

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI**

**KARACİĞER İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA
KETAMİNİN DOZ BAĞIMLI ANTİİNFLAMATUAR ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Zafer GÜNDOĞDU**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. M. Kemal BAYAR**

**ELAZIĞ
2010**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr.

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

.....

.....Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

.....

Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

TEŞEKKÜR

Eđitim süresince önemli katkıları olan değerli hocam Prof. Dr. M. Kemal BAYAR'a şükranlarımı sunarım. Bu çalışma sırasında bilgilerinden yararlandığım Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Prof. Dr. İbrahim Hanifi ÖZERCAN'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca ilgi ve emeklerini esirgemeyen bilgi ve becerilerinden faydalandığım ve asistanı olmaktan mutluluk duyduğum kıymetli hocalarım; Prof. Dr. Ömer L ERHAN, Prof. Dr. S. Ateş ÖNAL, Prof. Dr. M. Akif YAŞAR, Doç. Dr. Azize BEŞTAŞ ve Yrd. Doç. Dr. A. Belin ÖZER'e ayrı ayrı teşekkür ederim.

Beraber çalıştığım ve çok şey paylaştığım araştırma görevlisi arkadaşlarıma, tüm cerrahi ekiplere, anestezi teknikeri ve ameliyathane personeli, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi ve Algoloji Kliniđi hemşire ve personeline ayrıca teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarımnda beni sabırla destekleyen eşim Seda, kardeşim Dr.Tamer ve beni yetiştiren, bugünlere gelmemde çok büyük katkıları olan anne ve babama teşekkür ederim.

ÖZET

Klinik uygulamalar içinde karaciğerde iskemi-reperfüzyon hasarına genellikle hemorajik şok, sepsisin geç dönemi, karaciğer transplantasyonu, büyük bir travmaya yönelik cerrahi girişim ve hepatik rezeksiyon sırasında rastlanmaktadır. Ketamin NF- κ B inhibisyonu ile IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini baskılar. Bu deneysel çalışmanın amacı karaciğerde İ-R hasarı oluşturulmasına farklı dozlarda ketamin uygulanmasının antiinflamatuvar etkilerinin araştırılmasıdır.

Çalışmada ağırlığı 150-200 gr. olan 18 adet Wistar-Albino dişi rat kullanıldı. Grup 1'deki (n=6) deneklere A. Hepatika propria serbestleştirildikten sonra klemple askıya alınarak 30 dakika iskemi ardından 4 saat reperfüzyon işlemi yapıldı. Grup 2'deki (n=6) deneklere 30 dakika iskemi sonrası 2.5 mg/kg Ketamine İM., Grup 3'dekilere (n=6) ise aynı dönemde 10 mg/kg Ketamine İM. Uygulandı, ardından 4 saat reperfüzyon sağlandı. Tüm deneklerden iskemi öncesi, sonrası ve reperfüzyondan sonra kan örnekleri alınarak MDA, AST, ALT, TNF- α , IL-6, IL-1 β , NO düzeyleri saptandı. Elde edilen veriler ortalama \pm SD olarak alındı. Tekrarlanan ölçümler varyans analizi Posthoc-Tukey HSD testi ile (anlamli kabul edildi) grup içi tekrarlanan ölçümlerin değerlendirilmesi için Wilcoxon testi kullanıldı ($P<0.005$ anlamli kabul edildi).

TNF- α , IL-1 β , IL-6 düzeylerinin tüm gruplarda iskemi öncesi değerlerine göre, iskemi sonrası dönemde daha belirgin olmak üzere arttığı gözlemlendi ($P<0.05$). Reperfüzyon döneminde TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeylerinin Grup I ve II'ye göre daha az arttığı saptandı ($p<0.05$). MDA, NO, AST ve ALT düzeyleri tüm gruplarda iskemi öncesi döneme göre, iskemi ve reperfüzyon dönemlerinde arttığı saptandı ($p<0.05$) Aynı dönem içerisinde MDA, NO, AST ve ALT düzeyleri incelendiğinde ketamin verilen gruplarda kontrol grubuna göre daha az arttığı ($p<0.005$) saptandı.

Düşük ve yüksek doz ketamin verilen ratların karaciğerinde ise ışık mikroskopunda yapılan incelemede reperfüzyon sonrası anlamli olarak ($p<0.05$) daha az histopatolojik hasar saptandı. Karaciğer Kupffer hücreleri aktive

olduklarında birçok sitokinlerin salgılanmasına neden olurlar. Çalışmamızda karaciğerde iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan deneklerde iskemi sonrası ketamin uygulanmasının doza bağlı olarak antiinflamatuvar etki gösterdiği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ketamine, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α , iskemi-reperfüzyon hasarı

ABSTRACT

DOSE-DEPENDENT ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF KETAMINE ON LIVER ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY

In clinical practices, liver ischemia-reperfusion injury is generally encountered in hemorrhagic shock, late stages of sepsis, liver transplantation, surgical intervention to major trauma and hepatic resection. Ketamine suppresses IL-6 and TNF- α , due to inhibition of NF-kB. Aim of this experimental study is the evaluation of anti-inflammatory effects of different doses of ketamine applications in liver I-R injury.

We were used 18 Wistar-Albino rats weighing 150-200 gr in this study. After A. Hepatica propria was loose and suspended with clamp, ischemia for 30 minutes and reperfusion for 4 hours were applied to the subjects in group 1 (n=6). 2.5 mg/kg Ketamine IM after ischemia for 30 minutes was given to the subjects in group 2 (n=6), and in the same period 10 mg/kg Ketamine IM was given to subjects in group 3 (n=6) and subsequently reperfusion was provided. Before and after ischemia, and after reperfusion, blood samples were taken from all subjects and MDA, AST, ALT, TNF- α , IL-6, IL-1 β and NO levels were measured. The obtained data were taken as mean \pm SD. Repeated measurements of analysis of variance were made with Posthoc-Tukey HSD test (Significance for all comparisons was defined as $p < 0.05$), and Wilcoxon test was used for evaluation of repeated measurements in the groups (Significance for all comparisons was defined as $p < 0.005$).

According to pre-ischemic levels, post-ischemic TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels were seen significantly increased in all groups ($p < 0.05$). TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels were increased less in reperfusion period, when compared with groups I and II ($p < 0.005$). According to pre-ischemic period, MDA, NO, AST and ALT levels were found increased in post-ischemic, reperfusion periods of all groups ($p < 0.005$). In the same period, when MDA, NO, AST and ALT levels were investigated, these levels were found increased less in ketamine given groups, according to control group.

Investigation with light microscope on low and high dose ketamine given rats' livers showed significantly less histopathologic injury after reperfusion ($p < 0.05$).

When liver Kupffer cells are activated, they cause release of a lot of cytokines. In our study, we concluded that dose-dependent manner applications of ketamine to the subject with liver ischemia-reperfusion injury showed anti-inflamatur effect.

Keyword: Ketamine, IL-1 β , IL-6 and TNF- α , Ischemia-reperfusion injury

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 İskemi Reperfüzyon Hasarı	3
1.1.1. Fizyopatolojisi (12,13,14)	3
1.1.2.Reperfüzyon	5
1.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar	9
1.3. Antioksidanlar	12
1.4. iNOS' ın Transkripsiyonel Regülasyonu	12
1.4.1. Nitrik oksit aracılığıyla oluşan sitotoksitenin mekanizması	13
1.5. Karaciğer İskemik Hasarı	14
1.5.1. Karaciğer İskemisinin Patofizyolojisi	15
1.5.2. Karaciğerde nitrik oksit oluşumu	16
1.6. Fensiklidinler, Ketamin	16
2. GEREÇ VE YÖNTEM	19
2.1. Cerrahi Teknik	19
2. 2. Biyokimyasal analiz	19
2.3. İstatistiksel Analiz	20
3. BULGULAR	21
4.TARTIŞMA	28
5. KAYNAKLAR	36
6.ÖZGEÇMİŞ	46

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. İskemide hücresel değişiklikler	3
Şekil 2. Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları	5
Şekil 3. Serum MDA düzeyleri	21
Şekil 4. Serum AST düzeyleri	21
Şekil 5. Serum ALT Değerleri	22
Şekil 6. Serum TNF- α düzeyleri	22
Şekil 7. Serum IL-6 düzeyleri	23
Şekil 8. Serumda IL-1 β düzeyleri	23
Şekil 9. Serum NO düzeyleri	24
Şekil 10. I.Grupta karaciğerdeki değişikliklerin histolojik görünümü (Hemotoksilen eozin x200)	26
Şekil 11. II. grupta karaciğerdeki değişikliklerin histolojik görünümü (Hemotoksilen eozin x200)	26
Şekil 12. III. Grupta karaciğerdeki değişikliklerin histolojik görünümü (Hemotoksilen eozin x200)	27

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. İskemi öncesi ve iskemi ve reperfüzyon sonrası alınan TNF- α , IL-6, IL-1 β , AST, ALT, MDA, NO serum düzeyleri	25
Tablo 2. Karaciğerdeki değişiklerin histolojik derecelendirme skalası	27

KISALTMALAR LİSTESİ

ALT	:Alaninaminotransferaz
AMP	:Adenozinmonofosfat
ANOVA	:Oneway Anova Varyans Analizi
AP-1	:Aktivatör protein-1
AST	:Aspartataminotransferaz
ATP	:Adenozintrifosfat
cGMP	:Siklik guanozin monofosfat
DNA	:Deoksiribonükleik asit
eNOS:	:Endotelial nitrik oksit sentetaz
ELAM-1	:Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1
FAD	:Flavin adenin dinükleotid
GSH	:Glutasyon
HO-1	:Hemoksijenaz-1
HOCL	:Hipoklorikasit
HPLC	:Yüksek performanslı likit kromatografisi
ICAM-1	:Intercellular adhesion molecule-1
IFN-γ	:İnterferon gama
Il-1b	:İntrlökin 1 beta
IL-6	:İnterlökin 6
iNOS	:indüklenebilir nitrik oksit sentetaz
İ/R	:İskemi-reperfüzyon
KHSS	:Karaciğer histolojik hasar skoru
L	:Litre
LPS	:Lipopolisakkarit
LTB₄	:Lökotrien B ₄
MDA	:Malondialdehit
ml	:Mililitre
MPO	:Miyeloperoksidaz
NAC	:N asetil sistein
NAD	:Nikotinamid adenin dinükleotid

NADPH-oksidad	:Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidad
NF-kappaB	:Nükleer faktör kappa B
NO	:Nitrik oksit
PAF	:Trombosit aktive edici faktör
pg	:Picogram
PGI₂	:Prostasiklin
PMNL	:Polimorf nüveli lökosit
SOD	:Süperoksidismutaz
SOR	:Serbest oksijen radikalleri
sTNRF	:Soluble tümör nekroz faktör reseptörleri
TA₂	:Tromboksan A ₂
TNF-α	:Tümör nekroz faktör alfa
U	:Ünite
XDH	:Ksantin dehidrojenaz
XO	:Ksantin oksidad

1. GİRİŞ

Yoğun bakımda yatan ve/veya cerrahi girişim geçiren hastalarda serbest oksijen radikalleri ile sitokinlerin rol oynadığı iskemi-reperfüzyon hasarı önemli bir sorundur. (1)

İskemi organa gelen kan akımının yetersizliği ve dokunun bozulmuş perfüzyonu olup dokuların ihtiyacı olan oksijen ve metabolik ürünlerin karşılanamadığı patolojik bir durumdur. Reperfüzyon ise iskemik dokunun oksijenlenmiş kan ile perfüze edilmesiyle hücre homeostazının yeniden sağlanmasıdır (2).

Klinik uygulamalar içinde karaciğerde iskemi-reperfüzyon hasarına genellikle hemorajik şok, sepsisin geç dönemi, karaciğer transplantasyonu, büyük bir travmaya yönelik cerrahi girişim ve hepatik rezeksiyon sırasında rastlanmaktadır. Majör karaciğer cerrahisinde özellikle karaciğer yaralanmaları ve karaciğer tümörlerinde peroperatif kan kaybı hem hastanın mortalitesi hem de morbiditesi açısından önemlidir. Bu nedenle kansız bir alan sağlanması için Pringle manevrası uygulanır. Pringle manevrası potansiyel olarak tehlikeli hepatik parankim iskemisine neden olur (3, 4).

Karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarının iki ayrı fazda olduğu gösterilmiştir. Başlangıç fazı, reperfüzyonun ilk iki saatinde gerçekleşir ve kupffer hücrelerinden salınan reaktif oksijen metabolitleri bir dizi karmaşık inflamatuvar olaylar zincirini başlatarak nötrofilleri aktive eder. Aktive olmuş nötrofillerde endotel hücrelerine yapışarak myeloperoksidaz, elastaz, kollajenaz gibi çeşitli proteazlar ve serbest oksijen radikalleri salınmasına ve hasarın daha da artmasına yol açarlar. Karaciğerde iskemi-reperfüzyon sonucunda aspartataminotransferaz (AST) ve alaninamino transferaz (ALT) düzeyleri artar ve bu artışın iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan serbest radikallerin dokuda meydana getirdiği hasara bağlı olabileceği kabul edilmiştir. (5)

Oksidatif metabolizmanın ileri derecede hızlandığı ve dolaşımdaki kan miktarının veya dokulara kan akımının azaldığı durumlarda artan serbest oksijen radikalleri membranlar, enzimler, polisakkaritler ve nükleik asitler üzerine toksik etki oluşturarak doku hasarına yol açarlar (6). İskemi-reperfüzyon sonrası ortaya çıkan sitokinler (interferon-gama (IFN- γ), Tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), interlökin 1

beta (IL-1 β) ve indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS)) enzimini indüklerler. Bir kaç saat içinde gen ekspresyonu gerçekleşen iNOS 4-24 saat aktif kalır ve kalsiyum kalmodulinden bağımsız olarak, cNOS'dan 100 kat fazla miktarda NO salınımına yol açar. iNOS aracılığı ile L-arginin L-sitrülin'e dönüşürken nitrik oksit (NO) açığa çıkar. NO'nun sitotoksik etkileri nonspesifiktir ve aşırı üretimi konağa zararlı olabilir (7).

Nükleer faktör kapa B (NF-kB) bir transkripsiyon faktörüdür ve inflamatuvar yanıtta birçok genin ekspresyonundan sorumludur. NF-kB stoplazmada inhibitöre (inhibitör kappaB) bağlı olarak bulunur. IL-1 β , TNF- α ve Lipopolisakkarit (LPS) gibi uyarılar sonucu inhibitöründen ayrılarak serbest NF-kB durumuna geçer. İnsandaki iNOS geni uyarıcısının üst bölgesinde NF-kB için çok sayıda bağlanma yerleri mevcuttur (8).

IL-1 β , TNF- α ve IL-6'nın lökosit aktivasyonunu, endotel hücreleri ve lökositler üzerindeki adezyon reseptörlerini artırıcı etkileri vardır. İnflamatuvar cevapta anahtar rol oynayan TNF- α sitokin şelalesini başlatarak immün cevabı koordine etmektedir. TNF- α ve IL-6'nın artması adezyon moleküllerinin salınımına ve lökositlerin perfüze olan dokuya gelmesine neden olarak hasarın artmasında rol oynarlar (8, 9).

