptandı. **Sonuç:** Karaciğer İR hasarında karnozinin profilaksi ya da sağaltım şeklinde verilmesi yerine, profilaksi+sağaltım şeklinde uygulanması apoptozu ve yapısal değişiklik oluşumunu önlemektedir.

Anahtar Kelimeler: Reperfüzyon hasarı; karaciğer; karnozin; apoptoz; ultrastrüktür

ABSTRACT Objective: Ischemia followed by reperfusion (IR) results in hepatocyte injury and apoptosis. Current study aims to investigate the prophylactic and therapeutic effects of antioxidant carnosine in liver ischemia and reperfusion injury in rats. **Material and Methods:** Five groups were formed with Wistar Albino female rats: Control group, IR group, Prophylaxis group (Carnosine and IR), Therapeutic group (IR + Carnosine), Prophylaxis and therapeutic group (Carnosine + IR + Carnosine). Total hepatic ischemia for 30 minutes and reperfusion for one week were administered. Carnosine was given with 100 mg/day for one week. Tissue samples were prepared for histopathological, immunohistochemical and ultrastructural assessment. In addition, serum ALT and AST levels were determined. **Results:** In IR group, neutrophilic infiltration, sinusoidal dilatation, congestion and necrotic hepatocytes in some areas were observed. Ultrastructural assessment showed mitochondrial swelling and dilatation in granular endoplasmic reticulum (GER) cisterns. In prophylaxis group, localized collagen fibrils were observed in some Disse spaces. GER cisterns were dilated in therapeutic group. All cellular structures of prophylaxis and therapeutic group were similar to control group. In IR group, TUNEL positive hepatocyte count was higher than control group. In IR group, there was strong Bax labeling in hepatocytes. However, apoptotic cell count was the smallest in prophylaxis and therapeutic group followed by therapy after prophylaxis group. In IR group, Bcl-2 immune reaction was not observed whereas there was strong expression in prophylaxis and therapeutic group. **Conclusion:** In IR injury of liver, administration of carnosine in both prophylaxis and therapy instead of solely therapeutic or prophylactic administration prevents the apoptosis and structural changes.

Key Words: Reperfusion injury; liver; carnosine; apoptosis; ultrastructure

İskemi, hücre enerji düzeyinin düşmesine ve toksik metabolitlerin dokuda birikimine yol açarak hücre fonksiyon bozukluğundan hücre ölümüne kadar giden bir dizi biyokimyasal reaksiyonu başlatır. İskemik dokunun tekrar kanlanması reperfüzyondur ve enerji gereksiniminin giderilmesi ve toksik metabolitlerin ortamdan uzaklaştırılması için gereklidir. Ancak iskemi sırasında oluşmuş toksik metabolitlerin ve çeşitli inflamatuvar mediatörlerin sistemik dolaşıma verilmesi ile ciddi metabolik bozukluklar oluşabilir ve reperfüzyon daha ileri doku hasarına yol açabilir.¹ İskemi reperfüzyon hasarı (İRH), hipoksik organın tekrar oksijenlenmesi ardından ortaya çıkan hücre hasarlanmadır. Karaciğerde İRH, ilk kez 1975'te Toledo-Pereyra ve arkadaşlarının deneysel olarak gerçekleştirdikleri karaciğer naklinde gözlenmiştir.² Nakledilmiş karaciğerde konjesyon, ilerleyici trombozis ve organ yetmezliği ile sonuçlanan greft nekrozu gelişmiştir.²

Karaciğer İRH patofizyolojisi, karaciğer hasarına yol açan birçok mekanizmanın devreye girmesinden meydana gelir. Kupffer hücre aktivasyonu, reaktif oksijen türlerinin oluşumu, sitokin ve kemokin salgılanması, vazokonstriksiyon, nitrik oksit ve endotelin dengesindeki bozulma, nötrofil lökositlerin (NL) toplanması, mitokondriyal geçirgenliğin değişikliğe uğraması, kalsiyumun hücre içine dengelenmemiş geçişi ve pH paradoksu gibi çeşitli hücre hasarları ve moleküler etkileşimler söz konusudur.³⁻⁵

İskemi reperfüzyon hasarına uğramış karaciğerde ışık mikroskopik inceleme yapıldığında NL infiltrasyonu, bölgesel hemoraji ve nekroz, konjesyon, sinuzoid ve lenfatik genişleme, bölgesel hepatoselüler vakuolizasyon ve hepatosit şişmesi,^{6,7} ultrastrüktürel inceleme yapıldığında ise mitokondriyal yapıda bozulma, şişme, boyanma farklılıkları ve NL birikimi gözlenir.^{8,9}

Apoptoz, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Hücre içinden veya dışından gelen ölüm sinyalleri ile başlar.^{10,11} Karaciğer hastalıklarında apoptoz, inflamatuvar yanıt uyarılmadan

hepatositlerin ortamdan uzaklaştırılmasını sağlar. Karaciğer İRH'sinde oluşan hücre ölümünde apoptoz merkezi rol oynar.^{12,13} Bcl-2 mitokondriyal membran proteindir. Apoptotik kaskadın çeşitli aşamalarında rol oynar. Bcl-2 ailesinde hem anti-apoptotik (Bcl-2) hem de proapoptotik (Bax) moleküller yer alır.¹⁴ Bax ve Bcl-2'nin işlevlerinin mitokondriyal membranla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bax, sitokrom c salınımına neden olur, böylece kaspaz 9- aktivasyonu ile apoptotik hücre ölümü gerçekleşir. Bcl-2 ise mitokondride gerçekleşen bu değişiklikleri engeller. Bax ve Bcl-2 gibi pro- ve anti-apoptotik proteinler hepatik İRH'de apoptotik hücre ölümünü düzenlemede kilit rolleri üstlenir.¹⁵ TUNEL yöntemi ise hücrelerde DNA kırıklarını görünür hale getirir ve birçok çalışmada kullanılmıştır.^{16,17}

Karnozin (KAR) (β -alanyl-L-histidine) suda erime özelliğine bağlı olarak, suda çözünen oksidasyon mediatörlerinin (metaller ve oksijen radikalleri) yüksek olduğu sitozolde fonksiyon görür. Aktif oksijen radikallerini temizleyen biyolojik fonksiyonuna bağlı olarak antioksidan özelliğe sahiptir. Hidroksil ve süperoksit radikallerinin ve çok kuvvetli olarak da singlet oksijen molekülünün temizleyicisidir. Bu özelliği nedeniyle beyin, böbrek ve iskelet kası, karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında KAR'ın koruyucu etkisi araştırılmış ve olumlu sonuç alınmıştır.¹⁸⁻²⁵

Bu bilgiler ışığında, literatürde KAR'ın karaciğer İRH'si üzerine profilaksi ve sağaltım etkisini ışık mikroskopik, elektron mikroskopik, immunohistokimyasal, biyokimyasal olarak inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Biz bu çalışmamızda KAR'ın koruyucu ve sağaltım etkisini, histolojik (Hematoksilen-eosin), ultrastrüktürel (TEM), immunohistokimyasal (Bax, Bcl-2, TUNEL) ve biyokimyasal parametrelerle (ALT, AST) karşılaştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarından elde edilen 200-250 g Wistar Albino dişi sıçanlar kullanıldı. Denekler çalışma öncesinde 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık, 20-22°C oda sıcaklığında barındırıldı.

