

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
SAĞLIK BAKANLIĞI
ANKARA NUMUNE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
7. CERRAHİ KLİNİĞİ**

Klinik Şefi: Doç. Dr. M. Mahir ÖZMEN

**DENEYSEL TIKANMA SARILIĞINDA
ERİTROPOETİNİN OKSİDATİF STRES VE
HEPATİK HASAR ÜZERİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Enis DİKİCİER

ANKARA, 2007

TEŞEKKÜR

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 7. Cerrahi Kliniği'ndeki uzmanlık eğitimim süresince derin bilgi birikimini her zaman asistanları için harcayan klinik şefimiz, hocamız, Doç. Dr. M. Mahir ÖZMEN'e;

Tez çalışmam sırasındaki desteği ve cerrahi eğitimimdeki emeğinden dolayı Doç. Dr. M. Tahir ORUÇ'a;

Kliniğimiz uzmanlarından Op. Dr. Münevver MORAN'a, Op. Dr. Tezcan AKIN'a;

Birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarım Dr. Korhan ARSLAN, Dr. Evren Dilektaşlı, Dr. Emre GÜNDOĞDU, Dr. Ali Emre AKGÜN'e;

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalıştığımız tüm servis hemşireleri ve servis personeline;

Desteğini ve anlayışını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Dr. Bahar SEVİMLİ DİKİCİER'e teşekkür ederim.

Dr. Enis DİKİCİER

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
RESİMLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
KISALTMALAR.....	viii
I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	4
2.1 İnsanlarda Karaciğer ve Safra Yolları Anatomisi	4
2.2 Rat Karaciğer ve Safra Yolu Anatomisi	9
2.3 Safra Oluşumu ve Fizyolojisi	12
2.4 Bilirubin Metabolizması	13
2.5 Sarılık	17
2.6 Sarılık Sınıflandırması	17
2.6.1 Prehepatik Sarılık	17
2.6.2 Hepatosellüler Sarılık	18
2.6.3 Kolestatik Sarılık.....	19
2.7 Tıkanma sarılığı sınıflandırması	22
2.7.1 Kolestaza bağlı konjuge hiperbilirubinemi nedenleri	22
2.8 Tıkanma Sarılığında Patofizyolojik Değişiklikler	23
2.9 Biyokimyasal Değerlendirme.....	25
2.10 Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri	27
2.11 Organizmada Serbest Radikal Üretim Kaynakları	29
2.12 Lipit Peroksidasyonu	31
2.13 Malondialdehit (MDA).....	32
2.14 Antioksidan Savunma Sistemleri.....	33
2.15 Nitrik Oksit.....	35
2.16 Eritropoetin.....	36
2.16.1Biyolojik Etkinliği ve Klinik Kullanımı	37

III. YÖNTEM VE GEREÇ.....	40
3.1 Deney Grupları ve Çalışma Tasarımı.....	40
3.2 Biyokimyasal Analiz	43
3.2.1 Serum Enzim ve Bilirubin Ölçümü	44
3.2.2 Serum Malondialdehit (MDA) Ölçümü	44
3.2.3 Serum indirgenmiş Glutasyon (GSH) Ölçümü.....	45
3.2.4 Serum Nitrik Oksit (Nitrit/Nitrat) Ölçümü	46
3.3 Hematolojik Parametrelerin Ölçümü.....	46
3.4 Histopatolojik Değerlendirme	46
3.5 İstatistiksel Analiz.....	47
IV. BULGULAR.....	48
4.1 Serum Enzim ve Bilirubin Sonuçları	48
4.2 Serum Malondialdehit Sonuçları	51
4.3 Serum İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Sonuçları	52
4.4 Serum Nitrik Oksit (NO) Sonuçları	53
4.5 Histopatolojik değerlendirme sonuçları	54
V. TARTIŞMA.....	60
VI. ÖZET	65
VII. ÖZET (İNGİLİZCE)	66
VIII. KAYNAKLAR	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1: Karaciğer visseral yüzeyi.....	5
Şekil 2: Karaciğer segmenter anatomisi.....	5
Şekil 3: Karaciğer segmentleri.....	6
Şekil 4: Karaciğerin periton refleksiyonları	7
Şekil 5: Koledok bölümleri.....	8
Şekil 6: Rat anatomisi	10
Şekil 7: Ratlarda karaciğerin lobları.....	11
Şekil 8: Bilirubin oluşumu	13
Şekil 9: Bilirubin metabolizması ve atılımı	16
Şekil 10: Sarılık oluşum mekanizmaları	20
Şekil 11: Kolestaz patofizyolojisi	25
Şekil 12: Deney protokolü	41
Şekil 13: Total bilirubin sonuçları	49
Şekil 14: Direkt bilirubin sonuçları	49
Şekil 15: Alkalen fosfataz sonuçları	50
Şekil 16: Beyaz küre sonuçları	50
Şekil 17: Serum malondialdehit sonuçları	52
Şekil 18: Serum glutatyon sonuçları	53
Şekil 19: Serum nitrik oksit sonuçları	54

RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Resim 1: Rat anatomisi.....	11
Resim 2: Ratta ana safra kanalı ligasyonu.....	42
Resim 3: Genişlemiş safra kanalı	43
Resim 4: Normal karaciğer	55
Resim 5: Sentrilobüler nekroz.....	56
Resim 6: Sinüsoidal dilatasyon ve konjesyon	56
Resim 7: Parankimal fokal nekroz	57
Resim 8: Sinüsoidal dilatasyon ve konjesyon	57
Resim 9: Vena sentralis ve vena porta dilatasyonu	58
Resim 10: Portal inflamasyon	58
Resim 11: Kupfer hücre hiperplazisi	59

TABLO DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1: İndirek (Unkonjuge) hiperbilirubinemi nedenleri	20
Tablo 2: Direk (Konjuge) hiperbilirubinemi nedenleri.....	21
Tablo 3: Serum enzim ve bilirubin sonuçları.....	48
Tablo 4: Serum ve karaciğer MDA, GSH ve NO sonuçları	51
Tablo 5: Histopatolojik değerlendirme sonuçları.....	54

KISALTMALAR

TNF	: Tümör nekrotizan faktör
ET-1	: Endotelin-1
NO	: Nitrik oksit
GİS	: Gastrointestinal sistem
RES	: Retiküloendotelyal sistem
AST	: Aspartat transaminaz
ALT	: Alanin transaminaz
ALP	: Alkalen fosfataz
GGT	: Gamaglutamil transferaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
MPO	: Myeloperoksidaz
MDA	: Malondialdehit
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GSSG	: Okside glutatyon
Gpx	: Glutatyon peroksidaz
NOS	: Nitrik oksit sentaz
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
cNOS	: Konstitusyonel (yapısal) nitrik oksit sentaz
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
Ig	: İmmünglobin
IL	: İnterlökin
PMN	: Polimorfnükleer
LPS	: Lipopolisakkarit
CBDL	: Ortak safra kanalı ligasyonu

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Tıkanma ikteri başta karaciğer olmak üzere pek çok organ sistemine doğrudan etkileri olan yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden bir hastalıktır. Bu durumda gerekebilecek safra yolları cerrahisi ise operasyon tekniklerinde ve tıbbi tedavideki yeni gelişmelere rağmen halen yüksek oranda postoperatif komplikasyonlarla ve hatta mortalite ile seyreder. Tıkanma ikterinde biriken safra tuzları ve bilirubin karaciğerde direk yolla hasa yol açarken, indirek olarak da dokularda iskemi-reperfüzyon hasarı, endotoksemi, sıvı elektrolit dengesizliği ve nutrisyonel bozukluklara neden olur. Buna bağlı olarak pulmoner, renal, kardiyak ve bağışıklık sistemlerinde çeşitli patolojik değişiklikler ortaya çıkar.

Tıkanma sarılığı akut hepatosellüler hasara yol açarak ilerleyici fibrosiz ile sonuçlanan patofizyolojik olayları tetikler. Artan safra asitleri ve bilirubinin karaciğerde serbest oksijen radikallerinin oluşumunu tetiklediği ve ardından antioksidan kapasitenin azalmasına neden olan olayları başlattığı gösterilmiştir. Oluşan serbest oksijen radikalleri bir yandan karaciğer hasarına yol açarken bir yandan da bakteriyel translokasyonun tetiklediği endotoksemiye artırmaktadır. Oluşan bu endotoksemi tıkanma sarılığında temel patofizyolojik değişikliklerin nedenidir. Endotoksemi sonucunda multiorgan yetmezliğine neden olan pek çok sitokin açığa çıkar. Bu sitokinlerden en önemlileri TNF- α (Tümör Nekrozis Faktör - alfa), ET-1 (endotelin - 1) ve NO (Nitrik oksit) dur.

Tıkanma sarılığında oluşan immün yetmezliğin temel nedeni aslında Kupffer hücrelerinde oluşan fonksiyon bozukluğudur. Kupffer hücreleri (RES) retiküloendotelial sistemdeki makrofajların büyük bir kısmını içerir. Yapılan bazı çalışmalarda tıkanma sarılığında oluşan Kupffer hücre disfonksiyonunun daha az reaktif oksijen radikali salınmasına ve bu yolla bakterisidal etkinin

azalmasına neden olduğu savunulurken, bazı araştırmacılar da tam tersine tıkanma sarılığında aktive olan kupffer hücrelerinden daha fazla reaktif oksijen üretimi olduğunu ve bunun da karaciğer hasarında önemli rol oynadığını söylemektedirler.

Tıkanma sarılığında ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin rolünü sorgulayan pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda tıkanma sarılığının NO'ı etkilediği gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda artmış NO düzeylerinden karaciğer fonksiyon bozukluğu sorumlu tutulurken, azalmış NO'nın tıkanma sarılığına sekonder ortaya çıkan bakteriyel peritonite bağlı olduğu söylenmektedir.

Tıpkı tıkanma sarılığında olduğu gibi günümüzde ortaya çıkan pek çok hastalığın patofizyolojisinde serbest oksijen radikallerinin rol oynadığı bilinmektedir. Temelde serbest radikallerin etkileri ya direk yolla hücrel harabiyete neden olarak ya da indirek yolla hücrel antioksidan sistemlerini inhibe ederek olmaktadır. Ancak serbest oksijen radikallerinin etki mekanizmaları ve patofizyolojik rolleri halen araştırılmaktadır.

Eritroid seri büyüme hormonu olan eritropoetinin (EPO), çeşitli non-eritropoetik etkileri mevcuttur. Yapılan çalışmalarda, EPO'nun hipoksik-iskemik ve inflame dokularda ödemi ve hücrel apoptozisi büyük ölçüde azalttığı, iskemiye dayanıklılığı artırdığı, inflamasyonu dizginlediği, doku lipid peroksidasyonunu ve MDA (malondialdehit) oluşumunu düşürdüğü gösterilmiştir. Sepsis gibi, başlıca sitokinlerden olan TNF- α 'nın ileri derecede arttığı ve inflamasyonun kontrol edilemediği klinik hallerde, serum EPO miktarının baskılandığı tespit edilmiştir. EPO'nun NO'ı ve diğer inflamasyon mediatörlerini çeşitli yollarla baskıladığı, deneysel olarak ortaya konmuştur. Ancak EPO yüksekliği veya dışarıdan verilmesi ile bu sitokinlerin düzeyi ve inflamasyon arasındaki ilişkiler tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. EPO'nun tıkanma sarılığındaki etkinliği bilinmemektedir.

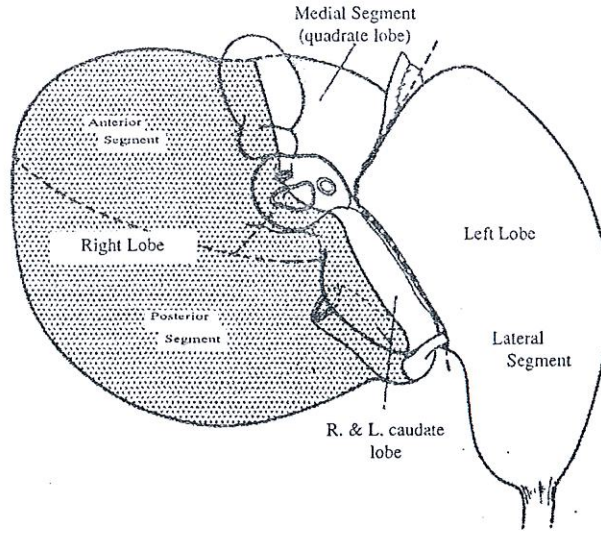
Bu tez çalışmasındaki amaç, deneysel tıkanma sarılığı oluşturulan ratlarda eritropoetinin oksidatif stres, serbest radikaller ve hepatik hasar üzerine olan etkinliğinin histolojik ve biyokimyasal verilerle araştırılmasıdır.