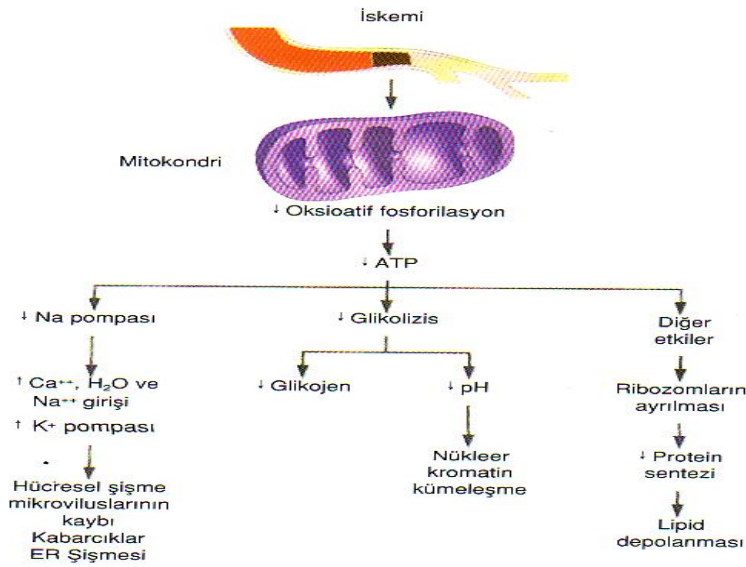
Ketamin lipopolisakkarit ile oluşan karaciğer hasarını, Hemoksijenaz-1 (HO-1)'i artırarak ve iNOS düzeyini düşürerek önler. Ketaminin Lipopolisakkarit ile oluşan karaciğer hasarında hepatoprotektif etki gösterdiği, bu nedenle ketaminin anestezi gerektiren sepsisli hastalarda ilk seçilmesi gereken intravenöz ajan olabileceği ortaya konmuştur. Ketaminin endotoksin ile oluşan TNF- α düzeylerini baskıladığı ve endotoksemik şoktaki ratlarda mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir (10, 11). Ketamin NF-kB inhibisyonu ile IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini baskılar. Ketamin lökositlerin reaktivitesini inhibe ederek antiinflamatuvar etki gösterir (8, 9).

Bu çalışmanın amacı; karaciğerinde iskemi – reperfüzyon modeli oluşturulan ratlarda, düşük ve yüksek doz ketamin uygulamasının karaciğer hasarına olan etkisinin araştırılmasıdır.

1.1 İskemi Reperfüzyon Hasarı

1.1.1. Fizyopatolojisi (12, 13, 14)

Dokulara kan akımının yetersizliği hücre fonksiyonlarının bozulmasına ve hücre ölümüne kadar giden olayları tetiklemektedir. Oksijen hücre zedelenmesinde temel bir rol oynar (Şekil 1). Hipoksinin ilk zarar verdiği yer hücrenin aerobik solunumudur (mitokondrideki oksidatif fosforilasyonu engeller). Adenozin trifosfat (ATP) oluşumu yavaşlar ve durur. Özellikle hücre zarının ouabain duyarlı adenozin trifosfat aktivitesinin azalması zarda aktif sodyum pompasının yetersizliğine yol açarak hücre içi sodyum birikimi ve hücreden potasyumun dışarı atılımına yol açar. Hücre içine sodyum artışına su birikimi eşlik ederek akut hücresel şişme oluşur. Hücre ATP azlığı adenozin monofosfat (AMP) artımı ile birlikte. Hücre ATP azlığı, Fosfofrüktokinaz enzimini uyarır, anaerobik glikoliz hızı artar glikojenden ATP oluşur ve hücre enerji kaynakları korunur. Glikoliz laktik asit ve fosfat türevlerinden hidroliz sonucu oluşan inorganik fosfat birikimi ile sonuçlanır ve hücre içi pH azalır. Eğer hipoksi devam ederse hücre zarı geçirgenliği artar ve mitokondrinin fonksiyonları azalır. Hücre yüzeyinde tomurcuklar oluşur. Sitoplazmada veya dışında organel zarları gibi plazmadan köken alan konsantrik laminalı myelin şekiller görülür. Bu sırada mitokondriler normal, şişmiş veya gerçekten yoğunlaşmıştır; endoplazmik retikulumu genişlemiştir ve tüm hücre belirgin olarak şişmiştir.



Şekil 1. İskemide hücresel değişiklikler.

Bu bozuklukların tümü geri dönüşümlüdür. Hipoksi devam ettiği sürece hücre ölümü gerçekleşir.

Geri dönüşümsüz zedelenme: Yapısal olarak mitokondri ve kristalarında aşırı vakuolizasyon, plazma zarında aşırı zedelenme, lizozomlarda şişme ve özellikle eğer iskemik alan yeniden beslenirse hücre içine yoğun kalsiyum tutulumu ile birliktedir. Amorf kalsiyumdan zengin yapılar mitokondri matriksinde gelişir.

Geri dönüşümsüz zedelenme mekanizmaları; Geri dönüşümsüzlüğü karakterize eden iki olay vardır. Birincisi mitokondrideki bozukluğun reperfüzyon ve reoksijenizasyona rağmen düzeltilemeyişi (oksidatif fosforilasyon ve ATP yapımının gerçekleşmemesi) ve ikinci membran görevlerinin çok ciddi bozukluğudur.

ATP'nin giderek artan kaybı kritik bir noktadan sonra hücre hasarında önemli rol oynar, fakat bu konu henüz tartışmalıdır. Her ne kadar mitokondri yapı ve işlevlerinde iskemik dokuda çok sayıda değişiklikler oluyorsa da deneysel olarak hücre ölümüne yol açan ATP'deki kayıp kadar bu ayırt ettirici değişikliklerin de sorumlu olduğunu göz önünde bulundurulmalıdır.

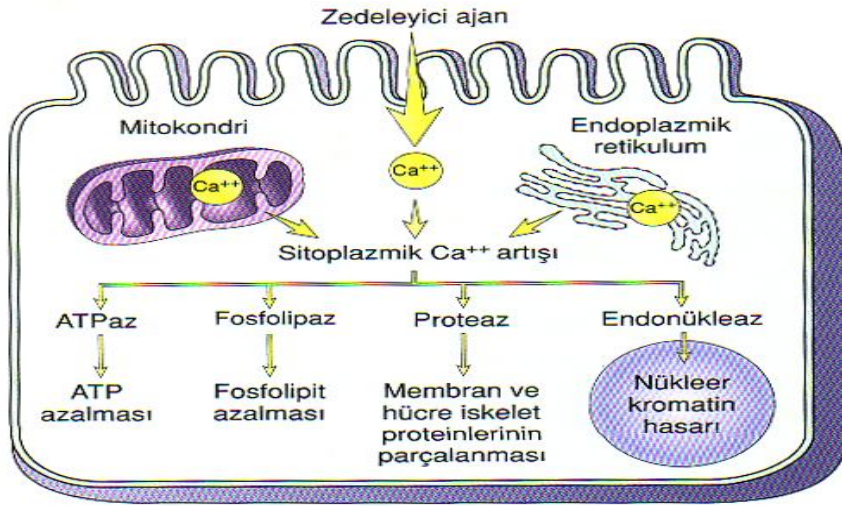
Membran fosfolipidlerinin giderek artan kaybı: İskemik karaciğerde, geri dönüşümsüz zedelenme membran fosfolipid kapsamının belirgin azlığı ile birliktedir. Fosfolipid kaybının nedeni iskemide sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun uyarılmasıyla endojen fosfolipazların aktivasyonu sonucu fosfolipidlerin parçalanmasının artışıdır. Mitokondri ve endoplazma retikulumu içine kalsiyum atıklarının birikimi ve sitozolik kalsiyumun artışı oksijen kaybına neden olur. Fosfolipidlerin sürekli kaybı ATP-bağımlı fosfolipidlerin yeniden yapımı veya dönüşümüne neden olur.

Hücre iskelet anomalileri: İskemide hücre iskeletinden hücre membranının ayrılması hücre şişmesinde görülür, gerilme ve rüptüre karşı membran duyarlılığını artırır. Hücre iskelet proteinlerinin parçalanması hücre içi proteazlarının sitozolik kalsiyum artışıyla aktivasyonu sonucu oluşur (Şekil 2).

Toksik oksijen radikalleri: İleri derecede toksik olan kısmen oksijenasyonu azalmış türevler hücre membran ve diğer hücre yapılarında zedelenmeye geri dönüşsüz hücre zedelenmesinde hücre membran zedelenmesinin temel etken olduğuna dair birçok kanıt vardır. İskemik dokuda artan böylesi oksijen radikalleri kan akımı düzeldikten sonra reperfüzyon zedelenmesine neden olur. Toksik oksijen

türevlerinin büyük ölçüde reperfüzyon sırasında iske mi alanında infiltre olan polimorfonükleer lökositler tarafından yapıldığı düşünölmektedir. Eğer reperfüzyon oluşmaz ise öldürücü iskemik zedelenme sonuçta gelişir, fakat toksik oksijen türevleri görülmez.

Lipid yıkım ürünleri: İskemik hücelere membranlar üzerinde deterjan etkisi olan fosfolipidlerin parçalanması sonucu katabolik ürünler birikir. Bunun sonucunda hipoksi oksidatif fosforilasyonu etkiler ve ATP yapımını engelleyerek kritik bir noktadan sonra öldürücü olan membran zedelenmesine yol açar. Kalsiyum hücre ölümünde yapısal değışikliklerin potansiyel mediyatörüdür.



Şekil 2. Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları.

1.1.2.Reperfüzyon

İskemik dokulara kan akımının yeniden sağlanması ile geri dönüşümlü hasarlanan hüceler onarılırken, geri dönüşümsüz hasarlanan hüceler etkilenmez. Bununla beraber iskemik hasarın süre ve şiddetine göre birçok hücre nekroz ve apopitozis nedeniyle ölebilir. Reperfüzyon, iskemiyeye yol açan etkeni ortadan kaldırarak dokuya kan akımını yeniden sağlar ve bir yandan dokunun enerji dengesini düzeltirken diğer taraftan metabolik artıkların uzaklaştırılmasına yardımcı olur. Ancak reperfüzyon aynı zamanda iskeminin yarattığı hasarı daha da artırabilir. Reperfüzyon hasarı; serbest oksijen radikalleri, endotelial faktörler ve nötrofiller arasındaki ilişki sonucu oluşmaktadır. Hasarı asıl tetikleyen olayın endotel

hücrelerindeki zedelenme olduğu düşünülmektedir. Tam olarak mekanizmaları açık olmamakla birlikte iskemik dokuların yeniden kanlanmasının daha fazla hasar oluşturabilmesi şöyle açıklanabilir: 1) Kan akımının yeniden sağlanması ile etkilenen hücreler henüz kendi iyonik çevrelerini tam olarak düzeltmemişken yüksek konsantrasyondaki kalsiyumla karşı karşıya kalır ve artan hücre içi kalsiyum hücre bütünlüğünün kaybına neden olur, 2) Zedelenmiş hücrelerin yeniden kanlanması iltihabi hücrelerin lokal olarak yeniden bölgeye gelmesine neden olur. Bu hücreler membran hasarı yanı sıra mitokondrial permabilite geçişini biraz daha artıran yüksek düzeylerde serbest oksijen radikallerini açığa çıkarır. Etkilenmiş fakat henüz yaşayan hücrelerde mitokondri hasarı tam olmayan oksijen azalmasını ve böylece serbest radikal türevlerinin üretimini artmasını sağlar. Bunun yanı sıra iskemik olarak zedelenen hücrelerde antioksidan savunma mekanizmaları da etkilenmiştir (15).

Yapılan bir çalışmada iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarında sorumlu mediyatörlerin serbest oksijen radikalleri (SOR) olduğu gösterilmiştir. Reperfüzyonun başlaması ile reoksijenasyon sırasında lökosit, endotel ve parankim hücrelerinden serbest oksijen radikalleri salınırlar. SOR'leri mitokondrilerdeki permabiliteyi bozar ve hücrenin ATP üretimini engelleyerek hücre ölümüne yol açar. İskemik hasar, parenkim ve endotel hücrelerinden sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin salınımına neden olarak dokuya polimorf nüveli lökositleri (PMNL) çeker ve daha fazla hasara yol açarlar (16).

Reperfüzyon hasarına doğrudan veya dolaylı olarak katılan pek çok madde ve biyokimyasal reaksiyon tanımlanmıştır. Bu reaksiyonlarda rol alan başlıca faktörler ve enzimatik etkileşimler şunlardır.

1. Ksantin oksidaz yolu (XO): Postiskemik dokudaki serbest radikallerin önemli bir kaynağıdır. İskemi boyunca ksantin dehidrogenaz (XHD) ksantin oksidaza dönüşür ve dokuda birikir.

2. Nötrofil aktivasyonu: I/R sırasında dokular ve birtakım medyatörler kemotaktik ajan olarak davranır ve nötrofillerin hareketine neden olur. I/R kaynaklı mikrovasküler hasar nötrofillerin endotel ile etkileşimi sonucu oluşmaktadır. İskemik dokularda SOR üreten intrasellüler mekanizmalar aktive edilmiş durumdadır, ancak oksijen sağlanmasındaki eksiklikten dolayı fonksiyonel değildirlir. Lökositlerin aktive edilmesi SOR'nin üretimine yol açmaktadır. SOR aynı zamanda apoptozisi

indüklemektedir. Proapoptotik Fas/CD95 reseptör aktivasyonu hücre içi SOR birikimi ve hücre ölümüyle sonuçlanır (15).

3. Trombosit aktive edici faktör (PAF): Membran fosfolipidlerinden fosfolipaz A2 etkisiyle oluşan PAF, endotel hücrelerince üretilirler. PAF trombositlerin agregasyonu, şekil değiştirmesi ve granül içeriklerinin salınımına neden olan bir mediyatördür. Dokuların reperfüzyonu sonucu aktive olan lökositlerin adezyonunu (integrinlerde yapısal değişikliklere neden olarak) ve kemotaksisini, lökosit degranülasyonu ile oksidatif reaksiyonlarını arttırlar (17).

4. Kompleman: İ/R kompleman sistemini aktive eder ve aktivasyonları ile anaflatoksin, C3a ve C5a'nın üretimine neden olurlar. C3a ve C5a mast hücrelerine etki ederek histamin salgılamalarını sağlar, bu yolla vasküler permabilite artışı ve vazodilatasyona yol açarlar.

Nötrofiller üzerindeki etkileri ile kemotaksis, endotele adezyonun artışı, SOR üretimi ve salınımıyla sonuçlanır. Kompleman aktivasyonu IL-1 β , IL-6 ve TNF- α oluşumunu uyararak inflamatuvar cevabı güçlendirir (18).

5. Sitokinler: Reperfüzyon sonrası dolaşımda gözlenen IL-1 β , IL-6 ve TNF- α 'nın hücrel yaralanmada etkilerinin olduğu gösterilmiştir. TNF- α , konakçı cevabının oluşumuna yol açan ilk ve en güçlü mediyatörlerden biridir. TNF- α sentezinin kaynağı monositler, makrofajlar ve T hücreleridir. Kupffer hücreleri, insan vücudunda bir arada bulunan en büyük makrofaj topluluğudur. İç organlardaki cerrahi veya travmatik yaralanmalar, inflamatuvar mediatörlerin ve akut faz proteinlerinin yapımı gibi homeostatik cevapların oluşumunda belirgin etkiye sahiptir. Yarı ömrü 15-18 dk. olmasına rağmen, TNF - α 'nın kısa süreli ortamda bulunması bile önemli metabolik ve hemodinamik değişikliklerin gelişmesine ve döngünün ileri kısmındaki sitokinlerin aktive olmasına neden olur. TNF - α yapımı ve aktivasyonunu engelleyen birçok doğal mekanizma bulunduğu gösterilmiştir. Dolaşımdaki transmembranöz TNF reseptörlerinin (solubl TNF reseptörleri=sTNRF) endojen inhibitörleri saptanmıştır. Bu reseptörlerin kompotetif olarak dolaşımda bulunan TNF- α 'yi sekestre ederek koruyucu rol aldıkları sanılmaktadır. TNF- α ayrıca, stres sırasındaki kas katabolizması ve kaşeksi üzerine de önemli etkileri olan bir sitokindir. TNF- α 'nın diğer fonksiyonları arasında; koagülasyonun aktivasyonu,

prostoglandin E2, trombosit aktive edici faktör, glukokortikoidler ve eikozanoidlerin salınımının artırılması sayılabilir (19).