Hayvanlar dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslendi. Deney protokolü Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu tarafından onaylandı (Protokol No:32). Kontrol grubunda beş, diğer deney gruplarında sekiz sıçan olacak şekilde beş çalışma grubu oluşturuldu.

1. Kontrol grubu,

2. İR grubu: İskemi / reperfüzyon

3. Profilaksi (P) grubu: Karnozin 100mg/gün/bir hafta + iskemi / reperfüzyon

4. Sağaltım (S) grubu: İskemi/reperfüzyon + Karnozin 100mg/gün/ bir hafta)

5. Profilaksi + Sağaltım (P+S) grubu: Karnozin 100mg/gün/ bir hafta + iskemi / reperfüzyon + Karnozin 100mg/gün/ bir hafta.

Kontrol grubuna bir hafta boyunca oral yoldan gastrik sonda ile serum fizyolojik (100mg/kg/gün) verildi. Bir hafta tamamlandığında batin açılıp damarlar görünür hale getirildi ve tekrar suture edilerek kapatıldı. İşlem sonrası bir hafta boyunca oral yoldan gastrik sonda ile serum fizyolojik (100mg/kg/gün) verilmeye devam edildi.

İR grubuna iskemi yapılmadan önce bir hafta (100mg/kg/gün) ve iskemi yapıldıktan sonra bir hafta oral yoldan gastrik sonda ile serum fizyolojik (100mg/kg/gün) verildi.

P grubuna iskemi yapılmadan önce bir hafta boyunca oral yoldan gastrik sonda ile KAR (Fluka-BioChemika/USA) (100mg/kg/gün) verilip iskemi uygulanmasından sonra bir hafta boyunca oral yoldan gastrik sonda ile serum fizyolojik (100mg/kg/gün) verildi.²⁶

S grubuna, iskemi öncesi bir hafta boyunca oral yoldan gastrik sonda ile serum fizyolojik (100mg/kg/gün) verilip iskemi sonrası bir hafta boyunca oral yoldan gastrik sonda ile KAR (100mg/kg/gün) verildi.

P+S grubuna iskemi öncesi bir hafta ve iskemi sonrası bir hafta boyunca oral yoldan gastrik sonda ile KAR (100mg/kg/gün) verildi.

Denekler iskemi yapılmadan bir gece önce aç bırakıldı. Sabah 40mg/kg intraperitoneal pentobar-

bital sodyum anestezisi uygulandı. Anestezi altında deneklere orta hat kesi ile laparotomi yapıldı. Hepatik pedikül serbestleştirildikten sonra silikon yastıklı atravmatik klemp total hepatik iskemi amacıyla hepatik arter, portal ven ve safra duktusuna konularak 30 dakika süreyle uygulandı.²⁷ İskeminin ardından bir hafta reperfüzyon uygulanıp deney sonlandırıldı. Deney sonlandırılmadan bir gece önce denekler aç bırakıldı ve sabah 40mg/kg intraperitoneal pentobarbital sodyum anestezisi uygulandı. Anestezi devam ederken abdominal aortadan karaciğer enzimlerini ölçmek üzere 2 ml kan örneği alındı. Alınan doku örneklerinin bir bölümü 1 mm³lük parçalara ayrılarak transmisyon elektron mikroskopik inceleme için %2.5'lük gluteraldehit içine alındı (ayrıntılı prosedür aşağıda belirtildi). Işık mikroskopik inceleme için ayrılan diğer örnekler ise %10' luk tamponlu formalinde (pH= 7) tespit edilerek alışımlı parafin bloklama yöntemine tabi tutuldu. Elde edilen bloklardan alınan kesitler (Olympus BH-2 Tokyo, Japan) mikroskopunda incelenerek yüksek çözünürlüğe sahip kamera (JVC TK-890E, Japan) ile görüntülendi.

TUNEL METODU

Bu teknik için Dead End Colorimetric TUNEL system kiti (G7130, Promega, USA) kullanıldı. 60 °C'de deparafinize edilen kesitler alkol serileri ile rehidrate edilip suya getirildikten sonra, 10 dakika 20 µg/ml proteinase K ile inkübe edildi ve ardından üç defa beşer dakika tampon solüsyonu ile yıkandı. Doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H₂O₂ uygulandıktan sonra, %4'lük paraformaldehit ile post fiksasyon yapıldı. Beş dakika equilibration tampon solüsyonu uygulanan kesitler, TdT-enzimi ile 37°C'de bir saat inkübe edildi. Ardından tampon solüsyonu ile oda sıcaklığında 10 dakika yıkanan kesitler, anti-streptavidin-peroksidaz ile 30 dakika inkübe edildi. Tampon solüsyonu ile tekrar yıkanan kesitler TUNEL reaksiyonunun görünürliğini saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlanan kesitler dehidrate edilip şeffaflaştırıldıktan sonra entellan ile kapatıldı. Örnekler mikroskopta incelenip (Olympus BH-2 Tok-

yo, Japan) yüksek çözünürlüğe sahip kamera (JVC TK-890E, Japan) ile görüntüledi. Apoptotik hücrelerin kantitatif değerlendirmesi, gruplar açısından kör bir araştırmacı tarafından yapıldı. Her kesitte, x20 büyütmede, rastgele on alan, yaklaşık 200 hücre sayılarak değerlendirildi.²⁸