II. GENEL BİLGİLER

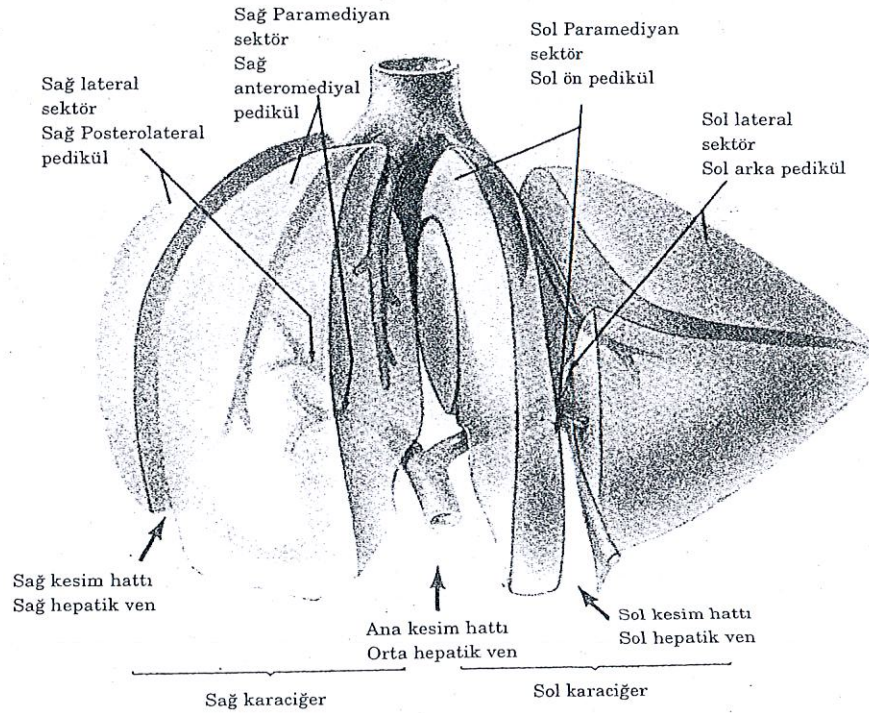
2.1 İnsanlarda Karaciğer ve Safra Yolları Anatomisi

İnsanda karaciğer sağ üst abdomende ve kısmen epigastrik bölgede yer alan, ortalama ağırlığı erkekte 1500 (1400-1600) gr, kadında 1300 (1200-1400) gr olan tüm vücut fonksiyonları için çok önemli bir organdır. Göğüs kafesini oluşturan kaburgalar karaciğerin büyük bir kısmının ön yüzünü örterler. Ön yüzün geriye kalan küçük bir bölümü ise karın ön duvarı ile doğrudan temastadır. Sağ lobun en üst noktası 5. kaburgaya kadar, sol lobun üst noktası ise 6. kaburganın üst kısmına kadar uzanır. Karaciğerin peritonla kaplı olan diyafragmatik ve visseral olarak adlandırılan iki yüzü vardır. Diyafragmatik tarafta küçük bir alan dışında peritonla sarılıdır. Diyafragmatik yüzey üstte sırasıyla sağ ve sol plevra, akciğer, perikard ve kalple; arka ve önde ise diyafragma, kaburgalar ve sternumla komşudur. Visseral yüzey ise sağdan sola doğru sırasıyla, hepatik fleksura ve sağ transvers kolonun bir bölümü, sağ böbrek ve sağ böbrek üstü bezinin peritonu, safra kesesi, duodenum birinci ve ikinci kıtaları, ozefagus ligamentum venozumu ve mide ile komşudur.

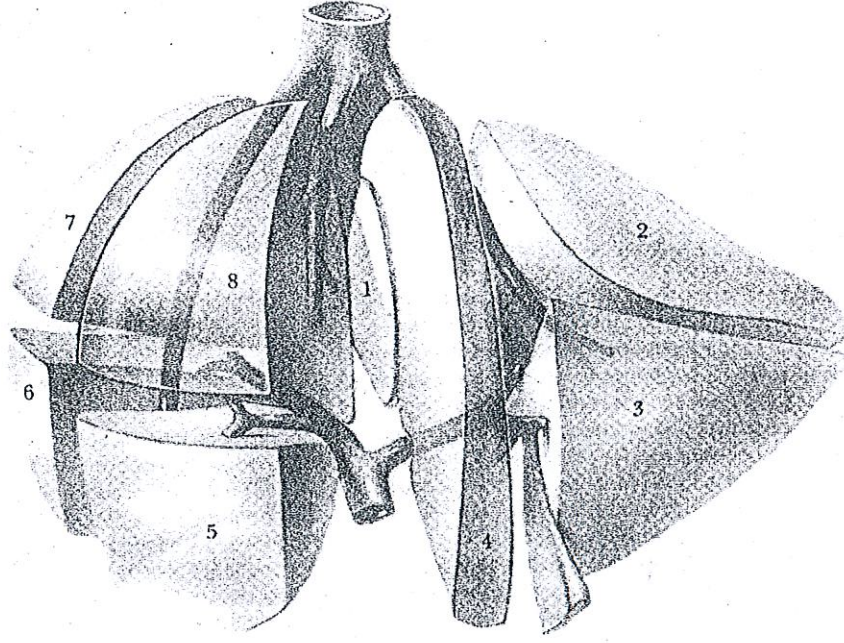
Karaciğer sağ ve sol olmak üzere 2 loba ayrılır. Her iki lobun boyutları yaklaşık olarak birbirine eşittir. Önde safra kesesinin çentiğinden başlayan round ligamanın fissürüne paralel giden ve yukarıda inferior vena cava'ya varan hayali çizgi karaciğeri iki loba ayırır (Şekil-1). Karaciğer hepatik arter, portal ven ve hepatik duktusun dağılımına uygun olarak 8 alt segmente ayrılır. Segmentler kanlanmasını hepatik arter ve portal venden alırken, drenajı safra kanalları ile olur. Her segmentteki hepatik venler birleşerek vena cava inferiora dökülürler.



Şekil-1: Karaciğerin visseral yüzeyi. Sol medial ve sol lateral segmentler arasında kalan düzlem, umbilikal fissür, ligamentum teres fissürü ya da falsiform ligaman fissürü gibi çeşitli isimler almıştır.



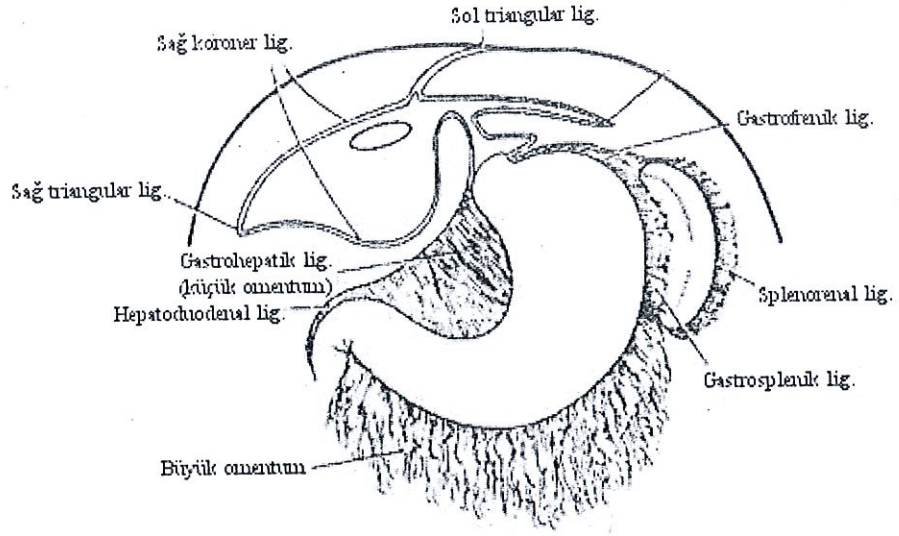
Şekil-2: Karaciğer segmenter anatomisi.



Şekil-3: Karaciğer segmentleri.

Karaciğer falsiform, round ve koroner ligamanlar ile diyafragmanın alt yüzeyine ve batin ön duvarına tutunur. Karaciğeri örten periton, diyafragma iki ayrı yaprak halinde tutunur. Bunlar anterior ve posterior koroner ligamanlardır. Sol ve sağda koroner ligamanların iki yaprağı birleşerek sol ve sağ triangüler ligamanları oluştururlar. Koroner ligaman anterior tabakası ön yüzde karaciğerin superiorundan batin ön duvarına uzanarak falsiform ligamanı oluşturur. Falsiform ligamanın iki yaprağı arasında sol umblikal venin embriyonik kalıntısı ligamantum teresi (yuvarlak ligaman) oluşturur. Falsiform ve yuvarlak ligamanlar karaciğerin içine uzanarak karaciğerin görünür sol ve sağ loblarını ayıran bariz fissürü oluşturur. Fissür ile safra kesesi arasında kuadrat lob bulunur. Kuadrat lob daha arkadaki kaudat lobdan porta hepatis ile ayrılır.

Karaciğer peritonu, porta hepatis hepatogastrik ligaman olarak küçük kurvatura uzanan, hepatoduodenal ligaman olarak da duodenum ilk 2.5 cm'sinine uzanan küçük omentumu oluşturur (Şekil-4).



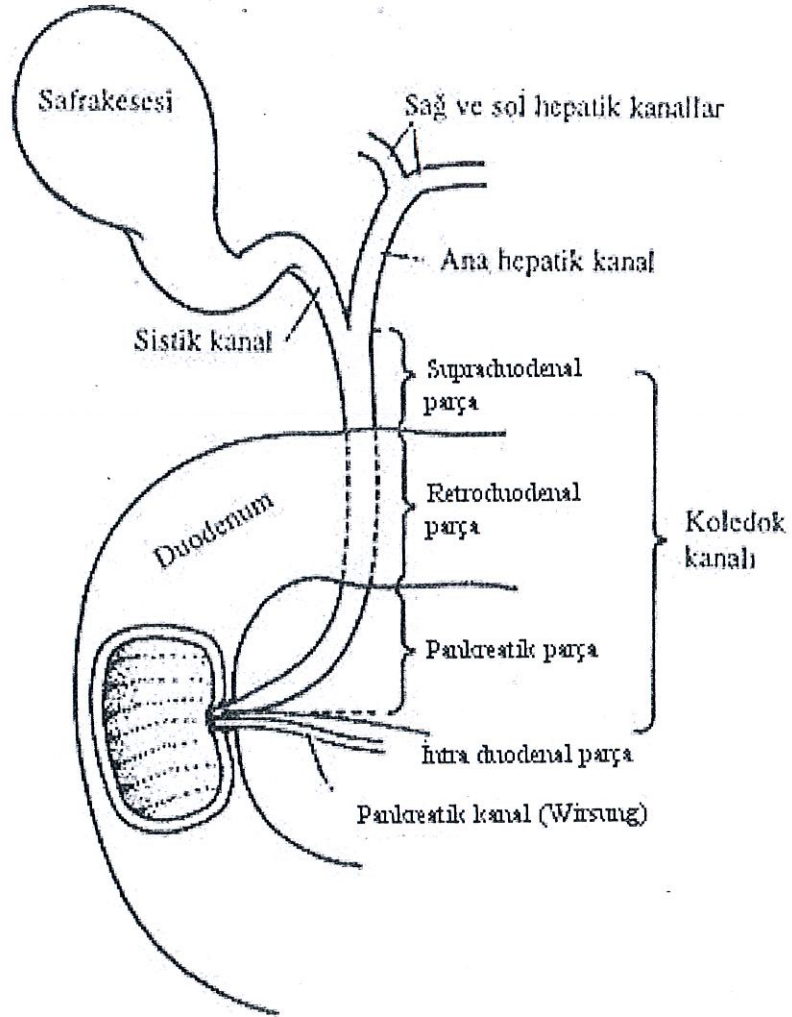
Şekil-4: Karaciğerin periton refleksiyonları: Küçük omentum (hepatogastrik ve hepatoduodenal ligamanlar) ve karaciğer ile diyafragmanın koroner ligaman ile olan komşuluğu.

Küçük omentumun sağ kenarı hepatik arteri, portal veni ve ana safra kanalını içermektedir. Safra kanalı genellikle sağda, omentumun serbest kenarındadır.

Karaciğer kanlanması 2 kaynaktan olmaktadır. Bu kaynaklar hepatik arter ve portal vendir. Hepatik arter karaciğer kanlanmasının yaklaşık % 25'ni, oksijeninin % 50'sini, portal ven ise kanlanmanın % 75'ini, oksijenin % 50'sini sağlar. Hepatik arter çölyak trunkustan çıkar ve karaciğere girmeden hemen önce sağ ve sol hepatik arterlere ayrılır. Portal ven süperior mezenterik ve splenik venin pankreas arkasında birleşme yerinden çıkar. Porta hepatiste sağ ve sol dallarına ayrılır.