6. Endotelyal faktörler:

A-Araşidonik asit metabolitleri:

a-Prostasiklin (PGI₂):Endotel hücrelerinden ayrılan vazoaaktif ajandır. Güçlü antiagregan ve vazodilatatördür.

b-Tromboksan A₂ (TA₂): Araşidonik asitten siklooksijenaz yardımıyla oluşan ikincil metabolittir. Trombositleri agrege eder ve vazokonstrüktördür. Reperfüzyon sırasında üretimi güçlü bir şekilde uyarılır. İ/R sırasında endotele nötrofil adezyonunu indükleyen güçlü bir kemotaktikdir.

c-Lökotrien B₄ (LT B₄): İ/R boyunca endotelyal disfonksiyonda önemli rol oynayan ve lipooksijenaz yoluyla oluşan araşidonik asit metabolitidir. Nötrofillerin adezyonu ile SOR ve proteazların üretimini artırır (20).

B-Nitrik oksit (NO): L-Arginin'in nitrik oksit sentetaz katalizörlüğünde oksidasyonu ile oluşurlar. Endoteldeki bu enzimatik aktivite aynı zamanda PMNL, makrofajlar, böbrekler, karaciğer Kupffer hücreleri ve serebellar nöronlarda da görülür. NO'in yarılanma ömrü saniyelerle ölçüldüğü için sadece üretildiği kaynağın çevresindeki hücreleri etkileyebilir. Kısa yarı ömrü NO'in etkilerinin esas olarak sentez hızı tarafından düzenlendiğini kabul ettirmektedir. Şok ve travmada nitrat ve nitrit metabolitleri ile ölçülen NO yüksekliğinin, düşük sistemik vasküler direnç ve yükselmiş endotoksin düzeyleri ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (21).

Aşırı miktarda üretilen nitrik oksitin organizma üzerinde birçok zararlı etkileri vardır. Bu etkilerinin çoğunu enzimlerin demir-sülfür merkezleriyle etkileşerek oluştururlar. Mitokondriyel elektron transport zinciri enzimleri merkezlerinde demir bulundurlar. NO bu enzimleri inhibe ederek mitokondriyal solunumu durdururlar. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz enzimini, adenozin difosfat ribolizasyon mekanizmasıyla veya peroksinitrit oluşumu mekanizmasıyla inhibe ederler. Glikolitik olan bu enzimin inhibisyonu hücrel enerji üretimini durdurur. Ribonükleotid redüktazı inhibe ederek Deoksi ribonükleik asit (DNA) replikasyonunu engeller ve böylece apoptozisi indüklerler. Fazla miktarda üretilen NO hücrel hasarın yanı sıra otokrin ve parakrin fonksiyonu ve bölgesel kan

akımında dağılımının bozulmasına, barsak motilitesinde azalma ile permabilitesinde artışa yol açarlar (22).

Doku dağılımındaki farklılıklar, kalsiyum iyonuna bağımlılık ve tiplerin taşıdıkları özellikler açısından NOS'ın üç izoformu vardır. Tip1 (ncNOS) nöral NOS'u oluşturur ve bunun enzim aktivitesi intraselüler kalsiyum iyon artmasına bağlıdır. Tip2 (iNOS) hepatosit, kardiyak miyositler ve respiratuar epitelyum gibi birçok hücrede bulunan uyarılabilir bir enzimdir ve aktivitesi intraselüler kalsiyum iyon konsantrasyonuna bağlı değildir. iNOS'un inflamasyondaki önemi endotel, düz kas hücreleri ve makrofajlarda da bulunmasıdır. Bunlar IL-1 β , TNF- α ve interferon gama ve gram negatif bakterilerin duvarındaki hücrelerde bulunan lipopolisakkarit tarafından oluşturulan mediatörler ile çeşitli inflamatuvar sitokinler tarafından uyarılmaktadır. Tip 3 (ecNOS) primer olarak endotel içinde sentezlenmiş aktivitesi kalsiyum iyon düzeyine bağlı NOS'dur. Splanknik hipoperfüzyon sitokinlerin sentezini başlatır. Bu sitokinler IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IFN- gama olup iNOS enzimini indüklerler. Böylece NO üretimi artar. iNOS normal şartlar altında bütün hücrelerde bulunmaz. iNOS ekspresyonu için bazı proinflamatuvar sitokinlerin aktivasyonu gereklidir. iNOS sentezinin aktivasyonu transkripsiyonel düzeyde NF-kB üzerinden gerçekleşmekte ve patolojik sürecin başlangıcından kısa bir süre sonra ortaya çıkmaktadır. Bu durum iNOS aktivitesinin ve NO'in saptanmasında zamanlamanın önemini göstermektedir. iNOS'un indüksiyonu sonucunda ortamda konsantrasyonu artan NO süperoksit anyonu ile birlikte peroksinitrat oluşturur. Bu madde çok etkili bir oksidan olup, hücrelerin lipid ve protein komponentlerini etkileyerek ciddi bir yıkıma yol açarlar. Bunun sonucunda DNA parçalanır, mitokondriyal disfonksiyon gelişir ve apoptozis gerçekleşir (21).

1.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran moleküllerdir. Son yıllarda birçok hastalık oluşumundaki yapısal ve fonksiyonel bozukluklardan sorumlu tutulurlar. Oldukça aktif olan bu moleküller, özellikle demir gibi geçiş metallerinin varlığında ortaya çıktıkları gibi birçok ağır metallere maruz kalınımında ayrıca metilmalonik asid ve aminolevülinik asid gibi toksik maddelerin artışı durumlarında da miktarları yükselebilmektedir (22).

Hücre içi moleküllerin oksidasyonunun çoğunluğu iki elektronun Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) veya Flavin adenin dinükleotid (FAD) gibi uygun alıcılara transfer edilmesi şeklinde olur. Son basamak olan oksijenin suya redüksiyonu oksijene güçlü bir şekilde bağlanan sitokrom c oksidaz tarafından katalizlenir. Bu işlem sırasında herhangi bir ara ürün oluşmaz. Ancak oksijenin elektronik yapısı her defasında bir elektron eklenmesi ile redüksiyon oluşturmaya yatkın olduğu için ortaya oksijen radikalleri hücrel hasara neden olurlar. Radikal oldukça etkin eşleşmemiş elektronu dış yörüngesinde bulunduran bir molekül olarak tanımlanır. Bu yörüngeyi tamamlamak için başka bir molekülden bir elektronun koparıldığı zincirleme reaksiyonlara yol açarlar. Oksijene her defasında elektron transfer edilmesi süperoksid anyonu, hidrojen peroksid ve hidroksil serbest radikali oluşumuna neden olur. Bunlar içerisinde hidroksil radikali lipid peroksidasyonu ve diğer toksik radikalleri oluşturduğu için en tehlikeli serbest radikaldir. Hidrojen peroksid tek başına bir serbest radikal olmamasına karşın, Fenton veya Haber-Weis reaksiyonları yoluyla demir veya bakır varlığında hidroksil radikali oluşumuna yol açarlar (23, 24).

Hücredeki oksidatif işlemler genellikle elektronların oksijene su oluşturmak amaçlı bir ara ürün salınmaksızın transferi ile sonuçlanmasına karşın, az miktarda oksijen radikali elektron transfer reaksiyonlarından kaçarak oluşurlar. Metal katalizi reaksiyonlara OH radikali veya demir-oksijen türleri membrandaki çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek lipid peroksidasyonuna neden olabilirler. Bunun yanı sıra reaktif aldehidlerde (MDA gibi ürünler) ortaya çıkar. Sitokrom P 450 sistemi de endoplazmik retikulumda oksijen radikallerini üretebilirler. Oksijen radikalleri aynı zamanda bakteriyel enfeksiyon gibi inflamasyon olayları sırasında hücrelerde üretilirler. Akut enfeksiyonda oksijen radikallerinin üretilmesi ve bakterinin öldürülmesi etkin bir işlem iken, uzamış enfeksiyonlarda fagositlerin ölmeye başlamasına bağlı salınan toksik oksijen radikalleri çevre hücreleri de etkilerler. Kozmik radyasyon, kimyasal madde, ilaçların alınması ve sigara kullanımı da reaktif oksijen türlerinin oluşmasına öncülük ederler (23).

Reaktif oksijen türleri hücrelerde bulunan her sınıftan ana makromoleküllerle etkileşip hasar yapabilirler. Plazma ve membranda bulunan fosfolipidler hidroksil radikali ile çoklu doymamış yağ asidinden bir hidrojenin koparılması ile başlayan,

bir serbest radikal zincir reaksiyonu olan lipid peroksidasyonuna çok duyarlıdırlar. Ortaya çıkan lipid radikalleri, oksijen ile etkileşip lipid peroksi radikallerini ve malondialdehit oluştururlar. MDA suda çözünür bir molekül olup kandaki düzeyleri ölçülebilir. Lipid peroksidasyonunun en önemli etkisi, membran geçirgenliğini artırarak, kalsiyum ve diğer iyonların hücre içine geçmesi sonucu hücrede şişme meydana getirmesidir. Benzer bir geçirgenlik artışı da hücre organel membranlarında olur, iyon dağılımı bozulur ve hücre içi harabiyet meydana gelir. Oksijen radikallerinin en önemli etkisi hem mitokondriyal, hem de çekirdekdeki DNA'nın hasarlanması sonucu oluşan mutasyonlardır. Ferröz iyonlarının nonspesifik olarak DNA'ya bağlanması hidroksil radikallerinin etkileyeceği bölgeyi belirleyebilir ve sonuçta sarmal kopabilir. Elektron transport zinciri toksik oksijen radikallerinin en büyük kaynağı olduğundan, mitokondriyal DNA oksijen radikal hasarından daha fazla etkilenir. Nükleer DNA tamir mekanizması kadar aktif ve etkili olan koruyucu histon tabakası yoluyla da hasardan korunurlar. Mitokondriyal DNA hasarı enerji metabolizmasını etkileyen mutasyonlarla sonuçlanır (23, 24,25).

Reaktif oksijen türevlerinin en önemli intrasellüler kaynağı mitokondridir. Oluşan bu reaktif oksijen türevleri mitokondriyal DNA'ya zarar verir. Mitokondriyal elektron transport sisteminde süperoksid üreten iki bölgenin bulunduğu gösterilmiştir. Elektron transport sisteminde kullanılan oksijenin %1-2'si bu şekilde süperoksid oluşumu ile sonuçlanır. Glikozun aerobik solunumu ile yıkılması sırasında, tüm anabolik ve katabolik süreçlerde moleküler düzeyde elektron kaçışları olur. Bu sırada bir miktar oksidan moleküller ortaya çıkabilir (26,27).

Entoksikasyonlar, radyoaktivite, allerjik durumlar, travma, iskemi ve hemoraji gibi durumlarda da elektron transport sisteminden kaçaklar olur ve oksidan moleküller oluşur. Yine değişik mekanizmalarla hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarının arttığı durumlarda oksidan enzimler aktive olur ve çok sayıda mediatör ve oksidan madde oluşmaya başlar (28, 29). Nötrofillerde hücre zarlarında bulunan Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat-oksidad (NADPH-oksidad) enzimi aracılığıyla moleküler oksijeni redükte ederek süperoksid radikali (O_2) oluşturabilirler. Aktive olmuş nötrofiller aynı zamanda miyeloperoksidaz (MPO) enzimi salgılayarak, hidrojen peroksit ve klorür iyonlarından hipoklorik asit (HOCL) oluşmasını katalize ederler. HOCL, güçlü bir oksidandır ve sülfidril grubu veya

nitrojen içeren bileşikler ve DNA gibi birçok maddeyle kolayca reaksiyona girebilirler (30).

1.3. Antioksidanlar

Antioksidanlar serbest radikal olarak çalışan molekül veya bileşiklerdir. Çoğu antioksidan elektron vericidir ve serbest radikallerle reaksiyona girer ve su gibi ürünler oluştururlar. Antioksidanlar serbest radikallere bağlanarak onları inaktive eder. Böylece antioksidanlar oksidatif strese karşı organizmayı korur ve hücrelere zarar görmesini engellerler. Antioksidanlar:

1. Hücre içi enzimler: Süperoksid Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz
2. Endojen moleküller: Glutasyon (GSH), Sülfidril grupları, alfa lipoik asit, COQ 10, tioredoksin
3. Esansiyel Besinler: Vitamin C, Vitamin E, Selenyum, N-asetil sistein (NAC)
4. Besinsel bileşikler: Bioflavinler, proantosiyanidler

Organizmayı oksidatif stresten korumak için bütün hücreler intraselüler antioksidanlara sahiptir. GSH hücre içi antioksidan olarak çok önemlidir. GSH düzeyini artırmak için birkaç yol vardır. Gastrointestinal sistemden verilebilir fakat emilimi yeterli değildir. Sistein ise GSH üretiminde başlıca hız kısıtlayıcı prekürsördür. NAC ise en önemli sistein yöneticisidir (31).

1.4. iNOS' ın Transkripsiyonel Regülasyonu

iNOS' ın transkripsiyonu farklı uyaranlarla indüklenir. Belli bir uyarıya karşılık türler arasındaki NO üretimi ve iNOS ekspresyonu arasındaki farklılıklar iNOS gen transkripsiyonuna yol açan hücre sinyal yollarındaki farklılıkları gösteriyor olabilir. iNOS indüksiyonu için çoğu insan hücresi genellikle IFN gama, TNF- α ve IL-1 β ' dan oluşan bir sitokin karışımına ihtiyaç duyar. Sitokinler, iNOS promoterinin maksimum transkripsiyonel aktivitesini elde etmek için sinerjik çalışırlar. iNOS indüksiyonu temel olarak transkripsiyonel düzeyde gerçekleşir (32, 33).

İnsan iNOS genindeki promoterin üst bölgesi birçok hızlandırıcı alanlar içerir. Bu alanlarla birçok düzenleyici elemanlar oluşturulur. Bu elemanlar NF-kB bölgesi, IFN- γ yanıt elemanı (gamma IRE) (34), gamma uyarı bölgesi (GAS), aktivatör protein-1 (AP-1) elemanı (35) ve TNF-RE bölgesinden oluşur. TNF- α ve IL-1 β indüklenmesini sağlayan insan iNOS promoterinden önce yerleşmiş olan birçok NF-kB öncü elemanı insan karaciğer ve akciğer epitelyum hücrelerinde

bulunmuştur (32). NF-kB sitoplazmada inhibitörüne (I kapa B) bağlı olarak inaktif bir şekilde durur. Farklı ajanlarla uyarılması inhibitörün ayrılmasına ve serbest NF-kappa B'nin nükleusa geçmesini sağlar (36).