İMMUN İŞARETLEME YÖNTEMİ

İki immün işaretleme yöntemi için de primer antikor yöntemine kadar ortak prosedür uygulandı. Kesitler 24 saat 60°C etüvde bekletildikten sonra 30'ar dakika, iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda beş dakika bekletildi. Dakopen (IM3580, Immunotech, France) ile sınırlandırılan kesitler %0.5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutuldu; ardından doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla beş dakika %3'lük H₂O₂ uygulandı. Üç defa beşer dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution) ile yıkanan kesitler bir saat blokama solüsyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar olan Bax (sc-7480, Santa Cruz, California, USA) ve Bcl-2 (MS-123, Neomarkers, Lab Vision) ile bir gece +4°C'de inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile üç defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikor (85-9043 Zymed Histostain kit San Francisco, USA) ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa beşer dakika tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidin x= (DAB) (Zymed 00-2020, San Francisco, CA, USA) kullanılarak görünür hale getirildi. Mayer's hematoksilen (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile on dakika yıkanan kesitler, kapatma entellan ile kapatıldı. Değerlendirme gruplar açısından kör bir araştırmacı tarafından yapıldı. Her doku kesiti için rastgele beş alan seçilerek, skorlama "yok (-), zayıf (+), orta (++) ve kuvvetli boyanma (+++)" olmak üzere semi-kantitatif yöntem ile yapıldı.²⁹

ELEKTRON MİKROSKOPİK İNCELEME YÖNTEMİ

Dokular %2.5'lik gluteraldehit [0.1 M Sorenson's phosphate buffer (pH 7.2) ile dilue] içine alındı. Sorenson fosfat tamponu ile 3-4 kez değiştirilerek 15-20 dakika yıkandı. Bir birim Sorenson fosfat tamponu, bir birim osmium tetraoksit solüsyonu karışımında bir saat bekletildi. PBS ile 15-20 dakika yıkandı. Bu aşamada bir gece bekletildi. Ardından %70 alkol ile 10 dakika, %100 alkol ile 10 dakika, %100 alkol ile 10 dakika, propilen oksit ile 15 dakika, propilen oksit ile 15 dakika dehidratasyon işlemi yapıldı. Dokular 1:1 oranında propilen oksit + araldit karışımına alındı. Oda sıcaklığında bir saat bekletildi. Arada hafif hareketlerle karıştırıldı. Daha sonra dokular saf araldit içine alındı. Oda ısısında 6-12 saat bekletildi. Yeni araldit içine alınan dokular iki saat bekletildi. Dokular araldit ile kapsüllere gömüldü. Polimerizasyon için 60°C'lik etüvde 24 saat bekletildi. Örneklerden ultratom (Leica Ultracut R, Germany) ile 1 µ kalınlığında yarı ince kesitler alındı, kesitler toluidin blue ile boyandı. Bakır gridlere alınan ince kesitler kurşun sitrat ve uranil asetat ile boyandıktan sonra, Carl Zeiss 900 transmisyon elektron mikroskobunda incelendi.

ALT VE AST DÜZEYİ

Tüm kan örnekleri santrifüj edildikten sonra plazmadan ayrıştırıldı. Elde edilen serum örneklerinde ALT ve AST düzeyleri, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Biyokimya Laboratuvarında otoanalizör ile ölçüldü.

İstatistiksel Değerlendirme

Veriler, istatistiksel yönden SPSS 11.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) analiz programı kullanılarak Mann Whitney U ve Kruskal Wallis Varyans analizi ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak anlamlılık P< 0.05 olarak kabul edildi. Tüm veriler ortalama ± standart hata (SH) olarak belirtildi.

BULGULAR

İŞİK MİKROSKOBİK BULGULAR

Kontrol grubunda karaciğer genel yapısı ve özellikleri normal görünümdeydi.

İR grubunda inflamasyon, NL infiltrasyonu, konjesyon, sinuzoidlerde genişleme, periferik he-

patositlerde şişme, sentral ven çevresindeki hepatositlerde ise nekrotik ve apoptotik görünüm saplandı.

P grubunda hepatosit kordonları düzenli idi ancak yer yer sinuzoid dilatasyonları gözlemlendi.

S grubunda yoğun şekilde sinuzoid dilatasyonları, yer yer NL infiltrasyonları ve izole hepatosit nekrozu gözlemlendi.

P+S grubunda genel görünüm kontrol grubuna benzemekle beraber, nadir olarak bazı alanlarda sinuzoid dilatasyonu ve NL infiltrasyonu gözlemlendi (Resim 1).

ULTRASTRÜKTÜREL BULGULAR

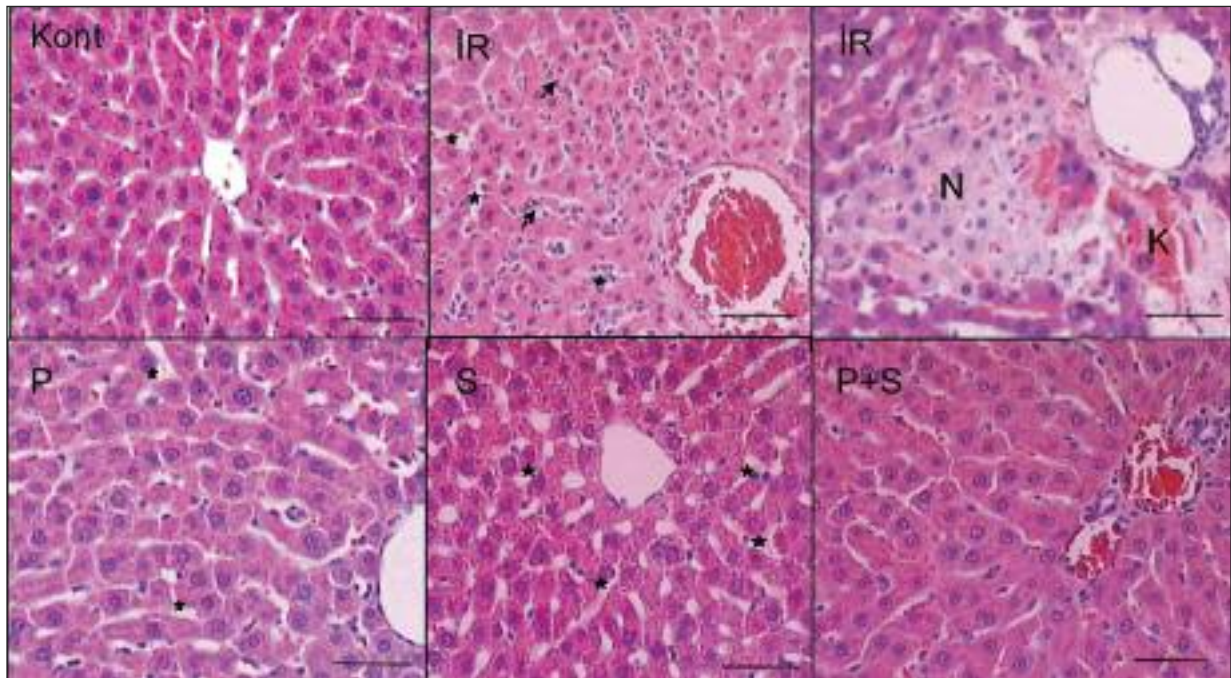
Kontrol grubunda, mitokondriler normal görünümde ve homojen dağılımda, glikojen granülleri normal miktarda, Disse aralığı, sinuzoid duvarı ve safra kanalikülü normal görünümde izlendi (Resim 2).