Karaciğer içinde dağılmış olan portal ven, hepatik arter ve safra kanallarından meydana gelmiş üçlü yapıya portal triad adı verilir. Karşı karşıya bakan karaciğer hücrelerinin zarlarındaki yarım oluklar karşılıklı bir araya gelince, duvarı hücre zarı olan intersellüler kanalikülleri oluştururlar. Safra, önce intersellüler kanaliküllere sonra, interlobular safra kanallarına

dökülür. Bunlar da birleşerek daha büyük kanallar olan sağ ve sol hepatik kanalları oluştururlar. Sağ ve sol hepatik kanallar porta hepatis'te birleşerek ana hepatik kanalı oluştururlar. Ana hepatik kanal da sistik kanal ile birleştikten sonra koledok adını alır. Uzunluğu 5-15 cm arasında değişen koledok 4 bölüme ayrılır (Şekil-5):



Şekil-5: Karaciğer dışı safra yolları ve koledok kanalının dört bölümü.

A) Supraduodenal bölüm: Hepatoduodenal ligamanın iki yaprağı arasında, Winslov deliğinin önünde, hepatik arterin sağında ve portal venin önünde yer alır. Ortalama uzunluk 2 cm'dir

B)*Retroduodenal bölüm:* Duodenum birinci kısmının üst kenarı ile pankreas başının üst kenarı arasında uzanır. Ortalama uzunluk 1.5 cm'dir.

C)*Pankreatik bölüm:* Ortalama uzunluğu 3 cm olan bu segment duodenum ikinci kısmının arkasında kısmen veya tamamı ile pankreas dokusu ile örtülü olabilir.

D)*Intramural (intraduodenal)bölüm:* Ana pankreas kanalı ile birlikte duodenum duvarı içinde seyreden yaklaşık 1.5 cm uzunluğundaki kısımdır.

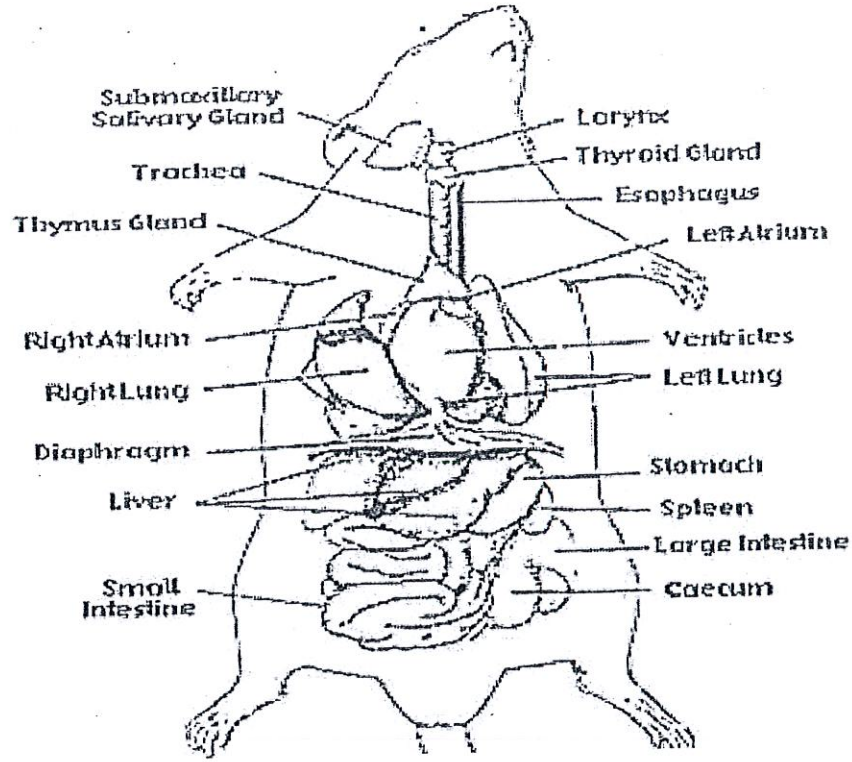
Koledok çapı ilk üç bölgede değişkenlik göstermekle birlikte 8 mm 'yi geçmez. Intramural segmentte ise duodenum duvarına girmesi ile birlikte 3.3 mm 'ye kadar incelir.

2.2 Rat Karaciğer ve Safra Yolu Anatomisi

Karaciğer diyafragmanın hemen altında yer alır (Şekil 6-Resim 1). 3 lobdan ve 4 parçadan meydana gelir

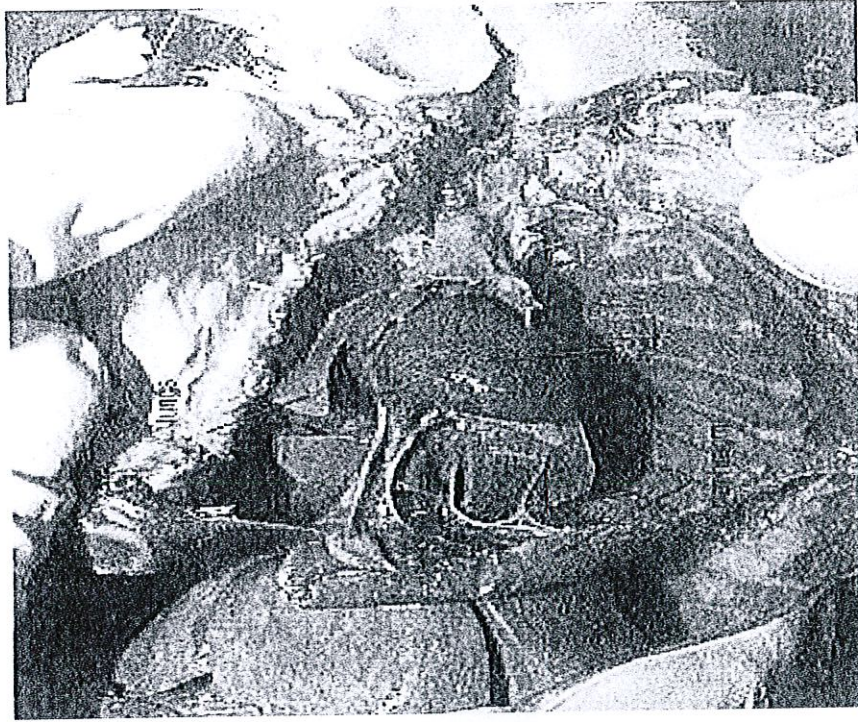
- 1- Medial veya sistik lob
- 2- Sol lateral lob
- 3- Sağ lateral lob
- 4- Kaudat lob

Karaciğer lobları belirgin incisuralar ile ayrılır (Şekil-7). Ratta karaciğer sol lobun büyük bir lateral lobu, daha küçük bir medial lobu vardır. Sol lob, intermedier lobdan derin bir yarık ile ayrılır. İntermedier lobun supraportal kısmı (lobus caudatus) *cranial* ve sağa doğru, sağ lobun üzerinde uzanır ve devamında dorsal ve sağa doğru *procesus caudatus* bulunur. *Proc. Caudatus* sağ böbreğin izini taşır. Sağ lob küçüktür. Loblanması yoktur.

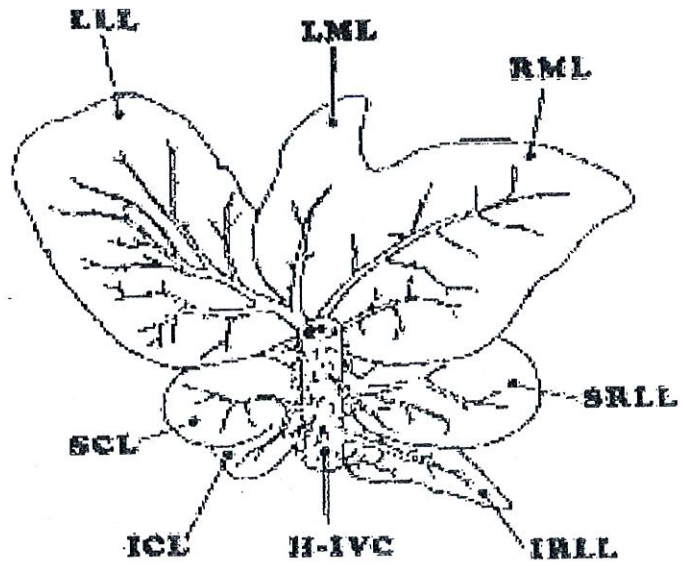


Şekil-6: Rat anatomisi

Duodenuma safrayı taşıyan biliyer kanala (Ductus choledochus) pankreasın akıtıcı kanalları da açıldığı için literatürde farklı isimlendirmeler mevcuttur. Ancak genel görüş biliopankreatik kanal şeklinde isimlendirmektir. Bu kanal yaklaşık 1 mm kalınlığında ve 29 mm uzunluğundadır. Porta hepatiste loblardan gelen kanalların birleşmesi ile oluşur ve pilora yaklaşık 28 mm mesafede duodenuma açılır.



Resim 1: Rat anatomisi



Şekil-7: Ratlarda karaciğer lobları

2.3 Safra Oluşumu ve Fizyolojisi

Safra oluşumu ve sekresyonu şok dışında karaciğer total kan akımından kısmen bağımsız olarak gerçekleşen aktif bir süreçtir. İnsanda günde 1000-1500 ml kadar safra yapılır. Bu miktar hepatositlerden salgılananlarla safra kanal hücrelerinden salınanların toplamıdır (1).

70 kg ağırlığında bir bireyde normal safra akışı 0,41-0,43 ml/dk'dır. Safranin hacmini ayarlayan basamak, safra kanalikülleri içine safra tuzlarının aktif olarak salgılanmasıdır. Safra akımını düzenleyen faktörler karaciğerden salgılanma, safra kesesinin kasılması ve Oddi sfinkter direnci olarak sıralanabilir.

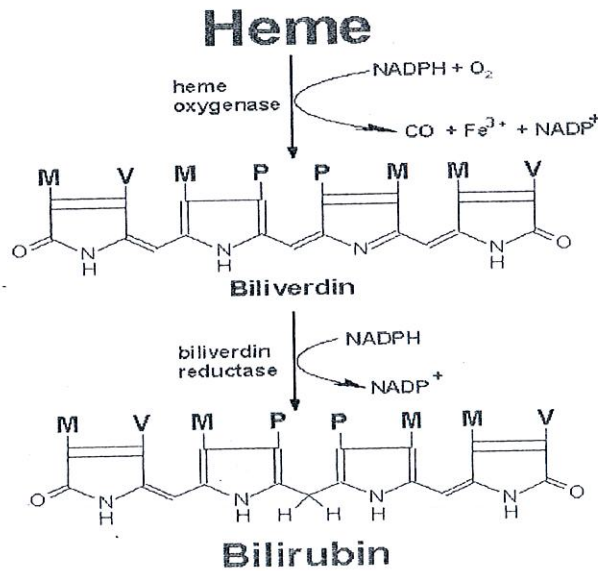
Safranin temel anyonik içeriği konjuge safra asitleri, kolesterol, fosfolipitler ve proteinlerden oluşur. Safra tuzları hepatositlerin kolesterolden yaptığı steroid moleküllerdir. İşlevleri lipitleri ve benzeri ürünleri çözülebilir hale getirerek, emilimlerini kolaylaştırmaktır. Kolat ve kenodeoksikolat primer safra tuzlarıdır. Barsak bakterileri bunları değiştirip sekonder safra tuzları olan deoksikolat ve litokolata dönüştürür. Primer safra tuzları geri emilir litokolat ise dışkı ile atılır. Safra % 40 kolat, % 40 kenodeoksikolat, % 20 deoksikolattan oluşur (2).

Safra tuzları detarjan etkiye sahiptir. Karşıt kutuplarında, suda çözünebilen ve yağda çözünebilen grupları taşır. Bunlar suda 8-10 molekülük 'miçel' denilen kümeler oluşturur. Miçellerin merkezindeki hidrofob kutuplar, suda çözülmeyen lipitleri çözer. Lesitin ve kolesterol gibi suda çözülmeyen diğer maddeler ise miçellerin içinde taşınır ve lesitin, kolesterolün miçel tarafından çözülmesini artırır.

Safra tuzları, lesitin ve kolesterol safrada erimemiş maddelerin % 90'dır. Geri kalan bilirubin, yağ asitleri ve inorganik tuzlardır (2).

2.4 Bilirubin Metabolizması

Bilirubinün üretiminin en önemli kaynağı eritrosit katabolizmasıdır. Bu üretimin %80-85'i retiküloendotelyal sistemdeki (RES) kırmızı kan hücrelerinin yıkımıyla olur. Dolaşımdaki eritrositlerin ortalama ömürleri 100-120 gündür. Bu süre sonunda eritrositler retiküloendotelyal sistemde mononükleer fagositer hücreler tarafından yıkılırlar. Bu yıkım sırasında globin, hemoglobinden hidroliz yoluyla ayrılır ve bilirubin yapımında kullanılan 'hem' ortaya çıkar. Bilirubin üretiminde kullanılan hem'in % 15-20 'lik kısmı da kemik iliğinde gelişim aşamasında eritrosit yıkımı (inefektif eritropoez) ve karaciğerde hem içeren nonhemoglobin protein yapıda olan myoglobin ve sitokromların yıkılmasıyla elde edilmektedir. Hem katabolizması mikrozomal okside edici sistemde devam eder. Hem, retiküloendotelyal sistemde hem oksijenaz ile biliverdine, biliverdin de biliverdin redüktaz ile bilirubine dönüşür (şekil-8) (3).