1.4.1. Nitrik oksit aracılığıyla oluşan sitotoksitenin mekanizması

NO'nin etkilerini direkt ve indirekt olarak gösterebilir. NO'nin düşük konsantrasyonda direkt, yüksek konsantrasyonda indirekt etkisi mevcuttur. eNOS ve nNOS tarafından üretilen düşük miktardaki NO, guanil siklazın hem grubundaki demir ile etkileşerek siklik guanozin monofosfat (cGMP) enziminin üretimini aktive ederek hızlı geçici hücrel yanıtı neden olur (37). Yüksek düzeydeki iNOS tarafından üretilen NO ise tersine oksidanların üretimini artırarak toksisiteye neden olurlar. NO'nin kimyasal reaktivitesi ve toksisitesi süperoksitin oluşturduğu difüzyon sınırlı reaksiyon ile peroksinitrit oluşumuna bağlıdır. Süperoksitin üretimi NADPH oksidaz tarafından başlatılır, bu işlem membrandaki sitozolik proteinlerin translokasyonu ile olur. iNOS ve NADPH oksidaz farklı regüle edilse de bu sistemler aynı inflamatuvar uyarılar ile oluşur (38). NO yüksek konsantrasyonlarda endojen süperoksit dismutazlar için süperoksitlerle yarıştığı bilinen tek biyolojik moleküldür. Peroksinitrat sadece hücreler yüksek miktarda NO ve süperoksit ürettiğinde oluşmaktadır.

iNOS, NO miktarını artıran temel faktördür (39). Bunun yanı sıra nNOS normal çalışan aktive hücrelerden peroksinitrat üretimi için yeterli miktarda NO oluşturabilir (40). NO derivelerinin hücrel hedefleri: arasında DNA, mitokondri, proteinler ve yağlar yer almaktadır (41). NO kendi başına güçlü bir oksidan olmadığı gibi nitratlayıcı bir ajan da değildir. NO temel olarak reversible etkileşimlerle demir merkezleri veya radikal kombinasyon reaksiyonları ile yüksek oranda reaktif moleküller oluşturur. Peroksinitrat gibi bu ajanlar güçlü nitratlayıcı ya da oksidan ajanlardır (42). Peroksinitrat, bir çok biyolojik moleküle yavaş reaksiyon gösterir ve onun selektif oksidan olmasına neden olur. Protein tirozin kalıntılarının peroksinitrat tarafından nitrasyonu–nitro tirozinin oluşumuna yol açar. Birçok yapısal proteinler tirozinden zengin olduğundan peroksinitratın hedefidir. Yapısal proteinlerin modifikasyonu özellikle nitrasyonun patolojik hedef olmasında önemlidir ve sadece bir kaç değişimle hücrenin normal fonksiyonel yapısı bozulur (39). Hücre dışında

oluşturulan peroksinitrit, membranlardan geçebildiği için hücre dışı veya hücre içi proteinlerle etkileşime geçebilirler.

İnflamatuvar olaylarda doku nitrasyonu, peroksinitrit üreten hücre bölgelerinde ve güçlü nitrotirozin immün reaksiyonu olan makrofaj ve nötrofilden zengin bölgelerde görülürler (43). Bunun yanı sıra bazı hücrelerde de NO hücre korunmasını artırmıştır (44). NO demir nitrozil kompleksleri oluşturarak oksidan hasardan hücreyi korumakta, böylece demirin prooksidan reaksiyonlarının katalizi için daha az miktarda bulunmasına neden olmaktadır (45). NO, NADPH oksidazın inhibisyonu, OH iyonunun ya da stres regülonlarının uyarımı gibi yollarla hücre korunmasını artırır (46). NO'nun veya metabolitlerinin etkisi NOS izoformlarının lokalizasyonu, yapısı ve çevre dokulardaki moleküllerin varlığına bağlıdır.

1.5. Karaciğer İskemik Hasarı

Klinik olarak karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı sıklıkla transplantasyon, iskemik serebrovasküler olay, miyokard infarktüsü, şok, resüsitasyon ve turnike uygulamaları sonrasında görülmektedir (47). Kompleks karaciğer yaralanması, tümörler, kist ve granulomların cerrahisi esnasında parankimal kanamayı azaltma ve cerrahi tekniği uygulama kolaylığı için sıklıkla portal triadın klempenmesi olan pringle manevrası tercih edilmektedir. Karaciğer ile ilgili cerrahi girişimler ve karaciğer transplantasyonu gibi birçok durumda geçici olarak kan akımının durması ile iskemi, kan dolaşımının tekrar sağlanması ile de reperfüzyon oluşmaktadır. Pringle manevrası boyunca sıcak iskemi süresinin uzaması karaciğer perfüzyonunu bozarak hepatik nekroz ile sonuçlanacak olaylar zincirinin başlamasına neden olmaktadır. Pringle manevrası organizmada hemodinamik değişikliklere neden olmaktadır. Bu manevra sonrası splenik kanın porto-sistemik dolaşıma dönme olanlığı vardır. Bu nedenle insanlarda portal triadın klempenmesinden sonra denek hayvanlarında sıkça görülen kardiyovasküler kollaps görülmez (48). Karaciğerdeki iskemi ve iskemi-reperfüzyon hasarını azaltmak için değişik metodlarda denenmiştir. Bunlar operasyon sırasında aralıklı portal triad klempajı yapılarak perfüzyonun sağlanması (49) ve operasyon sırasında karaciğere topikal hipotermi uygulaması olarak sayılabilir (50). Karaciğer tarafından tolere edilebilen normotermik iskeminin üst süresi tam olarak bilinmemektedir. Günümüzde normotermik, elektif şartlarda

yapılan hepatik cerrahide portal triad klempajında sıcak iske mi zamanının 90 dakikaya kadar uzatılabileceği kabul edilmektedir. İskeminin 90. dakikasından sonra ise karaciğerdeki değişikliklerin geri dönüşsüz olduğu da çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (51), karaciğer sıcak iskemisini 30 veya 45 dakika takiben perfüzyon oluşturulan rat modelinde kupffer hücrelerinden reaktif oksijen radikallerinin saatlerce salındığı gözlenmiştir (52).

1.5.1. Karaciğer İskemisinin Patofizyolojisi

İskemik dönem süresince dokuda toksik serbest oksijen radikalleri üretilir. Reperfüzyon sırasında serbest oksijen radikalleri ile süperoksit radikalleri, endotelial hasar, artmış mikrovasküler permabilite ve doku ödeme ne neden olmaktadır. Ayrıca aktive olan adezyon molekülleri ve sitokinler sistemik inflamatuvar yanıtı başlatabilirler. Bu olaylar zinciri İ/R hasarı olarak adlandırılmaktadır (53).

Karaciğerdeki iske mi-reperfüzyon hasarına yol açan faktörler oksijen radikalleri, lökosit migrasyonu ile aktivasyonu, endotelial hücre hasarı, mikrosirkülasyondaki düzensizlikler ve koagülasyon sisteminin aktivasyonu olarak özetlenebilir. İske mi-reperfüzyon sonucunda kupffer hücreleri aktive olur ve bu hücrelerden proteazlar, TNF- α ve lökotrienler gibi toksik mediyatörler açığa çıkar. Bunun yanı sıra aktive olmuş kupffer hücrelerinin prostoglandin ve tromboksonları da salgıladığı bilinmektedir. Reperfüzyon sırasında kupffer hücrelerinden salınan serbest radikallerde ağır parankimal hücre hasarına neden olurlar (54). Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonunu başlatarak hücre sel hasara neden olurlar. Hücre membranlarının hasarlanması hepatositlerin homeostazını bozarak apoptozis veya nekroza neden olmaktadır (55). Hepatositlerin serbest radikal oluşumunu sınırlayabilme, radikal oluşumları nötralize edebilme ve zarar görmüş hücre sel elemanlarını tamir edebilme gibi koruyucu mekanizmalarda sahip olduğu varsayılmaktadır. Karaciğer reperfüzyonu sırasında oluşan splanknik konjesyon sonucu bağırsak ve dalaktan salınan proinflamatuvar maddelerin sistemik dolaşıma karışması ile birlikte karaciğer hasarı tetiklenmektedir. Ayrıca sistemik inflamatuvar yanıt sendromu veya çoklu organ yetmezliği ortaya çıkabilmektedir (56). İnsan hepatositlerinde reperfüzyon sonrası lipid peroksidasyonu ve buna bağlı olarak şiddetli hasarın oluşması için yaklaşık 2.5 saatten uzun bir hipoksi dönemine gereksinim duyulduğu tahmin edilmektedir (57).

1.5.2. Karaciğerde nitrik oksit oluşumu

Hepatik İ/R hasarında önemli rol oynadığı düşünülen iki NOS formu yer almaktadır. Endotelial NOS (eNOS) sinüsoidler ve diğer epitelyomal hücrelerde yapısal olarak bulunmaktadır ve aktivitesi intrasellüler kalsiyum düzeyleri ile yakından ilişkilidir (58). İndüklenebilir NO (iNOS) hepatositler tarafından olabileceği gibi sıklıkla inflamatuvar mediyatörlere bir cevap olarak kuppfer hücreleri, nötrofiller gibi inflamatuvar hücrelerce de salınabilirler (59). Karaciğerde NF-kB aktivasyonu proinflamatuvar sitokinler ve adezyon moleküllerinin sentezini artırmaktadır. Oksidatif stres hem lipid peroksidasyonuna, hem de NF-kB aracılığıyla doku hasarının büyümesine neden olmaktadır. iNOS aktivite açısından intrasellüler kalsiyum ile NF-kB düzeylerinden bağımsızdır ve NO üretimi anlamında eNOS formuna göre patofizyolojik yönden daha önemli görünmektedir (60).

Karaciğer içerisinde sinüsoidal epitel hücrelerinden salınan bazal bir NO düzeyi vardır ve bu eNOS aktivitesi kaynaklı NO akıma olan cevapla artış gösterir (58). Hepatositler ve kuppfer hücreleri IL-1 β 'e cevap olarak yüksek konsantrasyonlarda NO sentezi yaparlar. Kuppfer hücrelerince IL-1 β 'e karşı sentezlenen TNF- α hepatositlerden NO üretimini destekler (61). Her iki hücrede NO üretimi NF-kB aktivasyonu ile gelişen iNOS sunumunun sonucudur (62).

Nitrik oksit, NF-kB inhibisyonu ile iNOS gen transkripsiyonunu inhibe edebilir. Hepatositlerden NO üretimini azaltan prostoglandin E2, NO'nun makrofajlardan sentezini de etkilemektedir (63). IL-1 β ve TNF- α 'nın hepatik İ/R sırasında arttığı bilinmektedir ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda da IL-1 β antagonistleri ve anti-TNF- α antikoru verilmesi halinde I/R hasarının azaldığı görülmüştür (64).

1.6. Fensiklidinler, Ketamin

Fensiklidinler, fiziksel ve kimyasal özellikleriyle, klinik etkileri bakımından, diğer intravenöz (iv) anesteziklerden oldukça farklı bir grup oluştururlar. Ketaminin etkisi ile gelişen katalepsi, hafif sedasyon, amnezi ve analjezi ile karakterize tabloya "dissosiyatif anestezi" adı verilmektedir. Corssen ve ark tarafından ilk kez 1966'da klinik olarak uygulanan ketamin, bu grubun halen tek ve yaygın olarak kullanılan ilacıdır. Ketamin, suda eriyen tuz olup, berrak, renksiz ve oda ısısında stabil bir solüsyon halindedir. Solüsyonun pH'si 3.5-5.5'tur. Ketamin yağda erirliği yüksek

olduğu için önce beyin ve kanlanması fazla olan dokulara gider. Hücre zarlarını kolaylıkla geçer, yayılımı dolaşım zamanına bağlı olarak hızlıdır. Karaciğerde mikrozomal emzimlerce yıkılır ve yıkım ürünleri böbrekler ile atılır. Yıkım ürünlerinden biri olan norketamin hipnotik etkili olup, ketaminin 1/3-1/5'i etkinliktedir. Bu, bilincin dönmesinden sonra görülen uzun süreli sersemlik ve tam uyanamamayı açıklar. Uygulamadan sonra ilk olarak beyindeki assosiyasyon yolları bloke olur. Bundan sonra retiküler aktive edici ve limbik sistemler etkilenir. Talamokortikal sistem deprese olurken, limbik sistemin aktivasyonu sonucu, beyin bu bölgesi "dissosiyatif anestezi" olmaktadır. Bu nedenle ketaminin yaptığı anesteziye "dissosiyatif anestezi" denilmektedir. Oldukça kuvvetli analjezik etkisi vardır. Santral etki yanında, spinal kord arka boynuz nöronları üzerinde de etki yapar. Opioid reseptörlerine bağlandığına ait veriler de bulunmaktadır. Bu etkileri nedeniyle intratekal veya epidural olarak da analjezik amaçla kullanılmıştır. Ketamin subanestezik, yani 0.5 mg/kg'dan az dozlarda intramüsküler (im) olarak uygulandığında, bilinç kaybı olmaksızın analjezi sağlar. Kan basıncını yükseltici etkisi, serebrovasküler hastalık hikâyesi, hipertansiyon veya belirgin kardiyak dekompanseasyonu olan hastalarda zararlı olabilir. Yüksek orandaki dozlarından veya ağır opioid premedikasyonundan sonra, solunum depresyonu gelişebilir. İntrakranial ve intratekal basınçta artma yapabilir. Visseral analjezi sağlamaz. Abdominal veya torasik cerrahide diğer anestezikler ile kombine edilmelidir. Bulantı ve kusma sıklığı tiyopentalden fazladır. Psikomimetik etkiler, ilacın dozu, verilmiş şekli, girişimin tipi, hastanın yaşı, cinsiyeti ve kişiliğine bağlı olarak değişen sıklık ve şiddette olup, ketamin kullanımını sınırlayan en önemli yan etkilerindendir. Bunlar indüksiyon ve özellikle uyanma sırasında psikomotor aktivite ile birlikte veya tek başına görülebilirler. Psikomotor etkiler, görsel hallüsinasyonlar ve deliriuma kadar değişik şekillerde olabilir. Erişkin yaş grubu ile kadınlarda daha sık görülür. Premedikasyon yapılmamış olması veya premedikasyonda atropin, droperidol kullanılması, hızlı enjeksiyon, hastanın tam uyumadan veya ayılma devresinde stimülasyonu insidansı artırır. Ayılma döneminde görsel ve işitsel uyarıların algılanma ve değerlendirilmesinde değişiklik olmaktadır. Bu etkiler, diazepam veya lorazepam ile önlenemez veya kontrol altına alınabilirler. Diğer iv anestezikler gibi, indüksiyonda, tek başına anestezik olarak, diğer sistemik ajanlarla veya bölgesel anestezi ile

kombine edilerek kullanılabilir. Özellikle bebek ve çocuklarda, terapötik, diyagnostik işlemler veya tekrarlanan basit cerrahi işlemlerde çok değerlidir. Psikiyatrik bozukluklar, epilepsi, hipertroidi, kontrol edilmemiş hipertansiyon, anstabil anjina pektoris, intraoküler veya intrakraniyal basıncın arttığı durumlarda kullanılmamalıdır (65).