İR grubunda ise, portal alanda kollagen lif artışı belirgindi. Periferik hepatositlerde ışık mikroskopik olarak gözlenen şişmenin bu hücrelerde yer alan geniş vakuollerden kaynaklandığı belirlendi. Bu hücrelerde mitokondriyal yapıda bozulma, şiş-

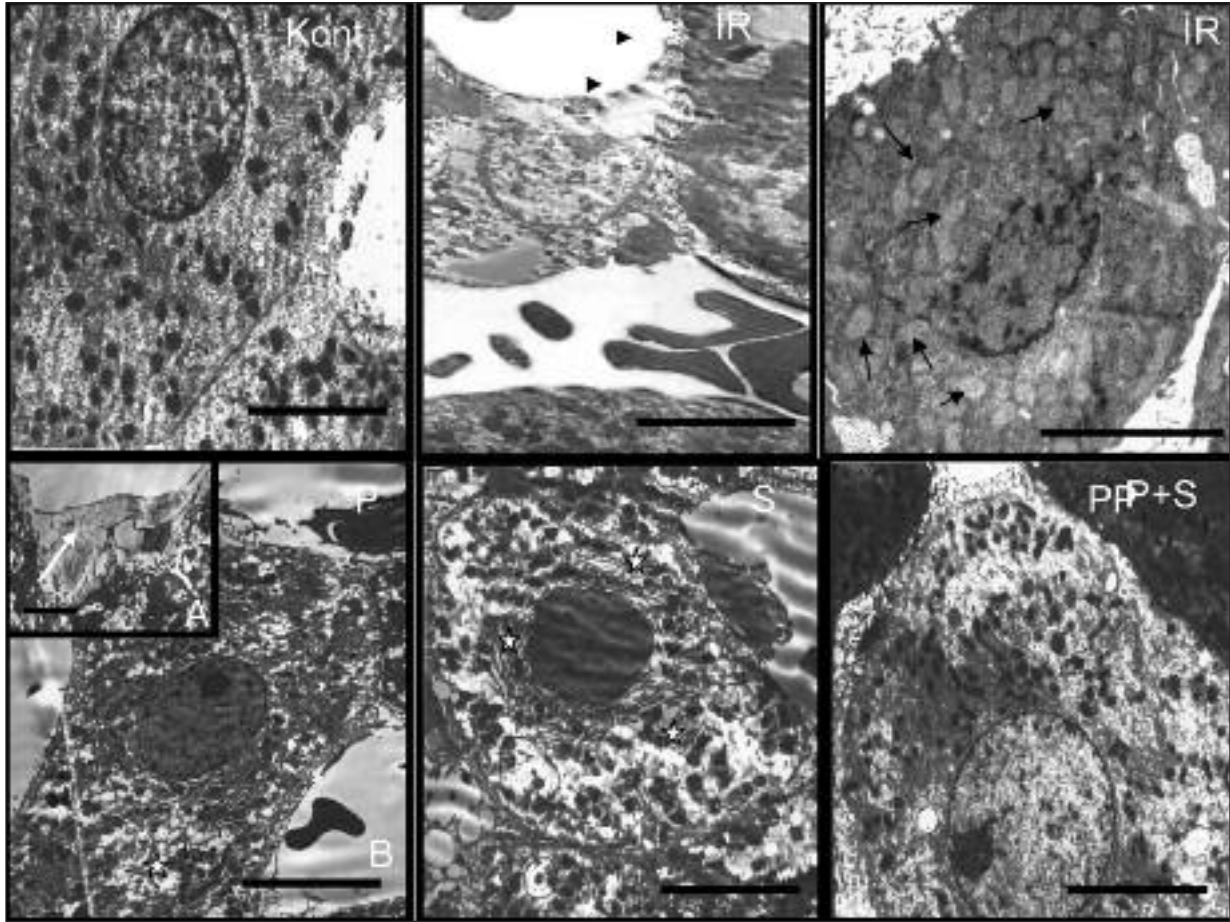
me, granüllü endoplazmik retikulum (GER) sisternalarında dilatasyon, hücreler arasında elektron densite farklılığı vardı ve bazı hücrelerde hücre zarı bütünlüğünün bozulduğu gözlemlendi. Işık mikroskopik olarak nekrotik ve apoptotik olduğu düşünülen hücreler de ince yapı düzeyinde ayırt edildi. Ayrıca hepatositlerin Disse aralığına bakan yüzlerinde mikrovillus yapısı yok denecek kadar azdı ve Disse aralığı genişlemişti (Resim 2).

P grubunda, hepatositlerin çekirdekleri normal, çekirdek arkı belirgindi. GER sisternaları gelişkindi. Mitokondriler ve Disse aralığına doğru uzanan mikrovilluslar normal seyir göstermekteydi. Disse aralığında var olan tip III kollagen yapısı belirgin olarak dikkati çekti. Safra kanaliküllerinde yer yer normal yapı, yer yer dilatasyonlar izlendi (Resim 2).

S grubunda, GER sisternaları çekirdek periferine yerleşik, dilate olarak gözlemlendi. Mitokondrilerin genellikle çekirdek periferinde ve hücre zarı altında yoğunlaştığı, sitoplazmanın diğer alanlarında glikojen granüllerinin olduğu belirlendi. Safra kanaliküllerinin bazıları dilate, mikrovilluslar sayıca azalmış olarak gözlemlendi (Resim 2).



RESİM 1: Işık mikroskopik değerlendirme (Hematoksilen-Eosin) Kontrol grubunda normal karaciğer görünümü. S ve İR grubunda belirgin sinuzoid dilatasyonu (*) gözlenmektedir. Ayrıca İR grubunda NL infiltrasyonu (→) bulunmaktadır. Ayrıca İR grubunda yer yer kanamalı (K) ve nekrotik alanlar (N) gözlenmiştir (Bar 50µm).