Sekil-8: Bilirubin oluşumu

Erişkin bir insanda ortalama kan hacmi 5000 ml ve ortalama hemoglobin konsantrasyonu % 15'dir. Matür eritrositlerin her gün % 1'i yıkılmaktadır ve 7.5 gr hemoglobin açığa çıkmaktadır. 1 gr hemoglobinden 34 mg bilirubin oluşmaktadır. Bu nedenle günlük bilirubin yapımı 250-300 mg'dır.

Sitozolde biliverdin redüktaz ile oluşan indirek (konjuge olmamış) bilirubin, yağda çözünür formdadır ve suda çözünmez. Bu nedenle indirek bilirubin plazmada albumine bağlı olarak taşınır. İndirek bilirubin ile albumin arasında olan bağ reversibl ve kovalent olmayan bağ şeklindedir ve bu bağlanma dokuları bilirubinin potansiyel toksik etkilerinden korur. Bilirubin-albumin kompleksi karaciğerin sinüzoidal dolaşımına portal ve hepatik arteriyal sistemlerle ulaşır.

Karaciğerin sinüzoidal dolaşımına alınan bilirubinin hepatik metabolizması üç aşamada gerçekleşir (3):

1. Hepatosit içine alınma
2. Konjugasyon
3. Safraya atılım

İndirek bilirubin albuminden hepatositlerin plazma membranında ayrılır. Bilirubinin hepatositlere giriş şekli net olarak bilinmemekle birlikte bu sürecin protein Y ve Z'nin de içinde bulundukları bir taşıyıcı sistemle gerçekleştiği düşünülmektedir.

Hepatosit stoplazmasına taşıyıcı proteinlerle aktarılan unkonjuge bilirubin, hücre içinde, ligandine bağlanarak, düz endoplazmik retikuluma taşınır. Burada ilk basamakta UDP-glukuronil transferaz, bilirubini glukronik asitle konjuge ederek suda çözünür form olan bilirubin monoglukuronid (%15) ve diglukuronide (%85) katalizler (4).

Daha sonra aynı enzim ya da plazma membran transglukuronidazı oluşan bilirubin monoglukuronidi bilirubin diglukuronide çevirir. Hem bilirubin

monoglukuronid (% 15) hem de bilirubin diglukuronid (%85) safra kanallarına taşınarak safra yoluyla atılırlar. Böylece safra, aktif transportla safra yollarına, safra kesesine ve buradan da duodenuma suda çözünebilir direk formda (konjuge bilirubin) ulaşır. Safranin eksresyon aşaması bilirubin metabolizmasında hız sınırlayıcı basamak olarak adlandırılır (4).

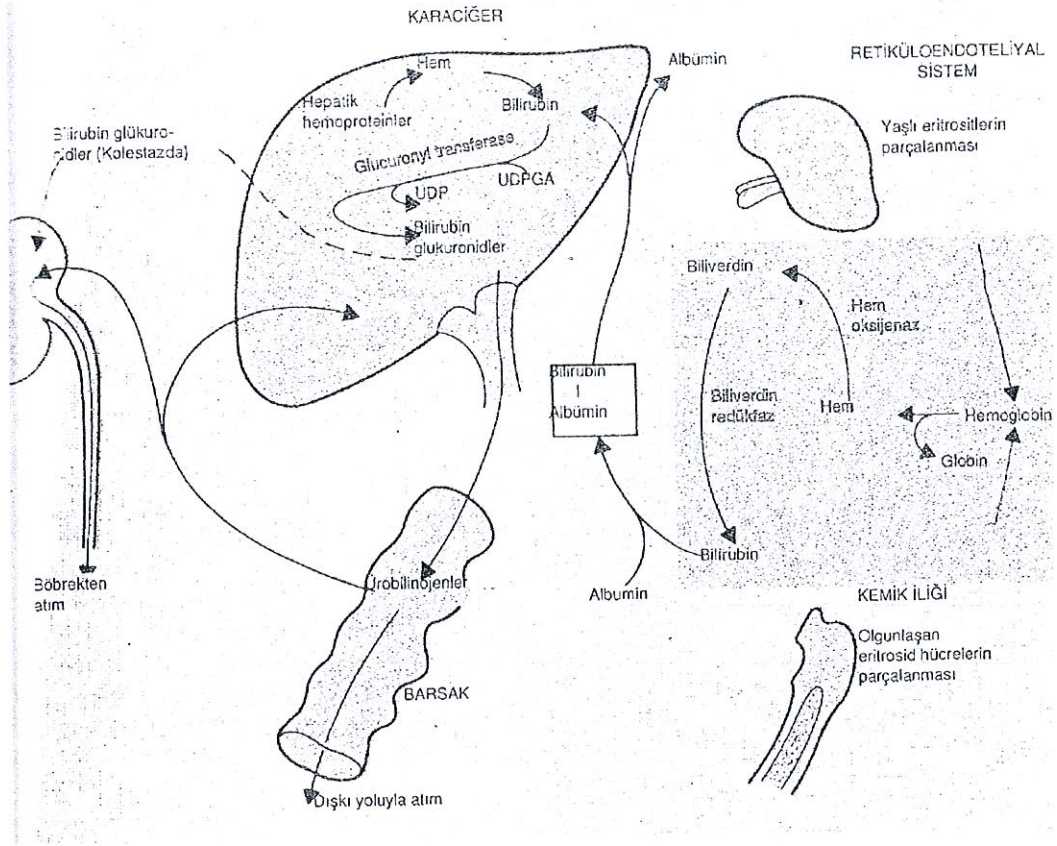
Bilirubin metabolizmasının önemli bir bölümü de ince barsaklarda gerçekleşir. Distal ince barsaklarda ve kolonda bulunan bakteriler, direk bilirubini ürobilinojen olarak isimlendirilen bir dizi bileşiğe dönüştürürler. Bu işlem sırasında oluşan ara ürünler mezobilirubinojen ve sterkobilirubinojendir. Bu renksiz ürünler daha sonra sterkobiline dönüştürülürler. Dışkıya özel rengini veren bileşik sterkobilindir. Ürobilinojenin az bir kısmı (% 10-15) terminal ileumdan ve kolondan geri emilerek böbrekten atılır. İdrarda artmış miktarda ürobilinojen olması bilirubin üretiminin arttığıнын, idrarda ürobilinojen olmaması da biliyer obstrüksiyonun göstergesi olabilir. Ürobilinojen, sterkobiline dönüşemediğinde akolik gaita oluşur (3).

İndirek bilirubin plazmada albumine bağlı olarak taşınır ve bu nedenle böbreklerden atılamaz; ancak direk bilirubin suda çözünebilir olduğundan glomerüllerden filtre olur ve böbreklerden atılır. Direk bilirubinin seviyesi arttıkça renal bilirubin atılımı 220 mg/gün'e ulaşır. Karaciğerde safra pigment yapımı 250 mg/gün olduğundan plazma bilirubin konsantrasyonunun 30 mg/dl'den daha fazla olması beklenmez.

Normal bilirubin metabolizması şu basamaklarla özetlenebilir;

- A)üretim
- B)hepatosit tarafından tutulum
- C)konjugasyon
- D)safra yollarına eksresyon
- E)GİS'e atılım

Bu aşamalardan herhangi birisindeki defekt sarılıkla sonuçlanacaktır.



Şekil-9: Bilirubin oluşumu, metabolizması ve atılma yolu

2.5 Sarılık

Sarılık safra yolları ve karaciğer hastalıklarında en sık karşılaşılan bulgulardan birisidir ve serum bilirubin seviyesinin yükselmesine bağlı olarak deri, mukoza ve skleraların sarı renk alması durumudur. Bilirubin "hem" yıkımı sonucunda oluşan, $C_{33}H_{36}O_6N_4$ kimyasal yapısında, sarı-kırmızı renkte organik bir iyondur. Normal serum bilirubin seviyesi 0.2-1.0mg/dl'dir. Serum bilirubin seviyesi 2.5 mg/dl üzerine çıktığında, sarılık klinik olarak belirgin hale gelir. Skleral elastinin bilirubine yüksek oranda bağlanma kapasitesi nedeni ile klinikte sarılığın ilk belirgin hale geldiği yer skleralardır (5,6).

2.6 Sarılık Sınıflandırması

Sarılık oluşumuna neden olan mekanizmalar üç grupta incelenebilirler;

1. Prehepatik sarılık
2. Hepatosellüler sarılık
3. Kolestatik sarılık

Sarılık ayrıca medikal ya da cerrahi sarılık veya direk ya da indirek hiperbilirubinemi olarak da sınıflandırılabilir.

2.6.1 Prehepatik Sarılık

Artmış bilirubin üretimine bağlıdır. Artmış hemoliz ve inefektif eritropoezis prehepatik sarılığın en önemli nedenleridir. İnefektif eritropoezise neden olan sebepler herediter sferositoz, talasemi ve orak hücreli anemi; artmış hemoliz bağlı prehepatik sarılık yapan nedenler ise sepsis, yanıklar,

enfeksiyonlar, ilaçlar, transfuzyon reaksiyonları ve edinilmiş otoimmün hastalıklardır.

2.6.2 Hepatosellüler Sarılık

Bilirubin karaciğerden azalmış alımına ya da azalmış glukuronil transferaz aktivitesine bağlı olarak gelişir. Karaciğerde bilirubin alımını azaltan en önemli nedenler bazı ilaçlar, uzamış açlık, sepsis ve viral hepatitlerdir.

Glukuronil transferaz aktivitesi, bazı ilaçlar ve hepatosellüler hastalıklara bağlı olarak azalabilir. Azalmış glukuronil transferaz aktivitesi ile seyreden en önemli iki hastalık Gilbert ve Crigler- Najjar sendromlarıdır .

Gilbert Sendromu toplumun % 3-6'sını etkilemektedir. En sık görülen unkonjuge, nonhemolitik hiperbilirubinemi nedenidir. Sarılık, indirek hiperbilirubinemi şeklindedir ve uzun süren açlık, ateş ve infeksiyon gibi nedenlerle daha belirgin hale gelebilir. Hastalarda sarılıktan başka bir belirti, belirgin bir intravasküler hemoliz yoktur. Karaciğer fonksiyon testleri ve karaciğer biyopsisi sonuçları normaldir. Bilirubin seviyesi nadir olarak 3 mg/dl 'yi geçer (4).

Crigler-Najjar Sendromu otozomal resesif tip I ya da otozomal dominant tip II şeklinde olabilir. Tip I nadirdir ve çocukluk yaş grubunda görülür ve genellikle yaşamın ilk yılında ölümle sonuçlanır. Glukuronil transferaz aktivitesinde tam kayıp vardır. Tip II daha hafiftir ve erişkin yaş grubuna ulaşabilir. Glukuronil transferaz aktivitesinde önemli derecede azalma vardır (4).

Hepatosellüler sarılığın önemli iki nedeni hepatit ve sirozdur. Sirozda sarılık gelişmesi kötü bir prognostik göstergedir. Siroz varlığında herhangi bir uzak infeksiyon da sarılığa neden olabilir.

Neonatal sarılık da hepatosellüler sarılık nedenlerindendir. Hepatik konjugasyon ve transport sistemindeki immatüriteden kaynaklanır. Bu problem yaşamın 2. ile 5. günü arasında ortaya çıkar ve enzim sistemi matür hale gelince, genelde 2. haftada kaybolur.

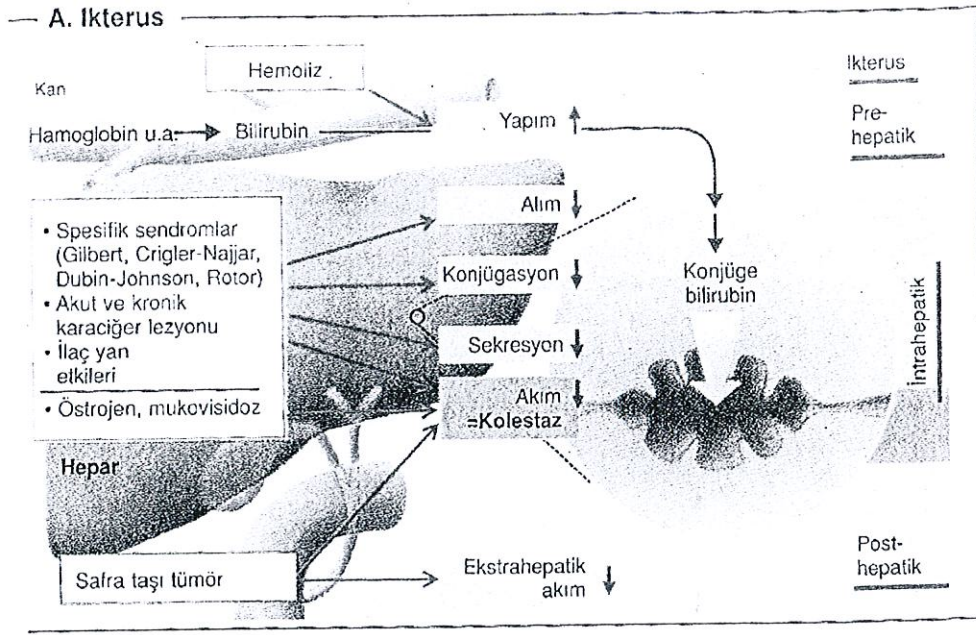
2.6.3 Kolestatik Sarılık

İntrahepatik ve ekstrahepatik sarılık olmak üzere iki alt grupta incelenebilir.