Yapılan çalışmalarda ketaminin doz bağımlı olarak TNF- α , IL-6 ve IL-8 üretimini baskıladığı gösterilmiştir (8,9). Ketamin lipopolisakkarit ile oluşan karaciğer hasarını, Hemoksijenaz-1'i artırarak ve iNOS düzeyini düşürerek önler. Ketamin lipopolisakkarit ile oluşan karaciğer hasarında hepatoprotektif etki gösterdiği, bu nedenle ketaminin anestezi gerektiren sepsisli hastalarda ilk seçilmesi gereken anestezik ajan oldubileceği ortaya konmuştur. Ketamin endotoksin ile oluşan TNF- α düzeylerini baskılar ve endotoksemik şok modeli oluşturulan ratlarda mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir (8). Ketamin NF-kB inhibisyonu ile IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini baskılar. Ketamin lökositlerin reaktivitesini inhibe ederek antiinflamatuvar etki gösterir (9).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alındıktan sonra, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (FÜDAM) laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmamıza ağırlığı 150-200 gr. olan 18 adet Wistar-Albino cinsi dişi rat kullanıldı. Çalışmada, Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar için Kullanılan Vertebralı Hayvanların Korunması için Avrupa Antlaşması etik hükümlerine uyuldu ve en az sayıda rat kullanılmaya dikkat edildi. Denekler 12 saat gün ışığı alan ve havalandırma tertibatı bulunan odada (22-24°C, %70-75 nem) tutuldu. Ratların standart laboratuvar yemi ve su ile beslenmesi sağlandı. Deneiden 12 saat önce yemleri kesildi ve sadece su almalarına izin verildi.

Kapalı zarf usulü yöntemle randomize edilen olgular 3 gruba (n=6) ayrıldı. Tüm deneklerin anestezisinde Xylazine (Romphun® Bayer-İstanbul) 5-10 mg/kg intraperitoneal ve eter inhalasyonu uygulandı. Tüm gruplardaki hayvanlar reperfüzyon periyodunun sonunda, Aorta Abdominalis kesilmek suretiyle hipovolemik şok oluşturularak kurban edildi.

2.1. Cerrahi Teknik

Ameliyat masasına alınan denekler örtüm ve arıtım işleminden sonra batın katları açılarak karaciğer ve A. Hepatika propria ortaya konuldu. Grup 1'deki deneklere A. Hepatika propria serbestleştirildikten sonra klemplenecek 30 dakika iskemi ardından 4 saat reperfüzyon işlemi yapıldı.

Grup 2'deki (n=6) deneklere 30 dakika iskemi sonrası 2.5 mg/kg Ketamine (Ketalar®, 50 mg/ml Eczacıbaşı-İstanbul)İM., Grup 3'dekilere ise aynı dönemde 10 mg/kg Ketamine İM. uygulandı, ardından 4 saat reperfüzyon sağlandı.

Tüm deneklerden iskemi öncesi, sonrası ve reperfüzyondan 4 saat sonra kuyruk veninden kan örnekleri alınarak MDA, AST, ALT, TNF- α , IL-6, IL-1 β , ve NO düzeyleri saptandı. Biyokimyasal analiz yapılmaya kadar örnekler derin dondurucuda saklandı.

2.2. Biyokimyasal analiz

Deneklerin plazma MDA düzeyleri yüksek performanslı likit kromatografisi (HPLC) yöntemi ile 515 nm eksitasyon, 553 nm emisyon dalga boyunda C-18 (125

nm x 4 mm) kolonu kullanılarak akış hızı 1 ml/dk. hızında yapıldı. Elde edilen veriler mmol/L olarak değerlendirildi.

TNF- α , IL-1 β , IL-6 düzeyleri ise ELISA yöntemi ile ticari kitler (invitrogen corporation 542 Flynn Road Camarillo, CA 93012 USA) kullanılarak kit içeriğine uygun olarak çalışıldı. Elde edilen veriler pg/ml olarak değerlendirildi.

Nitrik oksit düzeylerinin değerlendirilmesinde nonspesifik reaksiyonların önüne geçebilmek için örnekleri önce deproteinize edip daha sonra nitrit ve nitrat konsantrasyonlarını saptandı. Plazmada nitrit ve nitrat miktarı deproteinizasyondan sonra Griess reaksiyonu ile belirlendi. Totalnitrit (nitrit+nitrat) konsantrasyonu modifiye kadmiyum redüksiyon metodu ile tayin edildi (66). pH 9.7 glisin tamponunda bakır kaplı kadmiyum granülleri deproteinize numune süpernatantı ile 90 dakikalık inkübasyona bırakılarak nitratın redüksiyonu sağlandı. Üretilen nitrit; sülfanilamid ve buna bağlı N naftiletlen diamin diazotizasyonu ile reaksiyon sonucu oluşan pembe bir rengin 545 nm dalga boyunda spektrofotometrede mmol/lit oranı değerlendirildi.

Serum AST, ALT düzeyleri ise otoanalizörde ölçüldü. Sonuçlar U/l olarak değerlendirildi.

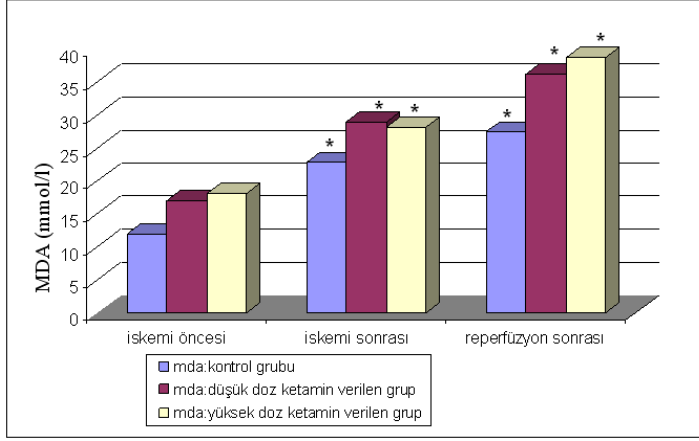
Doku örnekleri Fırat Üniversitesi Hastanesi Patoloji laboratuvarında incelendi. %10'luk formalinde fiske edilmiş ve parafine gömülmüş olan karaciğer örneklerinden 5 μ 'luk kesitler alınarak, hematoksilen eozin ile boyandı ve ışık mikroskopunda değerlendirildi. Hücre histolojisindeki değişimler konjesyon, nekroz, sitoplazmik vaküolizasyon, eozinofili, nükleer piknozis ve inflamatuvar hücre yoğunluğu yönünden bir patolog tarafından kör olarak değerlendirildi. Değerlendirmede Karaciğer Histolojik Hasar Skoru (KHHS) kullanıldı (KHHS; 0: hasar yok veya minimal hasar, 1:Hafif hasar, 2: Orta hasar, 3: Şiddetli hasar) (67).

2.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel incelemede SPSS 15.0 programı kullanıldı. Elde edilen veriler ortalama \pm SD olarak alındı. Gruplar arası karşılaştırma varians analizi Posthoc-Tukey HSD testi ile ($p < 0.05$ anlamlı kabul edildi) grup içi tekrarlanan ölçümlerin değerlendirilmesi için Wilcoxon testi kullanıldı ($p < 0.005$ anlamlı kabul edildi).

3. BULGULAR

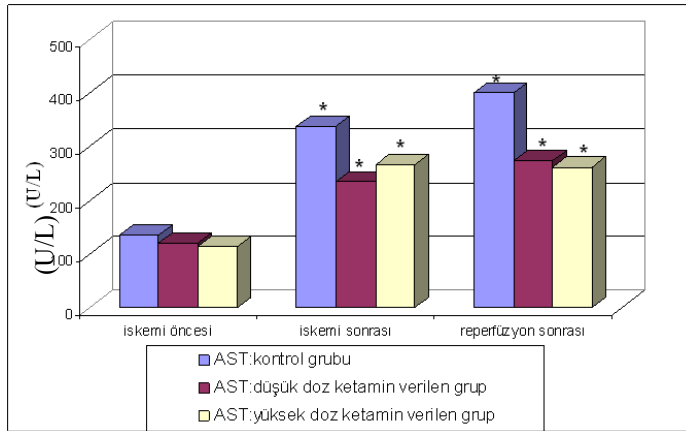
Malondialdehit düzeylerinin tüm gruplarda iskemi öncesi döneme göre, iskemi ve reperfüzyon sonrası dönemlerde arttığı saptandı ($p<0,05$). Aynı dönem içerisinde MDA düzeyleri incelendiğinde ketamin verilen gruplarda kontrol grubuna göre daha fazla arttığı saptandı (Şekil 3).



* $p<0,05$ iskemi öncesi dönemle karşılaştırıldığında her grup için $n=6$

Şekil 3. Serum MDA düzeyleri

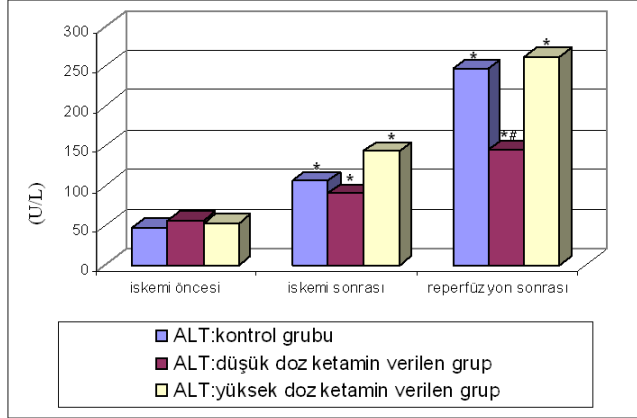
Karaciğer enzimlerinden AST tüm gruplarda iskemi öncesi döneme göre, iskemi ve reperfüzyon dönemlerinde artmış olduğu saptandı. Düşük doz ketamin verilen grupta reperfüzyon sonrası AST düzeyleri kontrol grubuna göre daha az artmış ancak, istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır. Yüksek doz ketamin verilen grupta da AST düzeyi kontrol grubuna göre daha az artmış, fakat istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4).



* $p<0,05$ iskemi öncesi dönemle karşılaştırıldığında her grup için $n=6$

Şekil 4. Serum AST düzeyleri

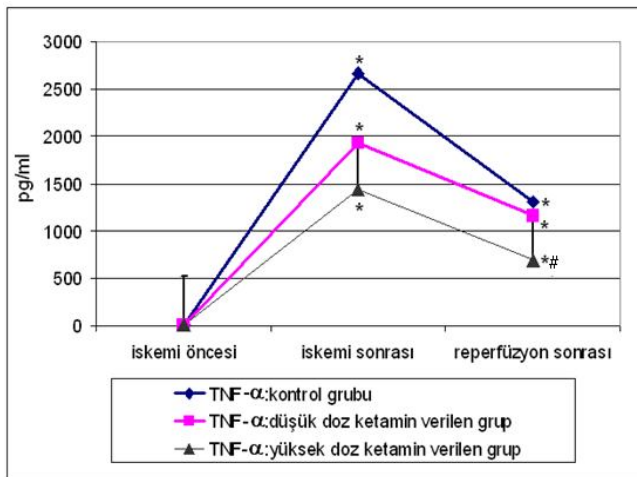
Karaciğer enzimlerinden ALT tüm gruplarda iskemi öncesi döneme göre, iskemi ve reperfüzyon dönemlerinde artmış olduğu saptandı ($p<0,05$). Düşük doz ketamin verilen grupta reperfüzyon sonrası ALT düzeyindeki artış kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük saptandı ($p<0,005$), fakat yüksek doz ketamin verilen grupta ALT düzeyi diğer gruplara göre daha fazla artmıştır (Şekil 5).



* $p<0,05$ iskemi öncesi dönemle karşılaştırıldığında, # $p<0,005$ aynı dönem içerisinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında. Her grup için $n=6$

Şekil 5. Serum ALT Değerleri

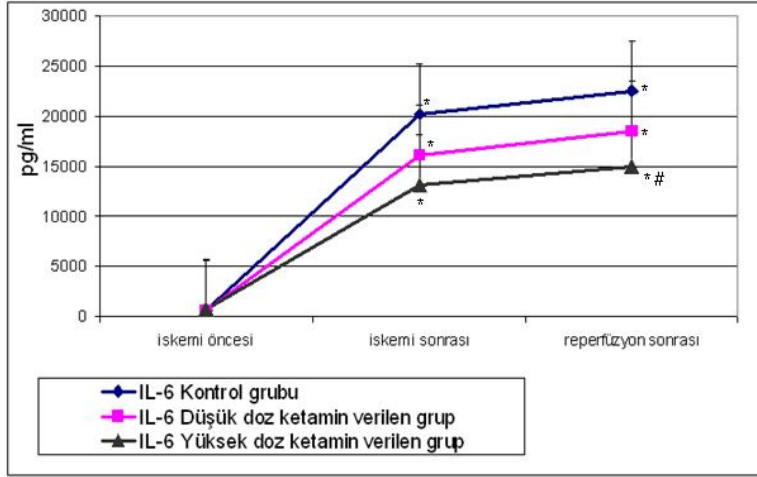
TNF- α düzeylerinin tüm gruplarda iskemi öncesi değerlerine göre, iskemi sonrası dönemde daha belirgin olmak üzere arttığı gözlemlendi ($p<0,05$). Reperfüzyon döneminde yüksek doz ketamin uygulanan deneklerde TNF- α düzeylerinin Grup 1 ve 2'ye göre anlamlı olmak üzere daha az arttığı saptandı ($p<0,005$) (Şekil 6).



* $p<0,05$ iskemi öncesi dönemle karşılaştırıldığında, # $p<0,005$ aynı dönem içerisinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında. Her grup için $n=6$

Şekil 6. Serum TNF- α düzeyleri

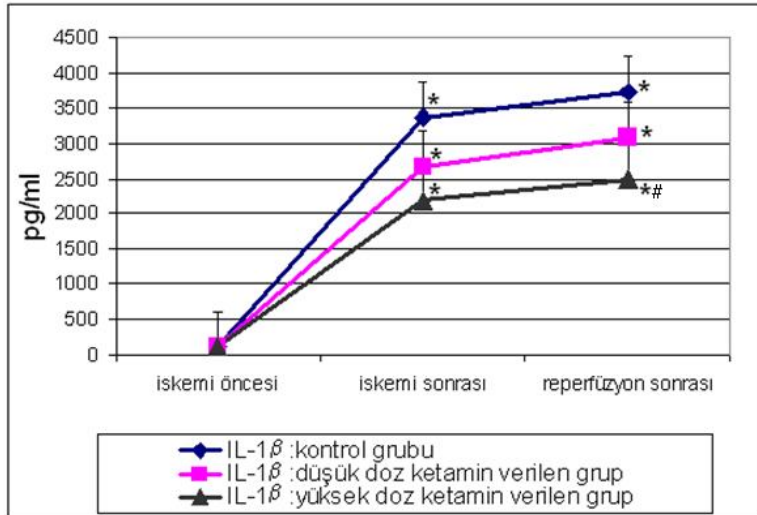
IL-6 düzeylerinin tüm gruplarda iskemi öncesi değerlerine göre, iskemi sonrası dönemde daha belirgin olmak üzere arttığı gözlemlendi ($p<0,05$). Reperfüzyon döneminde yüksek doz ketamin uygulanan deneklerde IL-6 düzeylerinin Grup 1 ve 2'ye göre anlamlı olmak üzere daha az arttığı saptandı ($p<0,005$) (Şekil 7).