RESİM 2: Transmission elektron mikroskopu (TEM) mikrofotografaları (▶; Zar bütünlüğü bozulması),(▶▶;Mitokondriyal kristalizis,(→); Kollagen fibrilleri), (+; GER sistenalarında dilatasyon), Bar = 5000 nm. (GER: Granüllü endoplazmik retikulum)

P+S grubunda, GER sistenalarının çekirdek periferinde lokalize, sayıca çok ve düzenli olduğu gözlemlendi. Mitokondri-GER ilişkisinin belirgin olması hepatositlerin aktivasyon durumunda olduğunu düşündürdü. Hepatositlerde normal yapıda ve miktarda glikojen saptandı. Sinuzoid duvarı, Disse aralığı ve safra kanalikülleri normal görünümdeydi (Resim 2).

İMMUNOHİSTOKİMYASAL İŞARETLEME BULGULARI

Bax ile yapılan immün işaretlemede kontrol grubunda boyanma gözlenmezken, İR grubunda kuvvetli, P grubunda zayıf, S grubunda zayıf/orta, P+S grubunda ise kontrol grubuna yakın boyanma gözlemlendi. Bcl-2 işaretlemede ise kontrol grubunda kuvvetli pozitif boyanma gözlenirken, İR grubunda işaretlenen hücre gözlenmedi. P grubunda orta, S grubunda zayıf tutulum olduğu dikkati çekti. P+S grubu ise kontrol grubu ile benzer reaksiyon gösterdi (Tablo 1) (Resim 3).

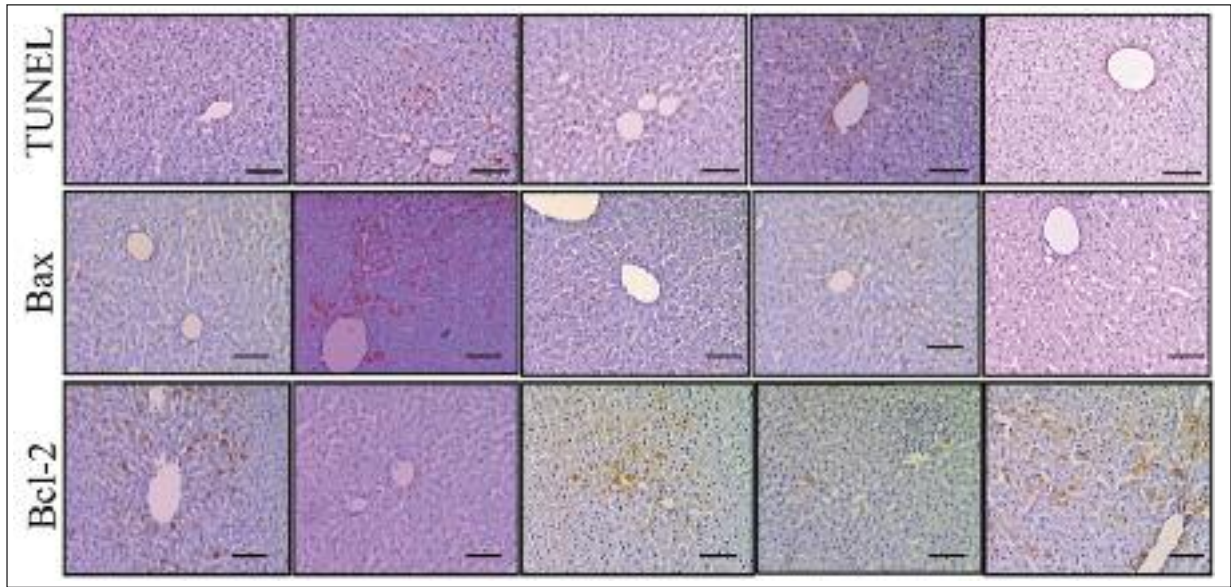
TABLO 1: Gruplara göre Bax ve Bcl-2 Dağılımı.

	Kontrol	İR	P	S	P+S
Bax	-	+++	+	+ / ++	+ / -
Bcl-2	+++	-	++	+	+++

+++ : Kuvvetli Boyanma; ++ :Orta Boyanma; + : Zayıf Boyanma; - : Boyanma Yok.
(İR: İskemi/reperfüzyon, P. Profilaksi; S: Sağaltım).

TUNEL

TUNEL pozitif hücre sayımı ortalamaları karşılaştırıldığında kontrol grubu (7.2 ± 1.3) ile diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$). İR grubu (43.42 ± 2.99) tedavi grupları ile karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında P+S grubu (18.25 ± 1.99), P (25.25 ± 3.61) ve S (36 ± 2.16) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterirken ($p <$



RESİM 3: Gruplara göre immunohistokimyasal işaretleme; TUNEL, Bax, Bcl-2 (Bar 100µm)

0.05), P ve S grubu karşılaştırıldığında, P grubunda TUNEL pozitif hücre sayısı ortalaması S grubuna göre azalmıştı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$) (Şekil 1) (Resim 3).

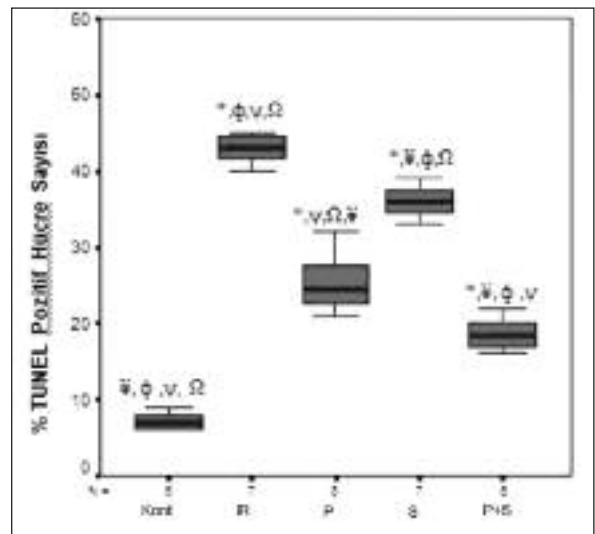
BİYOKİMYASAL SONUÇLAR

AST Düzeyi

Kontrol grubu (60.33 ± 2.6) ile İR grubu (260.14 ± 6.04) karşılaştırıldığında AST düzeyi İR grubunda istatistiksel yönden anlamlı olarak yüksek bulundu ($p = 0.017$). Tedavi gruplarının hepsinde AST düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p < 0.05$). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında P grubu (120.62 ± 5.43) ve P+S grubunun (125 ± 3.16), S grubuna (182 ± 9.03) göre AST düzeyleri düşüktü ve bu istatistiksel olarak anlamlıydı ($p = 0.001$). Ancak P ile P+S grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$) (Şekil 2).