Bilirubinin safra kanaliküllerine salınımında ortaya çıkan sarılığa intrahepatik veya medikal sarılık denir. Sepsis, ilaçlar ve hepatosellüler hastalıklar intrahepatik kolestaz yoluyla da sarılığa neden olabilirler. İntrahepatik kolestaza neden olan ilaçlardan bazıları; metimazol, eritromisin, klorpropamid, tetrasiklin, halotan, fenitoin, izoniazid ve asetaminofendir. İntrahepatik kolestazın ailevi nedenleri Dubin-Johnson Sendromu, Rotor Sendromu ve gebeliğin kolestatik sarılığıdır (4).

Dubin-Johnson Sendromu, aminofilik anyonik bileşiklerin safra yoluyla atılımında bozulmaya neden olan otozomal resesif bir hastalıktır. Karaciğerde epinefrin metabolitleri oldukları düşünülen siyah pigmentler birikir; bu da karakteristik "siyah karaciğer" görüntüsüne neden olur. Rotor Sendromu, karaciğerin direk bilirubini depolama kapasitesini kısıtlayan, otozomal resesif bir bozukluktur.

Ekstrahepatik kolestaz veya biliyer obstruksiyona bağlı oluşan sarılığa, cerrahi sarılık veya tıkanma sarılığı denir. Safra akışının hepatosit membranından, safra kanalının duodenuma giriş yerine dek herhangi bir yerde tıkanmasıdır. En önemli belirtisi sarılıktır. Sarılık nedenleri Tablo 1 ve Tablo 2'de özetlenmiştir.



Şekil 10: Sarılık oluşum mekanizmaları

Tablo 1: İndirek (Unkonjuge) hiperbilirubinemi nedenleri:

1) Bilirubin üretiminde artma

Hemolitik anemi
Hemoglobinopatiler
Enzim eksiklikleri
DIC
İnfektif eritropoez
Kan transfüzyonları
Hematomlar

2) Herediter bozukluklar

Gilbert sendromu
Crigler-Najjar tip 1, 2

3) İlaçlar

4) Hepatosellüler hastalık

Akut hepatit
Kronik hepatit
İlaçlar
Alkol

Tablo 2: Direk (Konjuge) hiperbilirubinemi nedenleri

1)Herediter bozukluklar

Dubin-Johnson sendromu

Rotor sendromu

2)Hepatosellüler hastalık

Akut hepatit

Kronik hepatit

Siroz

İlaçlar

Alkol

3)Tümörler

4)İnfeksiyonlar

5)İnfiltratif hastalıklar

6)İlaca bağlı kolestaz

7)Ekstrahepatik kolestaz

8)Postoperatif sarılık

9)Gebeliğin nükseden sarılığı

10)Sepsis, Parenteral nütrisyon

11)Primer biliyer siroz

12)Sklerozan kolanjit

2.7Tıkanma sarılığı sınıflandırması

Safra yolları tıkanıklıkları dört grupta incelenebilirler:

Tip 1: Tam tıkanıklık durumudur. Sarılığa neden olur. (Tümör, ortak safra kanalının bağlanması, parankimal karaciğer tümörleri, kolanjiokarsinom)

Tip 2: Aralıklı tıkanıklık mevcuttur. Biyokimyasal değişiklikler mevcuttur; ancak klinik sarılık gözlenmeyebilir. (Koledokolitiazis, periampuller tümörler, duodenal divertiküller, polikistik karaciğer hastalığı, hemobilia)

Tip 3: Kronik tam olmayan tıkanıklık mevcuttur. Başlangıçta biyokimyasal değişiklikler gözlenmeyebilir; ancak değişiklikler sonuçta safra yollarında ya da karaciğerde patolojik değişikliklere neden olur. (koledokta darlık, bilioenterik anastomozlarda darlık, kistik fibrozis)

Tip 4: İntrahepatik safra yollarının bir ya da birkaç tanesinin segmental tıkanıklığı mevcuttur. Segmental tıkanıklık tam, intermittan ya da kronik tipte olabilir. (Travmatik, hepatolitiazis, kolanjiokarsinom)

2.7.1Kolestaza Bağlı Konjuge Hiperbilirubinemi Nedenleri

- **Hepatit sarılığı**, hastalığın başlangıcında indirek bilirubinin, safra kanaliküllerinin tıkanması sonrasında direk bilirubinin artmasıyla karakterizedir. Total bilirubinin % 65'ini direk, %35'ini indirek bilirubin oluşturur.
- **Kolestatik sarılık**, safra kanaliküllerinden ve safra kanallarından atılım bozukluğuna bağlı olarak ortaya çıkar. Sık olarak hiperbilirubinemi ile birlikte hiperlipemi de vardır

- **Safra taşlarına bağlı tıkanma sarılığı,** artıp azalan hiperbilirubinemi ile karakterizedir. %10 mg'a kadar yükselen hiperbilirubinemi olabilir.
- **Tümöre bağlı sarılık,** sürekli artan hiperbilirubinemi ile karakterizedir. Genellikle %20 mg'dan yüksek hiperbilirubinemi saptanır.

2.8 Tıkanma Sarılığında Patofizyolojik Değişiklikler

Tıkanma sarılığında safra kanallarında biriken bilirubin, safra tuzları ve kolesterol, hepatik fonksiyonları bozan lokal etkiler yaparken, geniş sistemik etkiler de yapar. Sarılıklı hastada artmış hepatik disfonksiyon, renal hasar, kardiyovasküler hasar, kanama, enfeksiyon, yara komplikasyonları, cerrahiden sonra ölüm riski gibi sorunlar vardır.

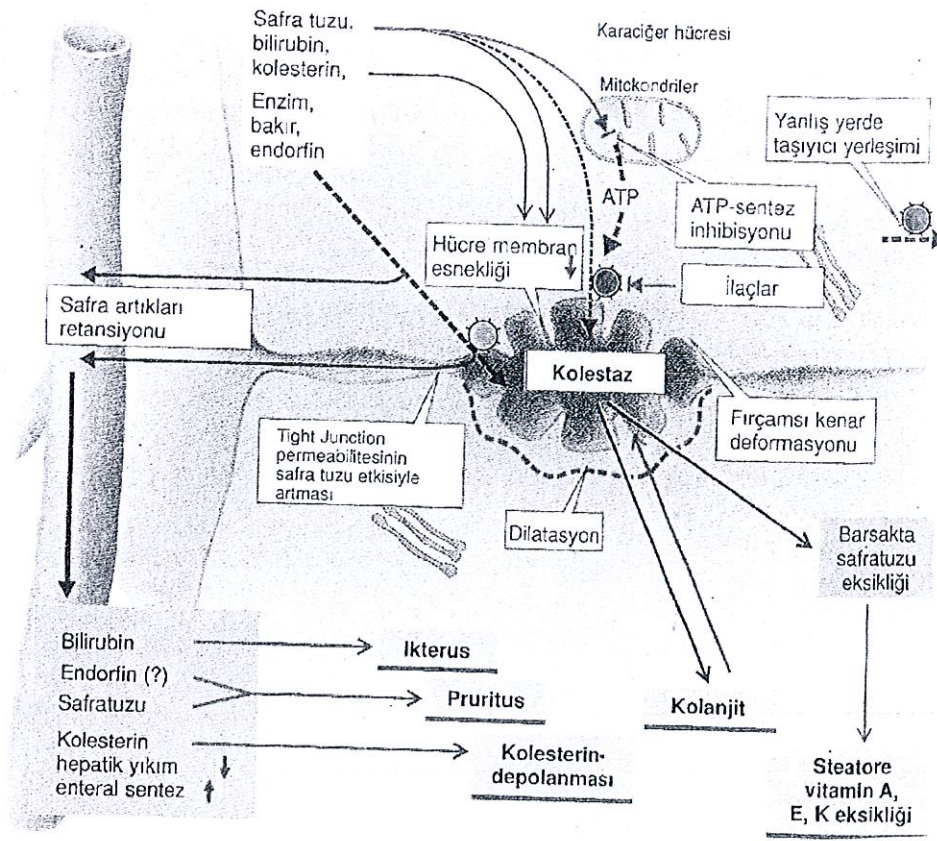
Normal safra yolları basıncı 5-10 cm H₂O'dur. Tıkanma ikterinde oluşan obstrüksiyonda biliyer basınç 30 cm H₂O'ya kadar ulaşabilir. Tıkanma sarılığında safra yollarındaki basınç artışıyla birlikte, safra kanalikülünde dilatasyon ve mikrovillüslarda dejenerasyon görülür. Karaciğerde safra pigmenti çöker ve kolesterol ve safra tuzu birikimine bağlı olarak safra kanalı epiteli bozulur. Epitelin fırçamsı kenarı deforme olur veya tamamen yok olur. Sonuçta kanaliküler motiliteyi de kapsayan hücre fonksiyonu bozulur. Biliyer obstrüksiyonda ayrıca hepatositlerin sekresyon ve metabolik fonksiyonları bozulur. Buna bağlı olarak ilk 48 saatte fokal nekroz oluşur.

Uzun süren tıkanma sarılığında safra kanaliküllerinde proliferasyon görülür. Safra yollarındaki kolestaza bağlı intrahepatik ve ekstrahepatik dilatasyon, safra kanalı çevresinde PMNL (Polimorfonükleer lökosit) infiltrasyonuna neden olur ve kan akımındaki bakteriyel translokasyon olasılığını artırır. Bu inflamatuvar süreç fibrozis ile sonlanır. Biliyer basınç 20

cm H₂O 'yu geçtiği zaman hepatik safra sekresyonu da bozulur. Artan safra asitleri mitokondriyal sitokrom p450 enzim sistemini inhibe eder. Sonuçta karaciğerde oksidatif metabolizma azalır.

Tıkanma sarılığı uzadıkça hepatositte atrofi ve fibrozis artar. Karaciğer makroskopik olarak sarı-yeşil renkte, şişmiş ve yuvarlak bir şekildedir. Safra birikimine bağlı olarak portal bölgelerde fokal nekroz gelişir. Sonuçta tıkanma ikterine bağlı sekonder biliyer siroz gelişebilir (7,8,9).

Biliyer obstrüksiyonda portal kan akımındaki artışa rağmen total karaciğer kan akımı azalır. Bu azalma RES'de ortaya çıkan fonksiyon değişikliklerinden sorumlu tutulmaktadır. RES'de kupffer hücreleri, doku makrofajları dominant hücre tipleridir. Dolaşımdaki infeksiyöz ajanlar, hasarlı kan hücreleri, endotoksinler Kupffer hücreleri tarafından temizlenir. Ancak tıkanma ikterinde Kupffer hücre fonksiyonunda belirgin azalma olduğu gösterilmiştir (10). Deneysel tıkanma ikteri oluşturulan ratlarda görülen yama tarzı karaciğer nekrozunun nedeni bu Kupffer hücre harabiyeti olabilir (11).



Şekil 11: Kolestaz patofizyolojisi

2.9 Biyokimyasal Değerlendirme

Sarılıklı bir hastanın değerlendirilmesinde anamnez ve fizik muayeneden sonraki ilk basamak, diğer biokimyasal testlerle birlikte hiperbilirubinemi seviyesinin ve niteliğinin değerlendirilmesidir. Tıkanma sarılıklarında direk bilirubin artmaktadır; ancak direk bilirubinemi varlığı, intrahepatik kolestaz ile tıkanma sarılıklarını ayırmada yeterli değildir. İndirek bilirubin böbreklerden filtre edilemediğinden, idrarda bilirubin saptanması, direk hiperbilirubinemi göstergesidir. Direk hiperbilirubinemi, bilirubinuri ve akolik gayta üçlüsü tıkanma sarılığı göstergesidir.

AST ve ALT temel olarak karaciğer harabiyetini gösteren biyokimyasal parametrelerdir. AST, karaciğer, kalp, böbrek, iskelet sistemi ve beyinde bulunur. Mitokondri ve sitoplazmada bulunan bir enzimdir. Serum değeri

ALT'den daha yüksektir. ALT ise spesifik olarak hepatositlere özgüdür ve sitoplazmik bir enzimdir. Karaciğer hasarını ölçmede ALT daha spesifiktir. Tıkanıklığa kolanjit eşlik etmediği sürece ALT ve AST yükseklikleri belirgin değildir.