* $p<0,05$ iskemi öncesi dönemle karşılaştırıldığında, # $p<0,005$ aynı dönem içerisinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında. Her grup için $n=6$

Şekil 7. Serum IL-6 düzeyleri

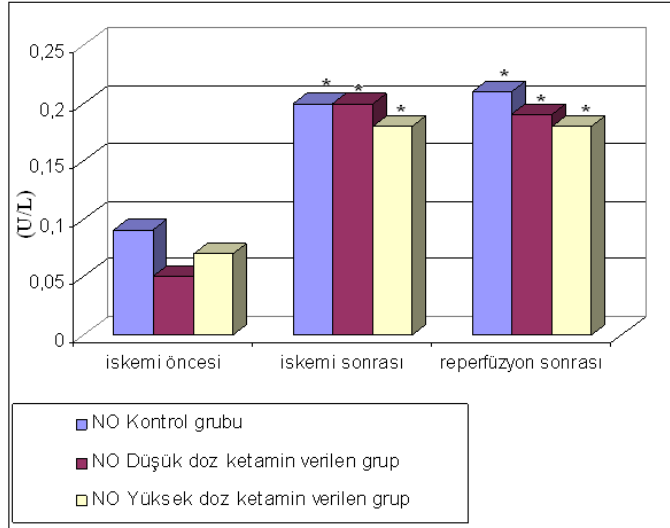
IL-1 β düzeylerinin tüm gruplarda iskemi öncesi değerlerine göre, iskemi sonrası dönemde daha belirgin olmak üzere arttığı gözlemlendi ($p<0,05$). Reperfüzyon döneminde yüksek doz ketamin uygulanan deneklerde IL-1 β düzeylerinin Grup 1 ve 2'ye göre anlamlı olmak üzere daha az arttığı saptandı ($p<0,005$) (Şekil 8).



* $p<0,05$ iskemi öncesi dönemle karşılaştırıldığında, # $p<0,005$ aynı dönem içerisinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında. Her grup için $n=6$

Şekil 8. Serumda IL-1 β düzeyleri

Total nitrit düzeyleri tüm gruplarda iskemi öncesi döneme göre, iskemi ve reperfüzyon dönemlerinde artmış olduğu saptandı. Düşük doz ketamin verilen grupta reperfüzyon sonrası total nitrit düzeyleri kontrol grubuna göre daha az artmış, fakat istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır. Yüksek doz ketamin verilen grupta da total nitrit düzeyleri kontrol grubuna göre daha az artmış fakat istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 9).



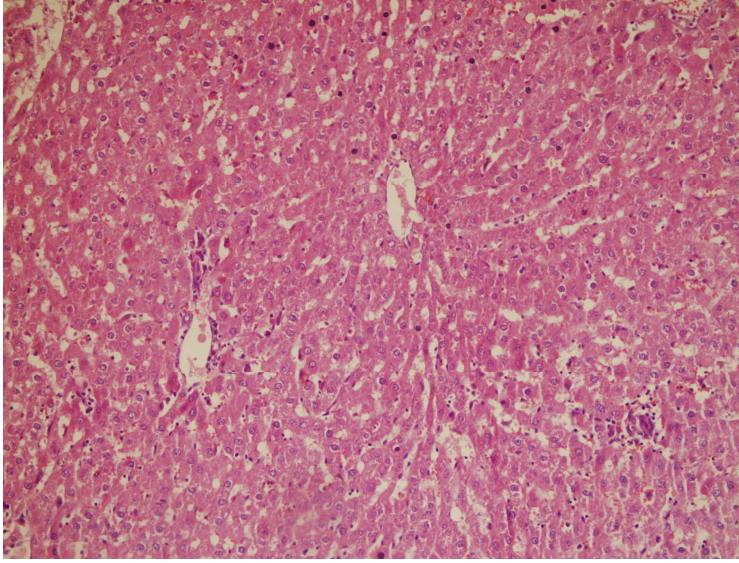
* $p < 0,05$ iskemi öncesi dönemle karşılaştırıldığında her grup için $n=6$

Şekil 9. Serum NO düzeyleri

Tablo 1. İskemi öncesi ve iskemi ve reperfüzyon sonrası alınan serum MDA, AST, ALT, TNF- α , IL-6, IL-1 β ve NO düzeyleri

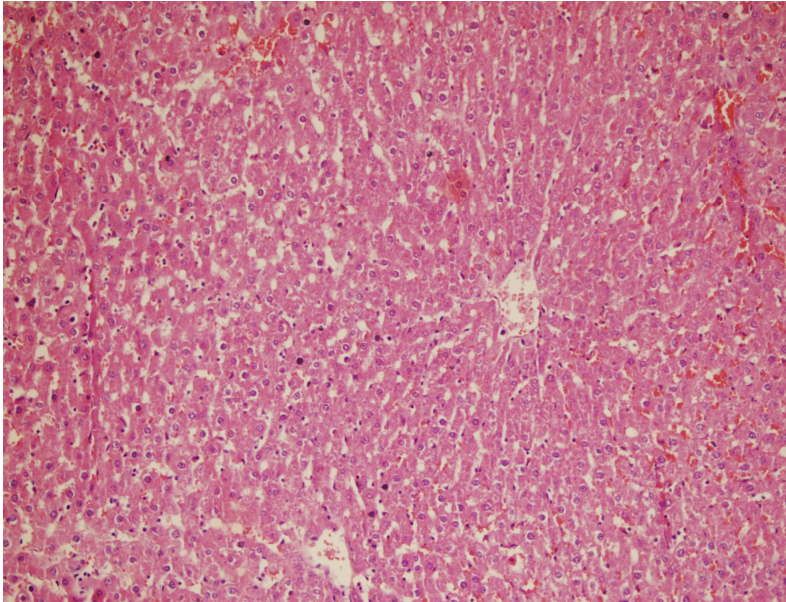
MDA(mmol/lt)	İskemi öncesi	İskemi sonrası	Reperfüzyon sonrası
Kontrol	12 \pm 0,78	22,83 \pm 1,07	27,47 \pm 2,07
Düşük doz ketamin	17,00 \pm 2,31	28,94 \pm 5,20	36,25 \pm 4,43
Yüksek doz ketamin	18,18 \pm 0,98	28,12 \pm 0,98	38,75 \pm 1,74
AST(U/L)			
Kontrol	135 \pm 28,31	338,16 \pm 71,99	466,17 \pm 138,92
Düşük doz ketamin	119,66 \pm 48,88	233,66 \pm 22,30	274,17 \pm 45,97
Yüksek doz ketamin	114 \pm 38,87	266,66 \pm 28,40	262,67 \pm 121,06
ALT(U/L)			
Kontrol	47 \pm 9,09	105,83 \pm 42,62	246,33 \pm 86,37
Düşük doz ketamin	56 \pm 10,56	90,16 \pm 9,04	145 \pm 31,57
Yüksek doz ketamin	52,66 \pm 21,01	143,33 \pm 29,82	262 \pm 57,11
TNF-α(pg/ml)			
Kontrol	12,57 \pm 1,83	2665,52 \pm 38,76	1300,04 \pm 57,87
Düşük doz ketamin	12,79 \pm 2,66	1922,37 \pm 64,76	1156,96 \pm 42,89
Yüksek doz ketamin	13,27 \pm 2,95	1435,36 \pm 50,86	689,83 \pm 66,84
IL-6(pg/ml)			
Kontrol	107,61 \pm 7,58	3374,51 \pm 68,78	3738,02 \pm 48,29
Düşük doz ketamin	107,48 \pm 0,79	2679,24 \pm 203,69	3085,96 \pm 246,00
Yüksek doz ketamin	111,42 \pm 5,97	2180,70 \pm 48,96	2500,14 \pm 57,60
IL-1β(pg/ml)			
Kontrol	19,39 \pm 3,33	3120,98 \pm 80,64	3815,03 \pm 60,18
Düşük doz ketamin	23,02 \pm 2,74	2715,19 \pm 175,10	3121,33 \pm 64,54
Yüksek doz ketamin	19,29 \pm 3,198	2279,80 \pm 89,69	2755,16 \pm 86,22
NO(U/L)			
Kontrol	0,2 \pm 0,31	0,09 \pm 0,09	0,32 \pm 0,30
Düşük doz ketamin	0,18 \pm 0,19	0,05 \pm 0,07	0,09 \pm 0,12
Yüksek doz ketamin	0,02 \pm 0,01	0,07 \pm 0,07	0,10 \pm 0,14

Karaciğerde nekroz, inflamasyon ve konjesyon 1. grupta belirgin olarak görülmektedir (Şekil 10).



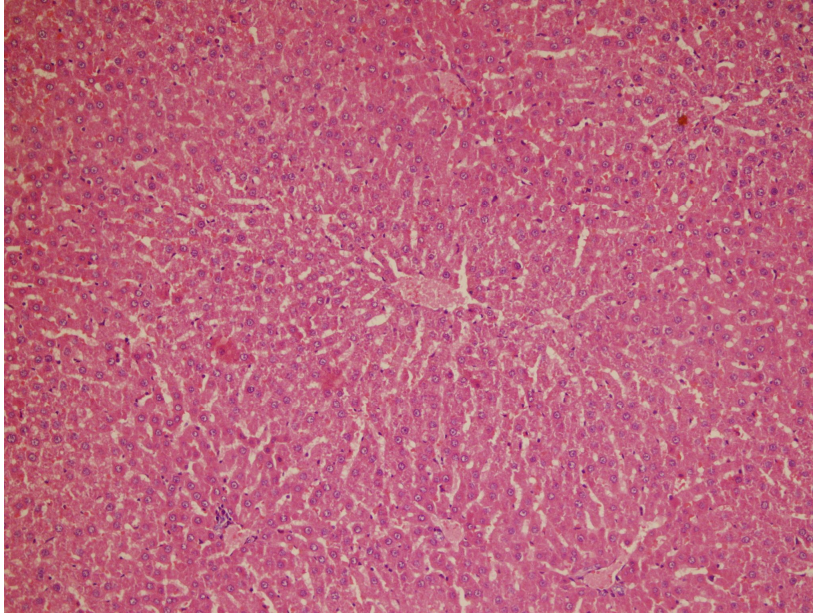
Şekil 10. I.Grupta karaciğerdeki değişikliklerin histolojik görünümü (Hemotoksilen eozin x200)

2. grupta karaciğerde nekroz, inflamasyon ve konjesyon belirgin olarak 1. gruba göre azalmıştır (Şekil 11).



Şekil 11. II. Grupta karaciğerdeki değişikliklerin histolojik görünümü (Hemotoksilen eozin x200)

Grup 3' de inflamasyon, konjesyon ve nekroz grup 1' e göre belirgin olarak daha azdır (Şekil 12).



Şekil 12. III. Grupta karaciğerdeki değişikliklerin histolojik görünümü (Hemotoksilen eozin x200)

Karaciğer doku örnekleri hepatosit hasarı yönünden incelendi. Hücre histolojisindeki değişimler konjesyon, nekroz, sitoplazmik vakualizasyon, eozinofili, nükleer piknozis ve inflamatuvar hücre yoğunluğu yönünden bir patolog tarafından ışık mikroskopunda (Olympus BX51 japan) değerlendirildi ve bir skala oluşturuldu (Tablo 2) .

Tablo 2. Karaciğerdeki değişikliklerin histolojik derecelendirme skalası

	Grup 1	Grup 2	Grup 3
Konjesyon	1,83	1,17	1,17
Nekroz	1,83	1,83	1,67
Stoplazmik-vakuolizasyon	2,00	1,25	1,67
Eozinofili	1,83	1,08	1,00
Nükleer pikroz	1,00	0,83	0,83
İnflamatuvar hücre yoğunlaşması	2,00	1,67	1,00

0: yok, 1: minimal, 2:orta, 3:ileri, 4: Şiddetli 1,74 ±0,38 1,30 ±0,37 1,27 ±0,36

Histopatolojik incelemede sonuç olarak düşük doz ve yüksek doz ketamin verilen gruplarda kontrol grubuna göre daha az hasar saptanmıştır (p<0,05).

4. TARTIŞMA

Doku perfüzyonunun bozulması veya kan akımının kesilmesi sonucu gelişen patolojik olay iskemik olarak adlandırılır (68, 69). Reperfüzyon ise, iskemik dokunun kan ile perfüze edilmesi ve ardından hücrel hemostazın yeniden sağlanmasıdır (68, 69,70). İskemik dokuda oksijen yokluğunda anaerobik metabolizma ile enzim kinetikleri bozulmaya başlar ve laktik asidoz gelişir. Reperfüzyon hasarı sonucu oluşan fonksiyon bozukluğu organdan organa değişiklikler göstermekle beraber, hasardan oksijen radikallerinin sorumlu olduğu belirlenmiştir (54). Klinik uygulamalar içinde karaciğerde iskemik-reperfüzyon hasarına genellikle hemorajik şok, sepsisin geç dönemi, karaciğer transplantasyonu, büyük bir travmaya yönelik cerrahi girişim ve hepatik rezeksiyon sırasında rastlanmaktadır (3, 4).

Sepsiste karaciğer hem inflamasyonun kaynağıdır, hem de hedefidir. Sepsis sırasında zıt etkilere sahip iNOS ve HO-1 karaciğer tarafından daha fazla üretilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bir anestezi madde olan ketaminin sepsis sırasında antiinflamatuvar etkisi olduğu görülmüştür (8, 70).

James ve ark. (71) yaptıkları çalışmada saline, isofluran inhalasyonu ve intraperitoneal ketamin (70 mg/kg) ile anestezi oluşturmuşlardır. Ratların bir saat sonra serum karaciğer enzimleri ile iNOS ve HO-1 düzeylerine bakmışlardır. Çalışmalarında LPS'in anlamlı bir şekilde serum AST düzeyini, iNOS ve HO-1'in karaciğerde reaktivitesini arttırdığını saptamışlar ve ketamin verilen grupta lipopolisakkaritin neden olduğu karaciğer hasarının azaldığını gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda karaciğerde iskemik-reperfüzyon hasarı oluşturulan deneklerde iskemik sonrası ketamin uygulamasının doza bağlı olarak antiinflamatuvar etki gösterdiği kanaatine varıldı.

Sun ve ark. (8) yaptığı bir çalışmada Ketamin iNOS' u azaltmış, HO-1'i artırmış, ayrıca TNF- α , IL-6 gibi inflamatuvar sitokinleri baskılamış, antiinflamatuvar bir sitokin olan IL-10' u artırmıştır. Ratlara anestezi amacıyla saline, isofluran inhalasyonu ve intraperitoneal ketamin (70 mg/kg) uygulanmış, lipopolisakkarit (20 mg/kg) verilerek sepsis oluşturulan ratlarda 5 saat sonra karaciğer enzimlerine ve iNOS ile HO-1 düzeylerine bakılmıştır. IL-10 antiinflamatuvar etkisini HO-1' i artırarak yapıyor ve bu çalışmada HO-1'in inhibe edilmesi IL-10 'un etkisini

azaltmıştır. Böylece ketaminin koruyucu etkisini IL-10'u ve HO-1' i artırarak iNOS düzeyini düşürerek gösterdiğini saptamışlardır.

Zahler ve ark. (72) yaptıkları çalışmada kültür ortamındaki insan umbilikal ven endotel hücrelerini 2, 5 ng/ml TNF- α ile 4 saat süreyle stimüle etmişler ve farklı konsantrasyonlarda ketamin uygulayarak (0,5-1-3 μ mol) sitokin düzeyleri ile adezyon moleküllerinin endotelial ekspresyonunu araştırmışlardır. TNF- α 'nın belirgin bir şekilde adezyon moleküllerinden ELAM-1 ve ICAM-1'i ve sitokinlerden IL-6 ile IL-8'i artırdığını göstermişlerdir. Lökositlerin aktivasyon markırı olan CD11B, endotelial hücrelerde TNF- α uygulaması sonrası %70 artarken, 0,5 ve 5 mikro mol ketamin verilen gruplarda endotelial CD11B'nin sırasıyla %47 ve %44 oranında arttığını saptamışlardır. Araştırmacılar ketaminin antiinflamatuvar etkisini, birincil olarak lökosit reaktivasyonunu inhibe ederek gösterdiğini saptamışlardır.

Deneysel ve klinik çalışmalar İ/R hasarında NO'nin önemi üzerinde dururken, erken dönem İ/R'da NO oluşumu ile ilgili tartışmalı sonuçlar bildirilmiştir. Serum NO konsantrasyonu bazı çalışmalarda yüksek (73), bazılarında değişmemiş (74), bazılarında da düşük bulunmuştur (75).