ALT Düzeyi

Kontrol grubu (34.8 ± 4.65) ile İR grubu (88.57 ± 3.59) karşılaştırıldığında ALT düzeyi İR grubunda istatistiksel yönden anlamlı olarak yüksekti ($p = 0.016$). Karnozinin tedavi gruplarının hepsinde ALT düzeyini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşürdüğü bulundu. Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında P grubu (47 ± 7.65) ve P+S



ŞEKİL 1: Rat karaciğerinde kantitatif TUNEL pozitif hücre sayısı ortalamaları \pm SH.

* : Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$)

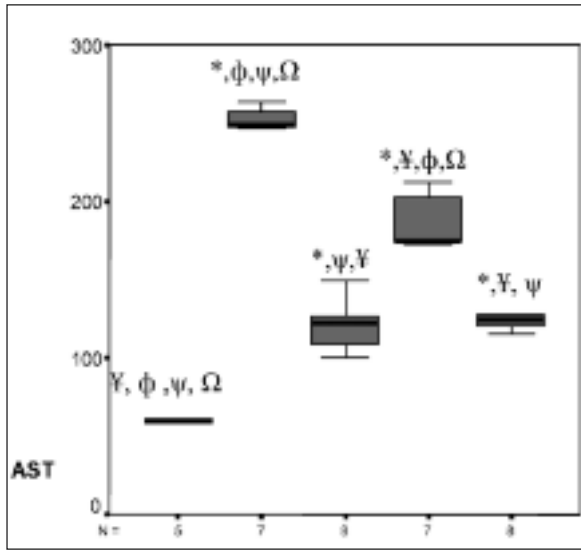
† : İR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$)

‡ : P grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$)

§ : S grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$)

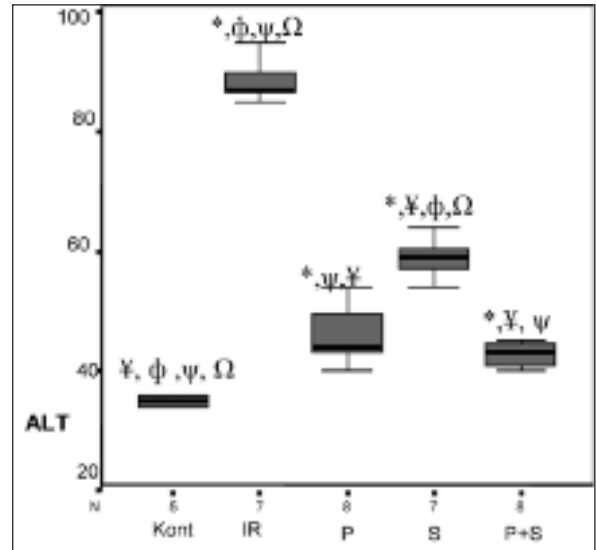
¶ : P+S grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$)

grubunun (42.75 ± 1.98), S grubuna (58.85 ± 3.38) göre ALT düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı olarak düşüktü. ($p = 0.001$) Ancak P ile P+S grubu arasında istatistiksel yönden anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$) (Şekil 3).



ŞEKİL 2: Gruplara göre serum AST ortalamaları ± standart hata

* : Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$)
 ¥: İR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$)
 Φ: P grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$)
 Ψ: S grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$)
 Ω: P+S grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$)
 (İR: İskemi/reperfüzyon; P: Profilaksi; S: Sağaltım)



ŞEKİL 3: Gruplara göre serum ALT ortalamaları ± standart hata

* : Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$)
 ¥: İR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$)
 Φ: P grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$)
 Ψ: S grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$)
 Ω: P+S grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$)
 (İR: İskemi/reperfüzyon; P: Profilaksi; S: Sağaltım).

TARTIŞMA

Karaciğer İRH patofizyolojisi, karaciğer hasarına etki eden çeşitli düzeydeki birçok mekanizmanın devreye girmesinden meydana gelir. Bu süreçte, Kupffer hücre aktivasyonu, reaktif oksijen türlerinin oluşumu, sitokin ve kemokin salınımı, vazokonstriksiyon, nitrik oksit ve endotelin dengesindeki bozulma, nötrofil lökositlerin toplanması, mitokondriyal geçirgenliğin değişikliğe uğraması, kalsiyumun hücre içine dengelenmemiş geçişi ve pH paradoksu gibi çeşitli hücrel ve moleküler etkileşimler söz konusudur. Bu kompleks mekanizmalar hücre ölümüne, organ fonksiyon bozukluğuna ve en sonunda da organ kaybına neden olmaktadır.³⁻⁵

Karaciğer İR hasarında ışık mikroskopik inceleme yapıldığında, bölgesel hemoraji ve nekroz, NL infiltrasyonu, konjesyon, sinuzoidlerde genişleme, bölgesel hepatoselüler vakuolizasyon, hepatosit şişmesi; ultrastrüktürel inceleme yapıldığında ise mitokondriyal yapıda bozulma, şişme, boyanma farklılıkları, NL birikimi gözlenir. Serumda yapılan incelemede ALT ve AST düzeyleri artmış bulunur.^{6,30} Tuncer ve ark. İR uygulanmış karaciğer doku-

sunda polimorfonükleer hücre infiltrasyonu, hepatosit nekrozu, sinuzoidal genişleme, ALT ve AST düzeylerinde yükselme saptamışlardır.³¹ Crockett ve ark. yaptıkları çalışmada, karaciğer İR uygulanmış grupta sinuzoidal konjesyon, sitoplazmik vakuolizasyon, hepatoselüler nekroz ve nötrofil infiltrasyonu gözlemiş, ALT düzeylerini yüksek bulmuşlardır.³² Peralta ve ark., İR uygulanmış karaciğer dokusunda yaygın hepatosit nekrozu, hemoraji, nötrofil infiltrasyonu ALT ve AST düzeyi yükselmesi bulmuşlardır.³³ Bizim çalışmamızda da benzer şekilde İR grubunda inflamasyon, sinuzoid genişlemesi ve konjesyon, yaygın hepatosit nekroz alanları izlendi. NL infiltrasyonu, konjesyon, sinuzoidlerde genişleme, periferik hepatositlerde şişme, santral ven çevresindeki hepatositlerde ise nekrotik ve apoptotik görümlü hücreler gözlemlendi. Ultrastrüktürel inceleme yapıldığında ise portal alanda kollagen lif artışı belirgindi. Periferik hepatositlerde ışık mikroskopik olarak gözlenen şişmenin bu hücrelerde yer alan geniş vakuollerden kaynaklandığı belirlendi. Bu hücrelerde mitokondriyal yapıda bozulma, şişme, GER sisternalarında dilatasyon, hücreler arasında elektron densite farklılığı ve ba-

zı hücrelerde hücre zarı bütünlüğünde bozulma gözlemlendi ve ışık mikroskopik olarak nekrotik ve apoptotik olduğu düşünülen hücreler de ince yapı düzeyinde ayırt edildi. Ayrıca hepatositlerin Disse aralığına bakan yüzlerinde mikrovillus yapısı yok denecek kadar azdı ve Disse aralığı genişlemişti. Serum AST ve ALT düzeyleri artmış olarak gözlemlendi.