Karaciğer parankim hastalıklarında hem konjuge hem de unkonjuge bilirubin değerleri artar, bilirubinuri oluşabilir. Akut hepatitli hastada serum AST, ALT değerleri çok yüksekken tersine ALP ve bilirubin hafif yükselir ve genellikle amilaz normaldir. Sirozda parankimal hasarla orantılı olarak bilirubin yükselir. Albumin, faktör 5, faktör 8, faktör 9, faktör 10, protrombin ve fibrinojen karaciğerde sentezlenir. Serum albumin ve PT (Protrombin zamanı) değerleri parankimal hasarı değerlendirmede çok faydalıdır. Tıkanma ikterinde komplet tıkanıklığa bağlı olarak serum safra tuzu seviyeleri normalin 50-60 kat üstüne çıkar. Bunun nedeni safra tuzlarının enterohepatik sirkülasyonunun bozulmasıdır. Bu durumda karaciğerde safra tuzu sentezi azalır. Böbrek yolu ile safra tuzu atılımı artar. Karaciğerde idrarla daha kolay atılan anormal safra tuzları (ursodeoksikolik asit) sentezlenmeye başlar.

Tıkanma sarılıklarında alkalen fosfotaz, gama glutamil transferaz ve 5'-nükleotidaz düzeylerinin yükselmesi önemli bulgulardandır. Vitamin K eksikliğine bağlı olarak protrombin zamanında uzama gözlelenebilir.

Serum ALP (Alkale fosfataz) seviyesi tıkanma sarılığında bilirubine göre daha sensitif bir indikatördür, fakat kemik hastalıklarına bağlı olarak da yüksek bulunabilir. Bu durumda, serum 5'-nükleotidaz ve gama glutamil transferaz (GGT) ölçümlü yapılmalıdır. ALP ile beraber bu parametrelerin de yüksek olması tıkanma ikterini düşündürür.

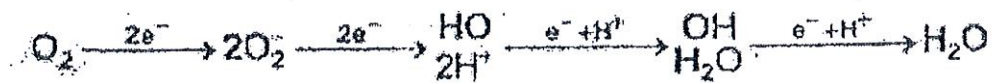
Bilirubin düzeyi tıkanma sarılığının nedeni hakkında bilgi verebilir. En yüksek bilirubin oranları malign ekstrahepatik obstrüksiyonlarda olur ve bilirubin seviyesi 20mg/ml'yi geçebilir. Aynı zamanda ALP değerleri de ileri derecede artar. Ancak amilaz değerleri genelde normaldir. Safra taşlarına bağlı oluşan tıkanma ikterinde bilirubin seviyesi nadiren 10-12 mg/dl 'nin üzerine çıkar.

2.10 Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

Serbest radikaller en dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron içeren oldukça reaktif özellik gösteren moleküllerdir (12). İnsan metabolizmasında hayatın idamesi için gerekli olan enerji oksijenden elde edilir. Oksijen hücre içinde çeşitli reaksiyonlardan geçerek su haline dönüşürken hücre kendisi için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Ancak bu esnada oksijenin yaklaşık %5'i tam olarak suya dönüşmez ve serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar (12).

Organizmada bu reaksiyonlar sırasında serbest oksijen radikallerinin yanı sıra radikal olmayan ancak serbest radikal oluşturma potansiyelleri bulunan hidrojen peroksit ve hipokloröz asit (HOCl) gibi zararlı oksijen türleri de oluşur. Bu nedenle oluşan bu oksijen türlerinin tümünü reaktif oksijen türleri olarak tanımlamak daha doğru olacaktır. Bu reaktif oksijen türleri radikal veya radikal olmayan moleküllerle reaksiyona girerek organizma için zararlı bir takım bileşiklerin oluşmasına öncülük ederler.

Oksijenden enzimatik reaksiyonlar sonucu enerji ve su elde edilmesi sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan süperoksit radikali (O_2^-) oluşur. Oksijen molekülüne bir elektron alınmasıyla meydana gelir.



Süperoksit radikali hemen hemen tüm aerobik hücrelerde ortamın oksijen konsantrasyonu ile ilişkili olarak fagositik hücre aktivasyonu sonucunda oluşabilir. Ayrıca süperoksit radikalının fagositik hücre aktivasyonu sonucunda NADPH-oksidaz aracılığı ile de oluşabildiği gösterilmiştir. Bu yolla oluşan süperoksit radikali vücuda giren zararlı bakterilerin yok edilmesinde etkili bir savunma mekanizması olabilmektedir. Oluşan süperoksit, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile veya spontan dismutasyon ile hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüşür (13).

H₂O₂ miyeloperoksidaz enzimi ile hidroksil radikaline ve hipokloröz aside dönüşür. H₂O₂ aynı zamanda prostoglandin sentezini de uyarır. H₂O₂ paylaşılmamış elektron taşımadığından radikal değildir ve membranlardan kolaylıkla geçebilir. Ancak hücrelerden uzaklaştırılması oksijen kadar önemlidir. Çünkü bakır ve demir varlığında ciddi hücresel hasar oluşturabilmektedir. Hücrelerden H₂O₂, katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri ile uzaklaştırılır (14).

Süperoksit radikali (⁺O₂⁻) ortamdan bir proton alarak perhidroksil (HO₂[•]) radikali oluşturabilir. Perhidroksil radikali süperoksitten daha reaktiftir ve membranlardan kolay geçer. Yağ asitleri ile doğrudan etkileşebilir, linoleik, linolenik ve araşidonik asitlerin peroksitlerine dönüşümünden sorumludur (15).

Yine süperoksit radikali hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek hidroksil ([•]OH) radikali ve 1 singlet oksijen (O²¹) oluşturabilir (16).

Hipokloröz asit (HOCl) vücutta aktive olmuş nötrofillerde bulunan güçlü bir oksidandır (17). H₂O₂'li ortamda klor olması halinde myeloperoksidaz (MPO) aracılığı ile hipokloröz asit oluşur. (H₂O₂+Cl+H⁺ → HOCl+H₂O) Primer aminlerle reaksiyona girerek N-kloroaminleri oluşturur. N-kloroaminler organizmada pek çok noktada oksidasyon ve klorlanma reaksiyonlarında rol oynayan önemli serbest radikallerdendir. N-kloroaminlerin sitotoksitesi, sülfidril gruplarının oksidasyonu, hemoproteinlerin ve sitokromların inaktivasyonu, DNA'nın purin bazlarının klorlanması ve proteinlerle amino asitlerin parçalanması şeklindedir (18).

Hidroksil radikali ([•]OH) en etkili oksijen radikalidir. İyonize edici radyasyonla ve H₂O₂'in geçiş metalleri ile yıkımı sonucu oluşur (14). İn vivo oluştuğunda oluşum bölgesi ve yakın çevresinde etkili olur.



Alkoksil radikali ($RO^\bullet$), oksijen merkezli organik lipid radikalidir (15).

Peroksil radikali ($ROO^\bullet$), organik hidroperoksitten ($ROOH$) bir hidrojen kopartılması ile oluşur (19).

Nitrojen oksitlerden olan nitrik oksit ($NO^\bullet$) ve nitrojen dioksit ($NO_2^\bullet$) tek sayıda elektron içerirler ve bu nedenle serbest radikaldirler. Nitroz oksit (N_2O) ise radikal değildir. Nitrik oksit süperoksitle reaksiyona girer ve reaktif ara ürün olan peroksinitriti $ONOO^-$ oluşturur. Bu güçlü bir oksidandır ve asit pH'da parçalanarak hidroksil radikalini oluşturur.

2.11 Organizmada Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Organizmada serbest radikal oluşumu endojen ve eksojen olmak üzere iki yolla olmaktadır (20). En önemli serbest radikal kaynağı oksijendir. Organizmada moleküler oksijenin kullanıldığı bir dizi reaksiyon sonucu süperoksit radikali oluşur. Bu da diğer serbest oksijen radikalleri için substrattır. Endojen serbest radikaller zararları yanında organizmada çeşitli basamaklarda ortaya çıkan ve bazı metabolik olayların ilerleyebilmesinde kilit rol oynayan moleküllerdir.

Endojen serbest radikallerin en önemli kaynağı **mitokondriyal elektron taşıma sistemidir**. Normalde elektron taşıma sistemine giren oksijenin tamamı suya indirgenir ancak bu sırada %5' i serbest radikallere de dönüşebilir. Bu reaksiyonlarda serbest radikal oluşumundan sorumlu enzimler NADH dehidrogenaz ve dihidroorolat dehidrogenaz enzimleridir. Organizmada serbest radikal oluşumunu sağlayan endojen bir diğer kaynak **hücre içi membran sistemlerinden** olan endoplazmik retikulum ve nükleer membranlardır. Burada rol oynayan enzimler sitokrom P_{450} ve sitokrom B_5 tir.

Bu reaksiyonlarda NADH ya da NADPH kullanılır ve doymamış yağ asitlerinin indirgenme reaksiyonları sırasında serbest radikaller oluşur.

Yine organizmada oksidasyon redüksiyon reaksiyonlarında görev alan bazı moleküller aynı zamanda serbest radikal oluşumunda rol oynarlar. Tiyoller, hidrokarbonlar, ve tetrahidropterinlerin oksijen molekülünü indirgeme özelliği bulunmaktadır. Ksantin oksidaz, iskei durumunda dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşerek süperoksit radikali oluşturur. Aldehid oksidaz da aynı substratları kullanır ve benzer yapıya sahiptir. Dihidroorolat dehidrogenaz, flavo-protein dehidrogenaz ve triptofan dehidrogenaz, süperoksit radikali oluşturan bazı enzimlerdir. Peroksizomlar da yüksek konsantrasyonda oksidaz enzimleri içerirler. Bundan dolayı hücrede oluşan H_2O_2 'nin büyük bölümü katalaz tarafından yıkılır. Geriye kalanı ise sitoplazmaya difüze olur.

Serbest radikaller, plazma membranında ve mikrozomal membranda lipooksijenaz ve siklooksijenaz gibi enzimlerin etkisiyle oluşabilirler. Hücre dışında oluşan serbest radikaller plazma membranını geçmek zorundadırlar. Bu geçiş sırasında hücre membranı da serbest radikal hasarından etkilenmektedir.

Eksojen serbest radikal kaynakları içinde en önemlileri diyetel faktörler (alkol doymamış yağ asitleri, obezite, hayvansal proteinlerden aşırı beslenme, aşırı demir ve bakır alınması, yanlış pişirme ve saklama), çevresel faktörler (sigara, hidrokarbonlar, asbest, pestisitler, radyasyon, solvent ve anestezikler) ve ilaçlar (adriamisin, daunorubisin, doxorubisin, asetaminofen, kokain) dir.

Serbest oksijen radikalleri lipitler, karbonhidratlar ve nükleik asitler gibi moleküllerle reaksiyona girerek oksidatif hasara ve bazı kanser türlerine, yaşlanmaya, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklara yol açarlar.

Kısaca serbest radikaller DNA hasarı, nükleotid yapılı enzim yıkımı ve inaktivasyonu, lipid peroksidasyonu, protein ve lipidlere kovalan bağlanma ile proteinlerin oksidatif hasara uğraması, zar yapılarının ve fonksiyonlarının etkilenmesi gibi doku ve hücre hasarına neden olacak reaksiyonlarda önemli rol oynarlar (21).

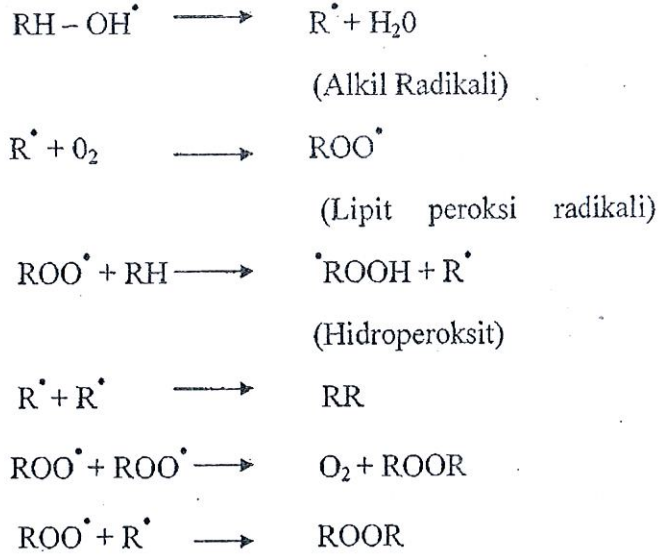
2.12 Lipid Peroksidasyonu

Serbest radikallerin lipidler üzerinde meydana getirdiği en önemli olay lipidlerin radikal aracılığı ile peroksidasyonudur. Poliansatüre yağ asitlerinin serbest radikaller ile oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır. Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli yükseltgen bir radikalın etkisiyle membran yapısındaki poliansatüre yağ asit zincirindeki alfa-metilen gruplarından bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu radikalın süperoksit ile hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Lipid peroksidasyonu, reaktif oksijen metabolitleri ile yağ asitlerinin etkileşmesi sonucu başlar. Yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması sonucu zincir radikal niteliğini kazanır. Bunun sonucunda oluşan radikal alkil radikalidir.