Nakashima ve ark. (76) yaptıkları çalışmada, inflamatuvar süreç sırasında NO üretiminin yalnızca bakterilerin ve tümör hücrelerinin öldürülmesi ile ilgili değil, aynı zamanda normal dokularda da harabiyet yaptığını ve septik şokta vasküler yatakta refrakter kollapsa neden olduğunu bildirmişlerdir. NO'nin yüksek üretimi vücut için zararlı olmasına karşın, NO üretiminin tam inhibisyonunun NO'nin denge sağlayıcı etkisi nedeniyle yararlı olmadığı sonucuna varmışlardır.

Deneysel çalışmamızda NF-kappa B inhibitörü, genel anestezi madde olan ketaminin doza bağlı olarak karaciğerde İ/R hasarına önleyici etkisini araştırmak için kullanıldı. İ/R sonrası düşük ve yüksek doz ketamin kullandığımız deneklerde anlamlı bir farklılık görülmedi, fakat serum total nitrit miktarlarının ketamin verilmeyen deneklere göre daha az arttığını saptadık.

İskemik dokuların reperfüzyonu, hızla reaktif oksijen metabolitlerini üretmekte bunlarda NF-kappaB'yi aktifleyerek doku reperfüzyon hasarını artırmaktadır. NF-kappa B bir transkripsiyon faktörüdür ve inflamatuvar yanıtta birçok genin ekspresyonundan sorumludur. NF-kappaB stoplazmada inhibitörüne

bağlı olarak bulunur. IL-1 β , TNF- α ve Lipopolisakkarit gibi uyarılar sonucu I kapa B alfa spesifik kinaz aracılığıyla fosforillenir ve proteozomlarla parçalanır. I kapa B alfa'nın parçalanması NF-kappa B'nin açığa çıkmasına neden olur. Serbest kalan NF-kappa B nükleusa transloke olur ve spesifik promoter elemanlara bağlanarak gen transkripsiyonunu başlatır. NF-kappa B proinflamatuvar sitokinler, kemokinler, immünreseptörler, hücre adezyon molekülleri, akut faz proteinleri ve iNOS için hedef genlere etki eder. NF-kappa B'nin aktivasyonu inflamatuvar yanıtta etkili pek çok ürünün genetik transkripsiyonunda artışın koordine edilmesine yol açar. Bu ürünlerle NF-kappa B arasında pozitif feed-back mekanizması vardır ve böylece lokal inflamatuvar yanıtlar artırılır ve süreklilik kazanır. İ/R hasarında NF-kappa B'nin aktiflenmesiyle karaciğer, kalp, akciğer gibi pek çok organ zarar görmektedir. Reperfüzyon sırasında transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu doku nekrozu ve apoptozisle sonuçlanır (77).

Ketamin NF-kappaB inhibisyonu ile TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini baskılar. TNF- α sitotoksik etkisi yanında, inflamatuvar reaksiyon ve inflamasyonun regülasyonunda da önemli bir role sahiptir (78). Kupffer hücreleri karaciğere yerleşik doku makrofajlarıdır. Aktive olduklarında birçok sitokinle beraber, TNF- α da salgırlar. Sitokinler hipermetabolizma, karaciğerin akut faz cevabı ve proliferatif/apoptoz kaskadının mediyatörleridir. Travma sonrası pro ve anti-inflamatuvar sitokinler homeostazı sağlamak amacı ile sentezlenip salgılanırlar (79). Klinik çalışmalarla da gösterilmiştir ki pro-inflamatuvar sitokinler multiorgan yetmezliğine neden olabilirler (80). Nötrofiller, inflamasyonda ve travmalarda serbest oksijen radikalleri ve birtakım lizozomal enzimler salgılamaktadır. Ek olarak nötrofiller uyarı aldığıında TNF- α ve miyeloperoksidaz da salgırlar (81).

Taniguchi ve ark. (82) endotoksemi oluşturdukları ratlara düşük doz (5 mg/kg/saat), orta doz (10 mg/kg/saat) ve yüksek doz (20 /mg/kg/saat) ketamin uygulayarak endotoksemik şoktaki ratlarda sitokin cevabı ve mortaliteyi incelemişler; 10 mg/kg/saat (orta doz) ketamin verilen ratlarda TNF- α düzeyi 2. saatin sonunda anlamlı olarak diğer gruplardan daha az artmıştır, IL-6 düzeyleri orta

ve yüksek doz ketamin verilen gruplarda 2. saatin sonunda anlamlı olarak daha düşük olduğu saptanmıştır ve sonuçta ketaminin doz bağımlı antiinflamatuvar etkisi olduğunu ortaya koymuşlardır. Bunun yanı sıra çok yüksek dozlarda böyle bir etkinin olmadığını da saptamışlardır. Çalışmamızda benzer şekilde ketaminin doza bağlı olarak (Grup 2 ve 3’de) sitokinlerin (TNF- α , IL-6 ve IL-1 β) salınımını baskıladığını saptadık.

Taniguchi ve ark. (83) endotoksemi sırasında ketaminin orta ve düşük hipotermide etkisini araştırmışlar; Endotoksin injeksiyonundan iki saat sonra bütün gruplarda TNF- α düzeyi artmış fakat ketamin verilen normotermik/endotoksemik ratlarda ve hipotermik (33-35°C) /endotoksemik ratlarda diğer gruplara göre anlamlı olarak TNF- α ve IL-6’yı daha düşük saptamışlardır. Aynı çalışmada normotermik/endotoksemik ve hipotermik (30-32°C) endotoksemik ratlara ketamin verilmiş ve bu gruplarda TNF- α ve IL-6 düzeyi anlamlı olarak diğer gruplardan daha düşük olduğunu ortaya koymuşlardır.

Bizim çalışmamızda da reperfüzyon döneminde yüksek doz ketamin uygulanan deneklerde IL-6 düzeylerinin Grup1 ve 2’ ye göre daha az arttığı saptanmıştır.

IL-1 β ve TNF- α endotelde bir grup değişikliği stimüle eder. Bu değişiklikler; adezyon moleküllerinin artmış dışa vurumu, bazı sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin sekresyonu, eikozanoidlerin ve nitrik oksitin (NO) sentezlenmesi ve endotel trombojenisitesinin artmasıdır. Lökositler toksik oksijen ürünler ve proteolitik enzimler salgılayarak endotelial hasar oluşturabilirler (72).

Weigand ve ark. (9) endotoksemi sonrası ketaminin CD18, CD62L ekspresyonunu ve nötrofillerin serbest oksijen radikali üretimine insanlarda in vitro, IL-6 üretimine etkisini incelemişler. Ketamin CD18 ve CD 62L ekspresyonunu ve nötrofillerden serbest oksijen radikallerinin salınımını inhibe etmiştir. Bu çalışmada ketaminin yüksek dozlarda IL-6 salınımını baskıladığını ve histopatolojik incelemede, düşük doz ve yüksek doz ketamin verilen gruplarda kontrol grubuna göre daha az histopatolojik hasar saptanmıştır ve bunun en önemli nedenlerinden birinin ketaminin nötrofil fonksiyonlarını inhibe etmesine ve reperfüzyon hasarının daha az oluşmasına bağlı olabileceği kanaatine varılmıştır.

Ketamin nötrofil aktivasyonunu ve nötrofil-endotel ilişkisini inhibe eder. TNF- α endotel hücrelerindeki adezyon moleküllerini (ELAM-1 ve ICAM-1) ve IL-6 ve IL-8 salınımına neden olur. Ketamin lökositlerin endotele adezyonunu engeller. Ketaminin nötrofillerin fagositik fonksiyonunu baskıladığı görüşü tartışmalıdır (84).

Markus ve ark. (85) yaptıkları bir çalışmada ketaminin insanlarda endotoksinin stimüle ettiği IL-6 artışına, CD18, CD62L ekspresyonuna ve nötrofillerden serbest oksijen radikallerin üretimine etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar ketaminin 200 mikro mol ve daha yüksek konsantrasyonlarda CD18, CD62L ekspresyonunu, nötrofillerden serbest oksijen radikallerinin salınımını ve endotoksinin stimüle ettiği IL-6 salınımını inhibe ettiğini göstermişlerdir.

İ/R hasarı sonrasında karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmek için değişik yöntemler kullanılabilirse de bugün için bunların en çok kabul gören ve en çok kullanılan AST, ALT düzeylerinin değerlendirilmesidir. Karaciğer hasarında bu enzimlerin aktivitesinin arttığı bilinmektedir (86). Karaciğerde iskemi-reperfüzyon sonucunda ALT ve AST düzeylerinin artırdığını ve bu artışın iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan serbest radikallerin dokuda meydana getirdiği hasara bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Carmen ve ark. (87) yaptıkları deneysel çalışmada TNF- α 'nın İ/R sonrası karaciğer ve akciğerdeki hasarda oynadığı rol araştırılmıştır. 250-300 gr. Ağırlığındaki Wistar Albino cinsi ratlarda (n=6) ürethane (10mg/kg intraperitoneal) ile genel anestezi sağlamışlardır. Karaciğerde iskemi oluşturmak için laparotomi sonrası portal ven ve hepatik arter klemp ile bağlanmıştır. Karaciğer hasarının değerlendirilmesinde AST ve ALT' nin plazma düzeylerine bakılmıştır, 90 dakika iskemi ve 90 dakika reperfüzyon sonrası AST, ALT değerleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında arttığını saptamışlardır. Godalinyum klorid verilerek kupffer hücrelerinden TNF- α salınımı baskılanan ratlarda ise AST ve ALT düzeyleri İ/R sonrasına göre düşük saptanmıştır.

Çalışmamızda ketaminin, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını baskılayarak gösterdiği hepatoprotektif etkiyi araştırdık. Çalışmamızda İ/R sonrası plazma AST ve ALT düzeylerinin arttığı saptandı, ketamin verilen gruplarda reperfüzyon sonrası AST düzeylerindeki artış kontrol grubuna göre daha düşük

saptandı fakat anlamlı bir fark saptanmadı. ALT düzeyi ketamin verilen gruplarda reperfüzyon sonrası kontrol grubuna göre daha düşük saptandı. Sonuç olarak ketaminin karaciğer dokusunu reperfüzyon hasarından doza bağlı olarak koruduğu kanaatine varıldı.

Strieter ve ark. (88) yaptıkları hayvan deneyinde TNF- α 'nın antiinflamatuvar etkilerini araştırmışlar. Sonuç olarak TNF- α 'nın baskılanmasının organ hasarını ve mortaliteyi azalttığı kanaatine varmışlardır.

İnflamatuvar mediatör olarak rol oynayan TNF- α 'nın akut pankreatit gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. Guice ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada pankreatit oluşturulan ratlara anti TNF antikoru verilerak plazma TNF- α düzeyi ile mikrovasküler permabilite arasındaki ilişki incelenmiştir. TNF- α düzeyinin baskılanması ile birlikte hücrelerin fagositik aktivitesi, diğer sitokinlerin salınımı ve permabilite artışına bağlı ödemin azaldığını saptamışlardır (89).

İ/R sırasında transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu çok sayıda doku tipinde gözlenmiş bir olaydır. Reperfüzyon sırasında transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu doku nekrozu ve apoptozisle sonuçlanır. Ketaminin iNOS ekspresyonunu, adezyon molekül formasyonunu ve SOR tarafından indüklenen apoptozis aktivasyonunu önlediği gösterilmiştir (77).

Çalışmamızda iNOS inhibisyonunun apoptozis aktivasyonunu önlediği hipotezinden yola çıkarak nükleer faktör kapa B inhibitörü olan ketamin kullanıldı. Bütün ratların karaciğerinde 4 saatlik reperfüzyon sonrası ışık mikroskopunda inceleme sonucu histopatolojik hasar saptandı; fakat, düşük ve yüksek doz ketamin verilen ratların karaciğerinde ise reperfüzyon sonrası anlamlı olarak daha az histopatolojik hasar saptandı. Ketaminin HO-1'i artırarak ve iNOS düzeyini düşürerek karaciğer dokusunu koruduğunu düşünüyoruz.

İ/R sonucu oluşan serbest radikallerin en önemli hedef yapılarından biri de lipidlerdir. Lipid peroksidasyonu bazı araştırmacılar tarafından İ/R hasarında anahtar olarak kabul edilmektedir (87). Lipid Serbest oksijen radikalleri çoklu doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen atomu alarak lipid peroksidasyonunu başlatır ve sonuçta hidroperoksitler oluşur. Bu reaksiyonlar sonucunda hücre membranı akışkanlığını yitirir ve membran bütünlüğü bozular. Bu durum hücre fraksiyonlarının çevreye

salıverilmesine ve hücre ölümüne yol açar. Diğer taraftan çevreye salınan bu subsellüler yapılar inflamatuvar olayları tetikler ve hasarı daha da kötüleştirir (88). Dokuda lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak farklı metodlar kullanılmaktadır. Bu metodların en çok kullanılanlardan biri de dien konjugatları olan malondialdehit tayinidir. Li ve ark. (90) Godalinium klorid ile karaciğer Kupfer hücrelerinden AST, ALT, TNF salınımını inhibe ederek mitokondrial MDA oluşumunu baskılamışlar ve sonuçta karaciğer hücre apoptozisinin azaldığını saptamışlar. Çalışmada 100 tane dişi Wistar Albino rat kontrol ve çalışma grubu olarak ikiye ayrılmış. Reperfüzyondan 0.5, 1, 6, 12 ve 24 saat sonra serum AST, ALT, TNF- α ve mitokondriyal MDA düzeylerine bakılmış. Serum ALT 0,5, 1, 6 ve 12 saat sonra Godalinium verilen grupta kontrol grubuna göre daha düşük, AST seviyeleri 6. ve 12. saatlerde kontrol grubuna göre daha düşük, MDA düzeyleri reperfüzyonun 6, 12 ve 24. saatlerinde kontrol grubuna göre daha düşük, reperfüzyon sonrası TNF- α düzeyleri kontrol grubuna göre daha düşük saptanmıştır. Godalinium ile ALT, AST ve TNF- α 'nın salınımının baskılanması, mitokondrial MDA oluşumunu azalttığı kanaatine varmışlardır.

Bizim çalışmamızda, ketamin doza bağlı sitokinlerin salınımını baskılamıştır; fakat, reperfüzyon hasarında MDA artışını önlemediği görülmüştür.

Sonuç olarak; klinik uygulamalar içinde karaciğerde iskemi-reperfüzyon hasarına genellikle hemorajik şok, sepsisin geç dönemi, karaciğer transplantasyonu büyük bir travmaya yönelik cerrahi girişim ve hepatik rezeksiyon sırasında rastlanmaktadır. Karaciğer Kupfer hücreleri aktive olduklarında birçok sitokinlerin salgılanmasına neden olurlar. Çalışmamızda karaciğerde iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan deneklerde iskemi sonrası ketamin uygulanmasının doza bağlı olarak antiinflamatuvar etki gösterdiği kanaatine varıldı.