KAR, aktif oksijen radikallerini temizleyen biyolojik fonksiyonuna bağlı olarak antioksidan özelliğe sahiptir. Hidroksil ve süperoksit radikallerinin ve çok kuvvetli olarak da singlet oksijen molekülünün temizleyicisidir.^{34,35} Antioksidan özelliğinden yola çıkılarak birçok deneysel modelde etkisi denenmiştir. Fujii ve ark., yaptıkları böbrek İRH modelinde KAR verilmesinin, sempatik sinir aktivitesini ve böbrekte oluşan İRH'yi azalttığını bulmuşlardır.¹⁹ Stvolinsky ve ark., beyin iskemisi oluşturulan deneklerde KAR'ın nöroprotektör etkisi olduğunu, başka bir çalışmada da global beyin iskemisi uygulanan deneklere KAR verilmesinin yaşam süresini arttırdığını göstermişlerdir.^{18,21} Boldyrev ve ark., KAR'ın nöronal hücreleri reaktif oksijen türevlerine karşı koruduğunu bildirmişlerdir.³⁶ Kang ve ark., KAR'ın kültür ortamında karaciğer epitelyal hücrelerinde 12-O- tetradecanoylp- horbol-13-acetate ve hidrojen peroksitin neden olduğu DNA fragmentasyonunu engellediğini bulmuştur.³⁷ Buna neden olarak KAR'ın lipid peroksidasyonunu inhibe etmesini, süperoksit dismutaz ve/veya serbest radikal temizleyici özelliğine sahip olmasını bildirmişlerdir.³⁷ Fouad ve ark., parsiyel karaciğer iskemi reperfüzyon modelinde KAR'ın preiskemik verilmesinin karaciğer hasarını azalttığını bildirmişlerdir.²⁴ Işık mikroskopik olarak hepatositlerde dejenerasyon, sitoplazmik vakuolizasyon, fokal nekroz, portal alanda fibrozis gözlenirken, KAR verilen grupta bu bulguların düzeldiğini bildirmişlerdir. Ultrastrüktürel incelemede İRH grubunda kromatin kondensasyonu, marginasyonu ve fragmentasyonu, mitokondri kristallerinde genişleme ve kristalizis gözlemlenmişler, KAR verilen grubun normal yapı gösterdiğini bildirmişlerdir. Baykara ve ark. karaciğer iskemi reperfüzyon modelinde KAR'ın etkisini melatonin ile karşılaştırmış, KAR'ın karaciğer hasarını azalttığını ultrastrüktürel, biyokimyasal ve immunohistokimyasal yöntemlerle göstermişlerdir.²⁵

Bizim çalışmamızda da benzer şekilde, İRH grubunda inflamasyon, sinuzoid genişlemesi ve konjesyon, hepatosit nekroz alanları izlendi. Serum AST ve ALT düzeyleri artmış bulundu. İRH grubundaki bulguların, P+S grubunda en etkin biçimde azaldığı, bunu P ve S grubunun izlediği belirlendi.

Bax, proapoptotik, Bcl-2 ise antiapoptotik proteinlerdir. Bunlar, Hepatik İRH'de apoptotik hücre ölümünü düzenlemede kilit roller üstlenirler.¹⁵ Jia ve ark., total İRH modeli yapmış, karaciğer İRH'sinde Bax immunreaktivitesinin arttığını, Bcl-2 immunreaktivitesinin ise azaldığını göstermişlerdir.³⁸ Karavias ve ark., hepatektomi sonrası kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Bcl-2 proteini ve mRNA düzeylerinde azalma, Bax düzeyinde artış olduğunu göstermişlerdir.³⁹ Bizim çalışmamızda da Bax immun işaretlemesinde İRH grubunda kuvvetli boyanma gözlenirken, P+S grubu, kontrol grubuna yakın boyanma özelliği gösterdi. Bunu P ve S grubu izledi. Bcl-2 immun işaretlemesinde, kontrol grubu ile P+S grubu kuvvetli boyanma gösterirken, P grubu orta, S grubu ise zayıf boyanma gösterdi.

TUNEL şimdiye kadar birçok çalışmada apoptotik indeksi göstermek amacıyla kullanılmıştır. Peralta ve ark., Sun ve ark., Saxton ve ark., İRH grubunda TUNEL ile boyanan apoptotik hücrelerin kontrole göre arttığını göstermişlerdir.^{33,40,41} Çalışmamızda da İRH grubunda TUNEL pozitif hücreler, kontrol ve tedavi gruplarına göre anlamlı olarak artış gösterdi. Tedavi grupları içerisinde apoptotik hücre sayısı en az olan P+S grubuyken, bunu P ve S grupları izledi.

SONUÇ

Tüm bulgular göz önüne alındığında, çalışmamızda karnozinin karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarında uygulanması koruyucu etki göstermiş, karnozinin profilaksi+sağaltım olarak verilmesinin, profilaksi ve sağaltım olarak verilmesinden daha etkin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, proflaktik etkisinin sağaltım etkisinden daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. Bu sonuçlardan yola çıktığımızda, iskemi/reperfüzyon öncesi karnozin verilmesinin dokuyu koruduğu ve sonrasında sağaltım olarak verilerek bu etkinin devam ettirildiği, ayrıca karno-

zinin hasar oluştuktan sonra geri dönüşüm etkisinin koruyucu etkisinden daha az olduğu düşünülmektedir.