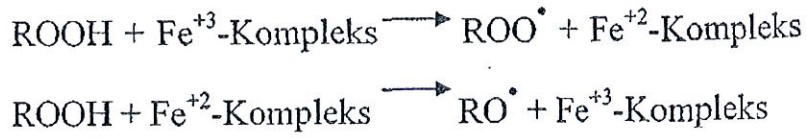
Başlangıç (initiation) aşaması: Alkil radikali dayanıksız bir türevidir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Özellikle molekül içi çift bağ aktarılması ile dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalının moleküler oksijenle etkileşimi sonucunda lipid peroksi radikali oluşur. Lipid peroksi radikali zar yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek hidroperoksit ve yeni bir alkil radikali oluşturur.

Yayılma (propagation) aşaması: Peroksidasyon bu aşamada kendi kendini katalizleyerek sürer.

Sonlanma (termination) aşaması: Lipid peroksidasyonu; iki radikalın birleşerek radikal olmayan bir bileşik oluşturması ile sonlanabilir.



Hidroperoksitler (ROOH) kararlı olabilir, ancak demir ve demir kompleksleri ile reaksiyona girmeleri halinde peroksidasyon yeniden başlayabilir.



Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin, aldehit ve diğer karbonil bileşikleriyle etkileşmesi sonucu etan, pentan gibi uçucu gazlara dönüşür.

2.13 Malondialdehit (MDA)

Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu malondialdehid (MDA) oluşur (22). Yağ asidi peroksidasyonu MDA'ın asıl kaynağını oluşturmakla birlikte hemoglobin (Hb) ve miyoglobinin H_2O_2 ile etkileşmesi ile de oluşum gerçekleşebilir.

Lipid peroksidasyonu biyolojik membranlarda akıcılığın kaybına, membran potansiyelinde azalmaya, hidrojen ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğin artışı ve sonuçta hücrenin hasarına ve hücre içeriğinin serbestleşmesine neden olur. Peroksidasyon sonucu oluşan MDA membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağ yapmalarına neden olur. Bu durum hücre yüzeyinin durumunu, enzim aktivitesini ve iyon transportunu etkileyebilir

MDA lipid peroksidasyonunun son ürünü olduğundan lipid peroksidasyonunu ve serbest oksijen radikal oluşumunu MDA 'yı ölçerek izlemek mümkündür (23).

2.14 Antioksidan Savunma Sistemleri

Vücutta oksidan ve antioksidan savunma sistemleri bir denge halinde bulunmaktadır. Bu dengenin oksidasyon lehine dönmesi ile oksidatif hasar oluşabilir. Serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırmak için organizmada bulunan sistemler antioksidan sistemler olarak adlandırılır. Antioksidan sistemler primer, sekonder ve tersiyer olarak 3 gruptur.

Primer antioksidan sistemler, serbest radikal oluşumunu engelleyerek etkili olan sistemlerdir. Serbest radikalleri biyolojik önemi olan daha zararlı moleküllere dönüşmeden etkisiz hale getirirler. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, ferritin ve seruloplazmin gibi enzimler bu grupta yer alır.

Vitamin E ve C, P-karoten, ürik asit, bilirubin ve albumin *sekonder antioksidanlardandır*. Bunlar serbest oksijen radikallerini yakalayıp oluşabilecek zincir reaksiyonlarını engellerler (24,25).

Tersiyer antioksidanlar etkilerini serbest radikallerin neden olduğu biyomoleküler hasarı onararak gösterirler. DNA onarım enzimleri (Glikozilaz,

endonükleaz, ekzonükleaz) ve metiyonin sülfoksit redüktaz tersiyer antioksidanlardır.

Antioksidan savunmanın en önemli elemanları süperoksit (O_2^{**}) ve hidrojen peroksidi (H_2O_2) temizleyen süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleridir (14).

SOD molekül ağırlığı 32000 dalton olan mitokondri ve stoplazmada bulunan ve süperoksitin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalize eden bakır ve çinko içeren bir metalloenzimdir. Süperoksit radikallerin daha toksik substratlar oluşturması SOD tarafından önlenir. Oluşan H_2O_2 katalaz ve glutatyon peroksidazla suya dönüştürülür.

Katalaz dokularda çok yaygın olarak bulunan ve yüksek seviyelerdeki hidrojen peroksidi (H_2O_2) metabolize eden bir enzimdir (14).

Glutatyon (GSH), glutamik asit, glisin ve sisteinden oluşan intrasellüler konsantrasyonu daha fazla olan bir tripeptittir. Önemli bir antioksidan ve indirgeyici olan GSH hücreyi ekzojen ve endojen oksidazların zararlı etkilerinden korur. Glutatyon peroksidaz (Gpx), glutatyonu kullanarak düşük seviyedeki H_2O_2 gibi serbest radikalleri indirger (26). Gpx GSH'yi indirgeyerek reaksiyonları katalizler ve GSSH ve H_2O oluşur. İskemi reperfüzyon hasarında da hücre içi glutatyon düzeyi ne kadar yüksekse hücre hasarı o kadar düşük olmaktadır (27). Total GSH seviyeleri iskemi süresi artarken azalmaktadır. Eğer etken GSH savunmasını aşarsa ileri karaciğer hasarı oluşur. Glutatyon ayrıca ilaç metabolizmasında konjuge edici ajan olarak rol oynamaktadır. Hücre içi transport mekanizmalarında önemli işlevleri vardır. Ayrıca bazı enzimatik reaksiyonların kofaktörü olarak rol oynar, proteinlerin disülfid bağlarının düzenlenmesine yardım eder. Glutatyonun indirgeyici rolü, özellikle eritrositlerin yüksek okside edici ortamlarında önemlidir. GSH'ın sülfidril grubu oksijen transportu sırasında oluşan peroksitleri azaltmada yararlıdır (28).

Glutasyon indirgenmiş glutasyon (GSH) ve okside glutasyon (GSSG) olarak iki şekilde bulunur. GSH vücutta bulunan ana antioksidan maddedir. Glutasyon sentezi, gama-glutamilsistein sentetaz ve GSH sentetaz adlı enzimlerin katıldığı 2 basamaktan oluşur. İlk reaksiyon hız kısıtlayıcı basamaktır ve aktif olarak GSH tarafından inhibe edilir. İkinci basamak GSH ile inhibe olmaz. GSH zararlı oksi radikaller tarafından kullanıldığı zaman bu *feedback* inhibisyon kaybolur. En yüksek oranda karaciğerde bulunur. Okside olmuş E ve C vitamininin tekrar yapılandırılmasında görevlidir. GSSG/GSH oranı oksidatif stresin önemli bir göstergesidir. Oksidatif streste bu oran artar.

2.15 Nitrik Oksit (NO)

Tek sayıda elektron içeren inorganik serbest radikaldir. NO lipofilik kimyasal stabilitesi olmayan reseptöre gerek olmadan kolayca diffüze olabilen bilinen en düşük ağırlıklı biyoaktif hücre sekresyonudur. Yarılanma ömrü çok kısadır (3-5 saniye). Apokrin ve parakrin hücrelerde haberci (Messenger) olarak işlev görür. L-argininden Nitrik oksit sentetaz enzimi ile sentezlenir. Nitrik Oksit Sentetazın (NOS) üç farklı izoenzimi vardır (29). nNOS (nöronal NOS) ilk olarak sinir dokusunda bulunmuştur, kalsiyuma bağımlı bir enzimdir. eNOS (endotelyal NOS) ilk olarak endotel hücrelerinde tanımlanmıştır. Kalsiyuma bağımlıdır. iNOS (indüklenbilir NOS) ilk olarak endotoksinler ve sitokinler aracılığıyla karaciğer hücreleri ve makrofajlarda, uyarılan enzim olarak tanımlanmıştır. Kalsiyuma bağımlı değildir ve sitozolik bir enzimdir. nNOS ve eNOS hücre membranı enzimidir. Uyarılabilir olması nedeni ile iNOS 1000 kat daha fazla NO üretimine neden olur ve aktivasyonu saatler alır ancak, bir kez üretildikten sonra uzun süre kanda tespit edilebilir. NO'nun kendi üretimi üzerine (-) feedback etkisi vardır.

NO'nin karaciğer kan akımının düzenlenmesi, vasküler permabilite artışı, vazodilatasyon gibi kan dolaşımını düzenleyen önemli etkileri mevcuttur. Karaciğerde sinüzoidal kan akımını düzenleyen ito hücreleri üzerinde gevşetici etkisi mevcuttur.

Bazal değerlerinde NO normal fizyolojik olaylarda hayati rol oynar. Bununla birlikte, NO ile ağır stimölasyon hücrelerin tahribine yol açar. Kan basıncı NO'in kandaki konsantrasyonuna bağlı olarak ayarlanır. Ancak ęok yüksek miktardaki NO öölümcöl dolaşıım yetmezliğine neden olmaktadır.

Böbrekte ve damar ęeperindeki endotel hücrelerinde bulunan NO sodyum dengesinin ve volüm homeostazının düzenlenmesinde rol oynar. Ayrıca nitrik oksidin akut ve kronik enflamasyon, sistemik inflamatuvar yanıt ve sepsiste rol oynadığını gösteren ęok sayıda ęalıřma vardır.

NO'in intestinal mukozalarda, mukozal bariyeri oluşturan önemli maddelerden biri olduğunu gösteren ęalıřmalar mevcuttur. Ayrıca tıkanma ikterinde intestinal sistemde oluşan bakteriyel translokasyon patolojisinde rol oynayan önemli bir mediyatördür. Bakteriyel endotoksemi sonucu indüklenen iNOS yapımı NO yapımının artmasına, aşırı miktarda sentezlenen NO'de mukozal hasara neden olur.

Yine yapılan ęalıřmalarda tıkanma sarılığında aşırı NO sentezi aracılığı ile hepatik lipid peroksidasyonunun ve karaciğer hasarının arttığı gösterilmiştir (30). Shiomi ve ark. lipid peroksidasyon yolu ile rat karaciğer dokularında aşırı NO sentezinin yol ağtığı mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve buna bağlı hepatik nekrozu göstermişlerdir. Liu ve Criado'da dokularda aşırı iNOS üretimi ve kanda artmış olan NO'in renal hasarı arttırdığını ifade etmişlerdir (31,32).

2.16 Eritropoetin

Eritropoetin (EPO) ilk kez 1977'de Miyake ve arkadaşları tarafından insan idrarından saflaştırılmış bir hormondur. 1985'te Lin ve Jacobs tarafından insan EPO'ini kodlayan gen klonlanarak rekombinant insan eritropoetini (RhEPO) elde edilmiştir. İnsanda geni, 7. kromozomda bulunan eritropoetin (EPO), yaklaşık 34000 dalton moleküler ağırlıkta, üç N-bağı ve

bir O-bağlı karbonhidrat bölümü olan 165 amino asitten oluşan, tek zincirli glikoprotein yapıda bir eritroid seri büyüme hormonudur (33).

Kemik iliğinde üretilen diğer hematopoetik hormonların aksine EPO, gerçek bir hormondur ve biyolojik olarak aktif hale gelmesi glikozillenmesine bağlıdır. Molekülünden siyalik asitin uzaklaştırılması karaciğerde inaktive olmasına yol açar. Ancak siyalik asit bulunmayan moleküllerin invitro etkinliği devam eder. Kültür ortamında %98'den fazla saflaştırılmış olup, tamponlanmış tuzlu su içinde formüle edilmiştir. Subkutan uygulama sonrası pik serum maksimum konsantrasyonuna 12-24 saatte ulaşır. Yükselmiş EPO değerleri serumda 48 saat kadar sürebilir. Subkutan kullanımın intravenöz uygulamaya göre daha efektif sonuçlar verdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (34 35).

Eritroid seri kan hücrelerinin yapımı için en önemli uyaran hormonal düzenlemedir ve eritroid seri üretiminin en önemli yeri böbreklerdir (36). EPO mRNA'sı üzerinde yapılan çalışmalarda, eritropoetin sadece böbrekte değil pek çok farklı organda üretildiği gösterilmiştir, ancak EPO üretiminin hangi hücre tipinde geręekleştięi tam olarak açıklanamamıştır. EPO üretiminin en önemli uyarıcısı renal oksijenizasyon düzeyidir.

EPO'in böbrek dışı organlarda da üretilebildiği, böbreği olmayan hastalarda düşük miktarda eritropoetin üretiminin sürmesi ile gösterilmiştir. Karaciğer, ekstrarenal eritropoetin üretiminin temel organıdır. Ayrıca fetal hayatta eritropoetin sentezinin major kaynağı da karaciğerdir. Ciddi hipoksi durumunda total eritropoetin üretiminin %10'u karaciğerde Kupffer hücreleri ve hepatositlerce geręekleştirilir (37) .

2.16.1 Biyolojik Etkinliği ve Klinik Kullanımı

Eritropoetin eritropoezi düzenlemesi üç yolla olmaktadır. Bunlar eritroid öncüllerin farklılaşması, dolaşıma salınması ve hücresel düzeyde

hemoglobin sentezinin uyarılmasıdır. EPO reseptörü ilk kez 1987 yılında Sawyer ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Eritropoetin reseptörünün interlokin reseptörleri, koloni stimule edici faktör reseptörleri ve growth hormon ve prolaktin reseptörleri gibi başka reseptörlerle benzer özellikte olduğu gösterilmiştir (38,39).