5. KAYNAKLAR

1. Memiş D, Yelken B, Şahin S, Vatan İ, Yardım T. Ağır sepsis tedavisinde Prebiyotik solüsyonların etkisi. *Trakya Üniversitesi Tıp dergisi* 2007; 24: 194-199.
2. Ping-Guo L, Song-Qing H, Yan-Hong Z, Jian W. Protective effects of apocynin and allopurinol on ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2832-2837.
3. Banga NR, Homer S, Graham A, White SA. Ischaemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver. *Br J Surg* 2005; 92: 1299.
4. Girgin S, Gedik E, Taçyıldız İ. Evaluation of surgical methods in patients with blunt liver trauma. *Ulus Travma Derg* 2006; 12: 35-42.
5. Jaeschke H. Reactive oxygen and ischemia-reperfusion of the liver. *Biol Interact* 1991;79: 115-136.
6. Şimşek F. Serbest oksijen radikalleri, Antioksidanlar ve lipit peroksidasyonu. *T Klin J Pediatr* 1999; 8: 42-47.
7. Atakişi O, Atakişi E, Atabey T, Uzun M. Arjinin ve N-Nitro-L-Arjinin metil esteri uygulamasının beyin, karaciğer, böbrek dokusu nitrik oksit ve malondialdehit düzeyine etkisi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 2009; 15: 71-75.
8. Sun J, Wang DX, Liu H, Xu JG. Ketamine suppresses endotoxin –induced NF-kappaB activation and cytokines production in the intestine. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004; 48: 317-321.
9. Weigand MA, Schmidt H, Zhao Q, Plaschke K, Martin E, Bardenheuer HJ. Ketamine modulates the stimulated adhesion molecule expression on human neutrophils in vitro. *Anesth Analg* 2000; 90: 206-12.
10. Taniguchi T, Kanakura H, Takemoto Y, Yamamoto K. The antiinflammatory effects of ketamine in endotoxemic rats during moderate and mild hypothermia. *Anesth Analg* 2004; 98: 1114-20.

11. Taniguchi T, Shibata K, Yamamoto K. Ketamine inhibits endotoxin-induced shock in rats. *Anesthesiology* 2001; 95: 928-32.
12. Barlas S, Tireli E, Dayıoğlu E, Barlas C. Miyokard korunması-2: Miyokard metabolizması ve harabiyet. *Göğüs Kalp Damar Cer. Derg* 1994; 2: 313-317.
13. Chen Q, Moghaddes S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294: 460-6.
14. Akkoç H. Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon hasarı. *Dicle Tıp Dergisi* 2008; 35: 211-215.
15. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. *Circ Res* 2000; 86: 117-118.
16. Hartomt J, Charles V, Smith RJ, Jerry RJ. Reactive oxygen species during ischemia-reflow injury in isolated perfused Rat liver. *Clin Invest* 1988; 81: 1240-1246.
17. Peter V, Milton G, Boris P, Yeung N. Platelet-Activating factor, PAF acetylhydrolase and severe anaphylaxis. *Engl J Med* 2008; 358: 28-35.
18. Lin E, Lowry SF, Calvano SE. The systemic response to injury. In: Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC, Daly JM, Fischer JE, Galloway AC, editors. *Principles of surgery*. 7th edition. New-York: Mc Graw-Hill; 1999, p13-32.
19. Gündüz A, Er H. Sitokinler ve oftalmolojideki yerleri. *T Klin Oftalmoloji* 2000; 9: 53-58.
20. Hakan Y, Saraç M, Ömer Ö. The protective effect of fish oil enema in acetic acid and ethanol induced colitis in rats. *Turk J Gastroenterol* 2000; 11: 155-161
21. Kumar V, Cotran R, Robbins S. *Basic Pathology, Temel patoloji Çevikbaş U (Çeviri editörü)*. 7. baskı, İstanbul, Yüce reklam yayıncılık 2003; 47-50.

22. Philip A, Caroline E, Marianne W. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *The INT J BIOCHEM and Cell Biology* 2001; 33: 940-959.
23. Devlin MT. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. ROS. Willey-Liss Inc. Publication: New York, 2002; 590-593.
24. Vittorio C, Raffaele L, Caterina T, Velia D, Maria S, Giovanni S, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci* 2005; 233: 145-162.
25. Chamoun F, Burne M, Donnel M, Rabbit H. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury *Front Biosci* 2000;5:103-109
26. Güray A, Nedim S, Ovalı F, Dağoğlu T. Nitrik oksit: Fizyolojisi ve Klinik önemi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 1997; 17: 115-119.
27. Yau-Huei W. Hsin-Chen L. Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Mutation and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Experimental Biology and Medicine* 2002; 227: 671-682.
28. Yagi K. Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. In: *Free Radicals in Diagnostic Medicine*, (Ed) Armstrong, D., New York, 1st edition. Plenum Press, New York; 1994: 1-15.
29. Roehn JN, Hadley JG, Menzel DB, Wash R. Oxidation of unsaturated fatty acids by ozone and nitrogen dioxide. *Arc Environ Health* 1971; 23: 142-148.
30. Badwey JA, Karnowsky ML. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Ann Rev Biochem* 1980; 49: 695-726.
31. Cmeron P, Weir R. Spermatozoa Have Decreased Antioxidant Enzymatic Capacity and Increased Reactive Oxygen Species Production During aging in the Brown Norway Rat. *J Endrol* 2007; 28: 229-240.
32. Ignarro LJ, Fukuto JM, Griscavage JM, Rogers NE, Byrns RE. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 8103-8107.

33. Nussler A, Billiar T. Inflammation immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993; 54: 171-178
34. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP. Molecular cloning, structure and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1994; 269: 6765-6772.
35. Chu SC, Marks-Konczalik J, Wu HP, Banks TC, Moss J. Analysis of the cytokine stimulated human inducible nitric oxide synthase gene: characterization of differences between human and Mouse iNOS promoters. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248: 871-878.
36. Ponnaphan U. Regulation of transcription factor NF- κ B in immune senescence. *Front Biosci* 1998; 3: 152-168.
37. Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 1397-1406.
38. Bogdan C, Rollenhagen M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 64-76.
39. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: 1424-1437.
40. Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, Chopp M. Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993; 13: 355-358.
41. Fang FC. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide related antimicrobial activity. *J Clin Invest* 1997; 99: 2818-2825.
42. Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayato A. Unravelling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 463-488.

43. Brito C, Naviliat M, Tiscornia AC. Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J Immunol* 1999; 162: 3356-3366.
44. Kim YM, Kim TH, Seol DW, Talania RV, Biliar TR. Nitric oxide suppression of apoptosis occurs in association with an inhibition of Bcl- cleavage and cytochrome c release. *J Biol Chem* 1998; 273: 31437-31441.
45. Park JW. Attenuation of phox and phox membrane translocation as the inhibitory mechanism of S-nitrosothiol on the respiratory burst oxidase in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 31-35.
46. Kim YM, Bergonia H, Lancaster JR. Nitrogen oxide-induced autoprotection in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett* 1995; 374: 228-232.
47. Taçyıldız İ, Aldemir M, Girgin S, Büyükbayram H, Baç B. Karaciğerde İ/R hasarının önlenmesinde Topikal hipotermi, Metilprednizolon ve BN 52021 uygulamasının etkibliği. *Ulusal Cerrahi Dergisi* 2002;18: 70-76.
48. Eidelman Y, Glat PM, Cabrera R, Rosenberg C. The effects of topical hypothermia and steroids on ATP levels in an in vivo liver ischemia model. *J. Trauma* 1994; 37: 677-681.
49. Usami M, Furuchi K, Shiroivva H, Saitoh Y. Effect of repeated portal-triad cross-clamping during portial hepatectomy on hepatic regeneration in normal and cirrhotic rats. *J Surg Res* 1994; 57: 541-543.
50. Ezaki T, Seo Y, Tomoda M, Furusavva M, Kanamatsu T, Sugimachi K. Partial hepatic resection under intermittent hepatic in flow occlusion in patients with choronic liver disease. *Br. J. Surg* 1992; 79: 224-226
51. Emre S, Schwartz ME, Katz E, Miller CM. Liver resection under total vasculer isolation. *Ann Surg* 1993; 217: 15-9.

52. Mochida ST, Ogata K, Hirata Y, Yamada K. Provaction of massive hepatic necrosis by endotoksins after partial hepatectomy in rats. *Gastroenterology* 1990; 99: 771-777.
53. Olguner C, Koca U, Kar A, Karci A, İşlekel H, Canyılmaz M. Ischaemic preconditioning attenuates the lipid peroxidation and remote lung injury in the rat model of unilateral lower limb ischemia reperfusion. *Acta Anaesthesiol Scand* 2006; 50: 150-155.
54. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and kupffer cell-induced oxidant stres and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991; 260: 355-362.
55. Van M, Olguner C, Koca U, Şişman AR, Muratti K, Karci A. Ischaemic preconditioning attenuates haemodynamic response and lipid peroxidation in lower extremity surgery with unilateral pneumatic tourniquet application: a clinical pilot study. *Adv Ther* 2008; 25: 355-66.
56. Fernandez L, Heredia N, Peraita C, Xaus C, Rosello-Catafau J, Rimola A. Role of ischemic preconditioning and the portosystemic shunt in the prevention of liver and lung damage after rat liver transplantation. *Transplantation* 2003; 76: 282-289.
57. Welbourn CB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischemia reperfusion injury. Critical role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991; 78: 651-655.
58. Hobbs AJ, Ignarro LJ. Chemistry and molecular biology of nitric oxide synthesis. In: Mathie RT, Griffith TM (Editor.) *The haemodynamic effects of nitric oxide*. 1st Edition. London: Imperial College Pres 1999; 52-81.
59. Geller DA, Vera ME, Russel DA. Acentral role for IL-1B in the in vitro and in vivo regulation of hepatic inducible nitric oxide production is induced by kupffer cells. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 1737-1745.

60. Bivalacqua TJ, Champions HC, Hellstrom WJG. Implications of nitric oxide synthases isoforms in the pathophysiology of Peyronie's disease. *Int J Imp Res* 2002; 14: 345-352.
61. Baykara B, Tekmen I. Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı. *Dokuz Eylül Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 19: 185-194.
62. Griffon B, Cillard J, Chevanne M. Macrophage-induced inhibition of nitric oxide production in primary rat hepatocyte cultures via prostaglandin E2 release. *Hepatology* 1998; 28: 1300-1308.
63. Shito MV, Vakabayashi G, Ueda M. Interlukin-1 receptor blockadereduces tumour necrosis factor production, tissue injury and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation* 1997; 63: 143-148.
64. Yasin MM, Harkin DW, Halliday MI, Rowlands BJ. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J Surg* 2002; 26: 115-121.
65. Kayhan Z. *Klinik Anestezi. Genişletilmiş 3. Baskı*, 2004, Ankara. Logos Yayıncılık Tic. A.Ş. 503–523, 922–958.
66. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36: 1440-1443.
67. Darılmaz G, Topaloğlu S, Topaloğlu E, Özel H, Saygın O. Evaluation of liver damage after application of TVE in rat model. *Transplant Proc* 2005; 37: 4550-4552.
68. Akkoç H. Miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı. *Dicle Tıp Dergisi* 2008; 35: 211-215.
69. James W, Ernst A, Gonzalez MD, Sasha D, Kenneth SH, David W. Differential effects of Anesthetics on endotoxin induced iver injury. *J Trauma* 2005; 58: 711-717.

70. Cengiz A. Sepsis patogenezi. *Çocuk Enf Dergisi* 2007; 1: 63-65.
71. James W, Suliburk MD, Ernst A, Gonzalez MD, Sahsa D, Kennison MD. Differential effects of Anesthetics on endotoxin-induced liver injury. *J Trauma* 2005; 58: 711-717.
72. Zahler S, Heindl B, Becker B.F, Ketamine does not inhibit inflammatory responses of cultured human endothelial cells but reduces chemotactic activation oh neutrophils. *Acta Anaesthiol Scand* 1999; 43: 1011-1016.
73. Basoğlu M, Yıldırğan I, Akcay F, Kızıltunç A, Kava I, Oren D. Glutathione and nitric oxide concentrations in glutamine-infused rabbits with intestinal ischaemia/reperfusion. *Eur J Clin Biochem* 1997; 35: 415-419.
74. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Caputi AP. Role of constitutive nitric oxide synthase and peroxynitrite production in a rat model of slanchinic artery occlusion shock. *Life Sci* 1998; 63: 789-799.
75. Chan KL, Zhang XH, Fung PC, Guo WH, Tam PK. Role of nitric oxide in intestinal ischaemia/reperfusion injury studied using electron paramagnetic resonance. *Br J Surg* 1999; 86: 1427-1432.
76. Nakashima O, Terada Y, Inoshita S, Kuwahara M, Sasaki S, Marumo F. Inducible nitric oxide synthase can be induced in the absence of active nuclear factor-kappa B in rat mesangial cells: involvement of the janus kinase 2 signaling pathway. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 721-729
77. Lille ST, Lefler SR, Mowlawi A. İnhibition of the initial wave of NF-kappa B activity in rat muscle reduces ischemia-reperfusion injury. *Muscle Nevre* 2001; 24: 534-541.
78. Semenzato G. Tumour necrosis factor a cytokine with multiple biological activities. *British J. Cancer* 1990; 61: 354-361.

79. De Waal Malefeyt R, Abrams J, Bennet B. Interleukin 10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulation role of IL-10 produced by monocytes. *Journal. Exp. Med* 1991; 174: 1309-1220.
80. Marshall JC. Inflammation, coagulopathy and the pathogenesis of multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 2001; 29: 99-106.
81. Hillegass IM, Griswold DE, Brickson B, Albrigtson–Winslow C. Assesment of myeloperoxidase in whole rat kidney. *J Pharmacol Method* 1990; 24; 285-292.
82. Taniguchi T, Takemoto Y, Kanakura H, Kidani Y, Yamamoto K. The dose – related effects of ketamine on mortality and cytokine responses to endotoxin-induced shock in rats. *Anesth Analg* 2003; 97: 1769-1772.
83. Taniguchi T, Kanakura H, Takemoto Y, Yamamoto K. The antiinflammatory effects of ketamine in endotoxemic rats during moderate and mild hypothermia. *Anest Analg* 2004; 98: 1114-1120.
84. Farhood A, Masayuki M, Jaeschke H. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J leukoc Biol* 1995: 57;70-74.
85. Markus A, Schmidt H, Martin E, Plaschke K. Ketamine modulates the stimulated adhesion molecule expression on human neutrophils in vitro. *Anest Analg* 2000; 90: 206-212.
86. Kobayashi N, Nishashi T, Takahashi R, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M. Prevention of neutrophil–mediated hepatic ischemia-reperfusion injury by Superoxide dismutase and Catalase derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 2001: 298; 894-899.
87. Carmen P, Neus P, Carme X, Emilio G, Joan RC. Protective effectc of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999; 30: 1481-1489.

88. Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of tumor necrosis factor- in disease and inflammation. *Crit Care Med* 1993; 21: 447-463.
89. Guice KS, Oldham KT, Remick DG, Kungel SL, Ward PA. Anti-tumor necrosis factor antibody augments edema formation in caerulein induced acute pancreatitis. *J Surg Res* 1991; 51: 495-499.
90. Li SY, Gu X, Zhang WH, Jia S, Zhou Y. GdCL3 abates hepatic ischemia reperfusion injury by inhibiting apoptosis in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 518-523.

6.ÖZGEÇMİŞ

Elazığ ilinde 1974 yılında doğdum. İlkokulu Gökçebağlar Köyü İlkokulunda, ortaokul ve liseyi Elazığ Anadolu Lisesinde tamamladıktan sonra 1993 yılında İstanbul Üniversitesi ÇAPA Tıp Fakültesi'nde tıp eğitimime başladım, 2001 yılında mezun oldum. 3 yıl pratisyen hekim olarak Elazığ'da görev yaptım. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalında 2004 yılında uzmanlık eğitimine başladım. Halen bu klinikte eğitimime devam etmekteyim. 1 yıllık evliyim. İngilizce bilmekteyim.