Teşekkür

Laboratuvar teknik destekleri için Bio. Sedef Menkü ve Bio. Özcan Üstün'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000;190(3):255-66.
- Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Najarian JS. Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation. *Am J Surg* 1975;129(5):513-7.
- Kaplowitz N. Mechanisms of liver cell injury. *J Hepatol* 2000;32(1 Suppl):39-47.
- Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284(1):G15-26.
- Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18(8):891-902.
- Topaloglu S, Abbasoglu O, Ayhan A, Sokmensuer C, Kilinc K. Antiapoptotic and protective effects of roscovitine on ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Liver Int* 2003;23(4):300-7.
- Sener G, Tosun O, Sehirli AO, Kaçmaz A, Arbak S, Ersoy Y, et al. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sci* 2003;72(24):2707-18.
- Shinoda M, Shimazu M, Wakabayashi G, Tanabe M, Hoshino K, Kitajima M. Tumor necrosis factor suppression and microcirculatory disturbance amelioration in ischemia/reperfusion injury of rat liver after ischemic preconditioning. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(11):1211-9.
- Nadig SN, Periyasamy B, Shafizadeh SF, Polito C, Fiorini RN, Rodwell D, et al. Hepatocellular ultrastructure after ischemia/reperfusion injury in human orthotopic liver transplantation. *J Gastrointest Surg* 2004;8(6):695-700.
- Kremer AE, Rust C, Eichhorn P, Beuers U, Holdenrieder S. Immune-mediated liver diseases: programmed cell death ligands and circulating apoptotic markers. *Expert Rev Mol Diagn* 2009;9(2):139-56.
- Ayaşlıoğlu E. [Apoptosis]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2001;21(1):57-62.
- Neuman MG. Apoptosis in diseases of the liver. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001;38(2):109-66.
- Rüdiger HA, Graf R, Clavien PA. Liver ischemia: apoptosis as a central mechanism of injury. *J Invest Surg* 2003;16(3):149-59.
- Ben-Ari Z, Pappo O, Cheporko Y, Yasovich N, Offen D, Shainberg A, et al. Bax ablation protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *Liver Transpl* 2007;13(8):1181-8.
- Zhao Y, Li S, Childs EE, Kuharsky DK, Yin XM. Activation of pro-death Bcl-2 family proteins and mitochondria apoptosis pathway in tumor necrosis factor-alpha-induced liver injury. *J Biol Chem* 2001;276(29):27432-40.
- Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006;43(2 Suppl 1):S31-44.
- Muppidi J, Porter M, Siegel RM. Measurement of apoptosis and other forms of cell death. *Curr Protoc Immunol* 2004;Chapter 3:Unit 3.17.
- Stvolinsky SL, Kukley ML, Dobrota D, Matejovicova M, Tkac I, Boldyrev AA. Carnosine: an endogenous neuroprotector in the ischemic brain. *Cell Mol Neurobiol* 1999;19(1):45-56.
- Fujii T, Takaoka M, Muraoka T, Kurata H, Tsuruoka N, Ono H, et al. Preventive effect of L-carnosine on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Eur J Pharmacol* 2003;474(2-3):261-7.
- Fujii T, Takaoka M, Tsuruoka N, Kiso Y, Tanaka T, Matsumura Y. Dietary supplementation of L-carnosine prevents ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *Biol Pharm Bull* 2005;28(2):361-3.
- Stvolinsky S, Kukley M, Dobrota D, Mezesova V, Boldyrev A. Carnosine protects rats under global ischemia. *Brain Res Bull* 2000;53(4):445-8.
- Boldyrev AA, Johnson P, Wei Y, Tan Y, Carpenter DO. Carnosine and taurine protect rat cerebellar granular cells from free radical damage. *Neurosci Lett* 1999;263(2-3):169-72.
- Zalesova ZS, Kuleva NV. The influence of carnosine on oxidation of skeletal muscle actin in vivo and in vitro. *Pathophysiology* 1998;5(Suppl):119.
- Fouad AA, El-Rehany MA, Maghraby HK. The hepatoprotective effect of carnosine against ischemia/reperfusion liver injury in rats. *Eur J Pharmacol* 2007;572(1):61-8.
- Baykara B, Tekmen I, Pekcetin C, Ulukus C, Tuncel P, Sagol O, et al. The protective effects of carnosine and melatonin in ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Acta Histochem* 2009;111(1):42-51.
- Zieba R, Wagrowska-Danilewicz M. Influence of carnosine on the cardiotoxicity of doxorubicin in rabbits. *Pol J Pharmacol* 2003;55(6):1079-87.
- Kim YI. Ischemia-reperfusion injury of the human liver during hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003;10(3):195-9.
- Kiray M, Ergur BU, Bagriyanik A, Pekcetin C, Aksu I, Buldan Z. Suppression of apoptosis and oxidative stress by deprenyl and estradiol in aged rat liver. *Acta Histochem* 2007;109(6):480-5.
- Aydede H, Erhan Y, Ikgül O, Cilaker S, Sakarya A, Vatanserver S. Effect of portal vein occlusion on the pancreas: an experimental model. *World J Surg* 2006;30(6):1000-6.
- Yuan GJ, Ma JC, Gong ZJ, Sun XM, Zheng SH, Li X. Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* 2005;11(12):1825-8.
- Tuncer MC, Ozturk H, Buyukbayram H, Ozturk H. Interaction of L-arginine-methyl ester and Sonic hedgehog in liver ischemia-reperfusion injury in the rats. *World J Gastroenterol* 2007;13(28):3841-6.
- Crockett ET, Galligan JJ, Uhal BD, Harkema J, Roth R, Pandya K. Protection of early phase hepatic ischemia-reperfusion injury by cholinergic agonists. *BMC Clin Pathol* 2006;6:3.
- Peralta C, Bartrons R, Serafin A, Blázquez C, Guzmán M, Prats N, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 2001;34(6):1164-73.
- Guiotto A, Calderan A, Ruzza P, Borin G. Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review. *Curr Med Chem* 2005;12(20):2293-315.
- Mozdzan M, Szemraj J, Rysz J, Nowak D. Antioxidant properties of carnosine re-evaluated with oxidizing systems involving iron and copper ions. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;96(5):352-60.
- Boldyrev A, Bulygina E, Leinsoo T, Petrushanko I, Tsubone S, Abe H. Protection of neuronal cells against reactive oxygen species by carnosine and related compounds. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2004;137(1):81-8.
- Kang KS, Yun JW, Lee YS. Protective effect of L-carnosine against 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- or hydrogen peroxide-induced apoptosis on v-myc transformed rat liver epithelial cells. *Cancer Lett* 2002;178(1):53-62.
- Jia CJ, Dai CL, Zhang X, Cui K, Xu F, Xu YQ. Alanyl-glutamine dipeptide inhibits hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* 2006;12(9):1373-8.
- Karavias DD, Tsamandas AC, Tepetes K, Kritikos N, Kourelis T, Ravazoula P, et al. BCL-2 and BAX expression and cell proliferation, after partial hepatectomy with and without ischemia, on cholestatic liver in rats: an experimental study. *J Surg Res* 2003;110(2):399-408.
- Sun K, Liu ZS, Sun Q. Role of mitochondria in cell apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *World J Gastroenterol* 2004;10(13):1934-8.
- Saxton NE, Barclay JL, Clouston AD, Fawcett J. Cyclosporin A pretreatment in a rat model of warm ischaemia/reperfusion injury. *J Hepatol* 2002;36(2):241-7.