Eritropoetinin fonksiyonu, hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanmasıyla başlar ve reseptör aracılığı ile endositoz gerçekleşir. Bu EPO-reseptör kompleksinin varlığında eritropoetin, kemik iliğinde eritroid progenitor hücreleri aktive etmektedir. Aktive olan progenitor hücreler gelişimlerini sürdürerek olgunlaşmış eritrositlere dönüşürler. Eritropoetinin yokluğunda ise parçalanır ve ölürler. Ayrıca terminal dönemdeki böbrek yetmezlikli hastalara verildiğinde megakaryositopoezise neden olarak trombosit sayısını artırır (38,39).

Doku hipoksisine neden olan hastalıklar varlığında serum eritropoetin düzeyinde yükselme olur. Doku hipoksisi, artan eritroid seri ile düzelince serum eritropoetin değerleri negatif feedback ile baskılanır. Serum eritropoetin değerleri ayrıca sirkadiyan ritm ve farmakolojik modülasyondan da etkilenir. Eritropoetin düzeyleri akşama göre sabahları düşme eğilimindedir ve teofilin ile azalabilir (36).

Eritropoetin, ilk kez kronik böbrek yetmezliği olan hemodiyalize giren hastalarda anemiyi düzeltmek için kullanılmıştır. Daha sonra yapılan araştırmalarla pek çok alanda kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu endikasyonlar arasında prematüre anemisi, kronik hastalık anemisi (romatoid artrit, AIDS, kansere bağlı anemilerde) ve otolog kan tranfüzyonu sayılabilir.

Eritropoetin ile ilgili araştırmalar sonucu, eritropoetin reseptörlerinin rat ve insan endotel hücrelerinde, nöronlarda, splenik hücrelerde, kardiomyositlerde bulunduğu gözlenmiştir (40,41,42,43). Ayrıca eritropoetin reseptörlerinin fetal dönemde (8 ve 16 haftalık fetüslerde) gastrointestinal sistem enterosit hücrelerinde bulunmasının, neonatal dönemde gastrointestinal traktın büyüme ve gelişmesini sağladığı yönünde deneysel

alışmalar mevcuttur. İnsan sütünde eritropoetin varlığı bunu desteklemektedir. Anne sütünde bulunan eritropoetinın gastrointestinal kanalı koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir.

Kronik böbrek yetmezliği nedeniyle dialize giren hastalara verilen eritropoetin, pozitif nitrojen dengesi sağlamaktadır (44,45). Bunlar eritropoetinın anabolik etkilerini göstermektedir. Anabolik etkilerinin büyüme hormonu gibi olduğu düşünülmektedir.

Özetle EPO, serbest radikallerinin oluşumunda gerekli serum demirinin dolaşımdan uzaklaştırılmasını sağlar. NO aracılığı ile oluşan serbest radikalleri baskılar veya toksisitelerini ortadan kaldırır. Ayrıca peritoneal makrofajların pasifikasyonunu sağlayarak proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını ve inflamatuvar etkilerini baskılar.

III. YÖNTEM VE GEREÇ

3.1 Deney Grupları ve Çalışma Tasarımı:

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 7. Cerrahi Kliniği tarafından düzenlenen bu çalışma; Hacettepe Üniversitesi etik kurulu izniyle Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretme ve Deneysel Çalışma Merkezinde yapıldı (Protokol No: 2007149). Glutasyon, Nitrik oksit ve Malondialdehit ölçümleri Hacettepe Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümünde, dokuların histolojik incelemesi Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümünde, serum enzim ve bilirubin düzeyi ölçümleri de Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Bölümünde yapıldı.

Çalışmada 29 adet Wistar Albino tipi dişi rat kullanıldı. Ratların ağırlığı ortalama 242 (234-250) gr olarak ölçüldü. Ratların tamamı çalışma gününe kadar standart rat diyeti (chow) ve içme suyu ile beslendi. Çalışmadan bir gece önce aç bırakıldı.

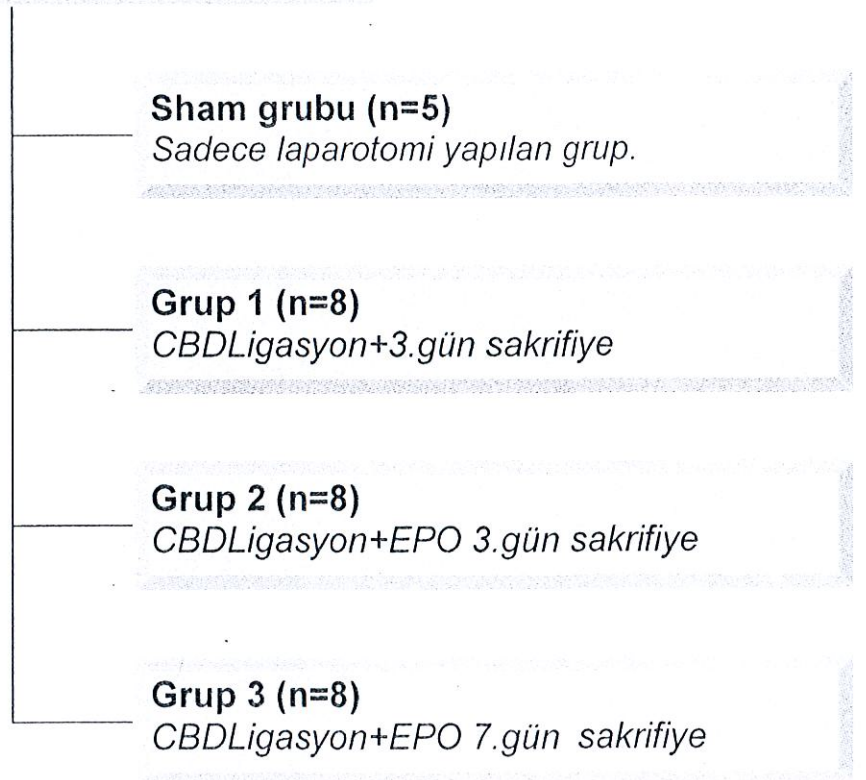
Cerrahi İşlem

Çalışma günü ratlara topikal Betadine solüsyonu ile antisepsiyi takiben intraperitoneal olarak 50 mg/kg Ketamin hidroklorid (*Ketalar®*, Parke Davis, Levent-İstanbul, Türkiye) ve 2 mg/kg Ksilazin (*Rhompun®*, Bayer Türk Kimya, Şişli-İstanbul, Türkiye) karışımı ile anestezi sağlandı. Karın ön duvarındaki tüyler tıraş edildikten sonra Betadine ile boyandı. Steril şartlarda orta hat kesisi ile karına girildi. Sham grubundaki 5 rata sadece laparotomi yapıldı. 3 ana alt gruba ayrılan ratlara laparotomi sonrası ortak safra kanalı bulunarak orta 1/3 kesiminden 5/0 prolene ile ana safra kanalı ligasyonu (CBD ligasyonu) yapıldı. Tüm ratlara yaklaşık 10 cc serum fizyolojik intraperitoneal

yolla verilerek sıvı kayıpları karşılandı. Karın tabakaları 4/0 ipekle çift kat olarak devamlı sütürlerle kapatıldı. Grupların dağılımı ve yapılan işlemler aşağıda gösterilmiştir (Şekil-12). Ratlar tüm bu işlemler süresince oda sıcaklığında bekletildi. Grup 1'e EPO uygulanmadı. Grup 1'deki ratlar CBD ligasyon sonrası 3. gün genel anestezi altında kardiyak ponksiyon ile sakrifiye edildi. Grup 2 ve 3'teki ratlara 500 IU/kg/gün EPO uygulanarak 3. ve 7. günlerde genel anestezi altında kardiyak ponksiyon ile sakrifikasyon uygulandı.

Deneyel Tıkanma Sarılığında EPO 'nin Oksidatif Stres ve Hepatik Hasar Üzerine Etkinliği

Wistar Albino Rat (n=29)



Şekil-12

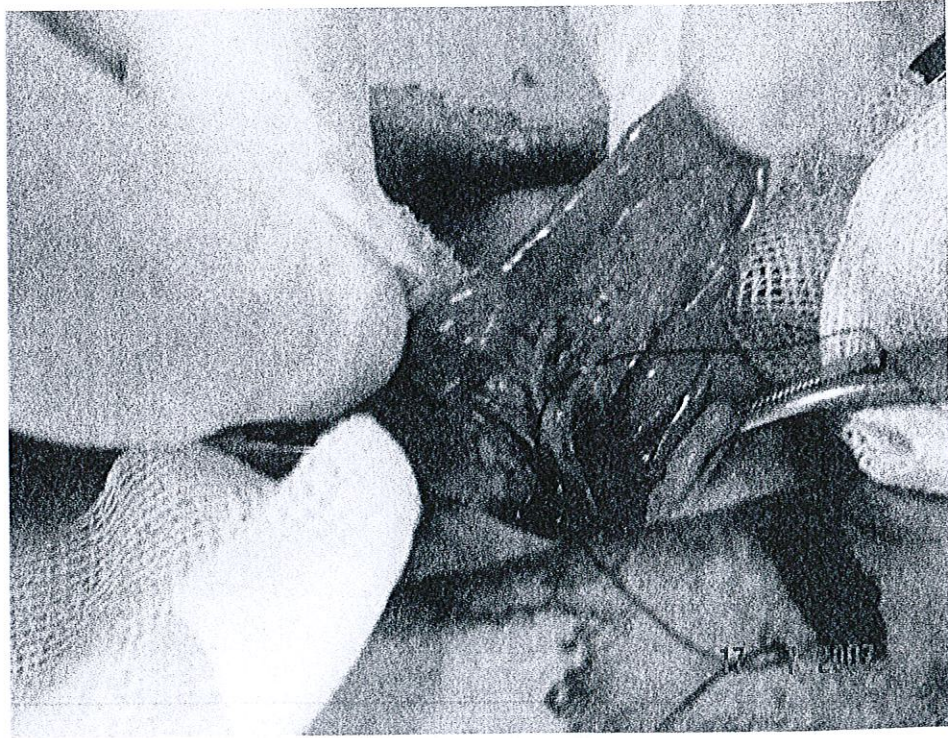
Gruplar:

Sham grubu (n=5): Sadece laparotomi yapılan grup.

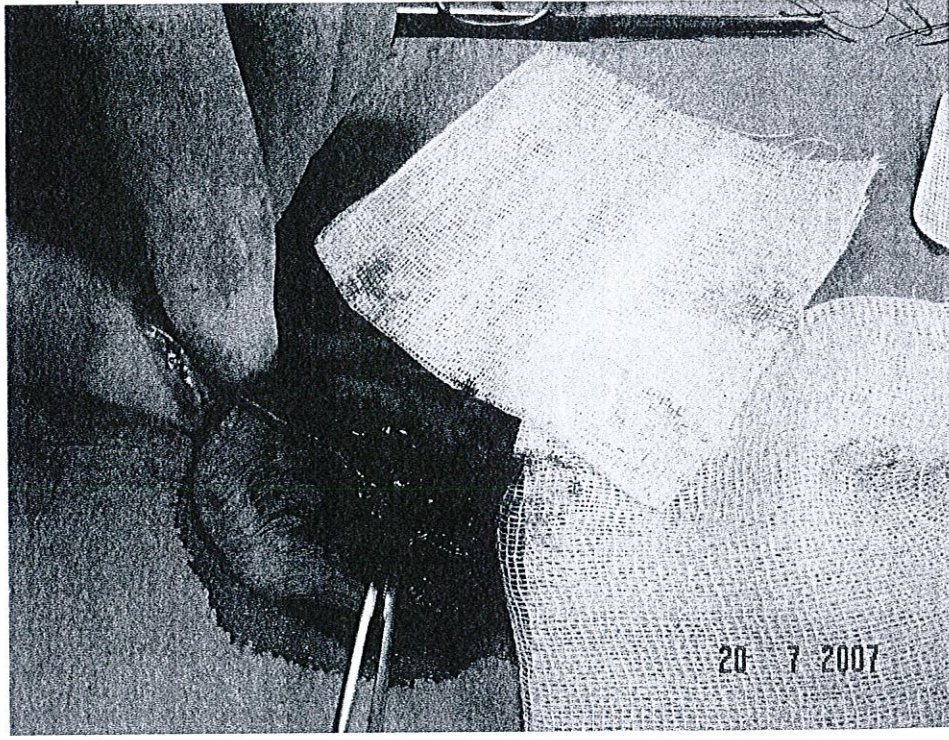
Grup 1 (n=8): Ortak safra kanalı ligate edildikten sonra 3.gün sakrifiye edilerek kan ve doku örnekleri alınan grup.

Grup 2 (n=8): Ortak safra kanalı ligate edildikten sonra eritropoetin verilen ve 3.gün sakrifiye edilerek kan ve doku örnekleri alınan grup.

Grup 3 (n=8): Ortak safra kanalı ligate edildikten sonra eritropoetin verilen ve 7.gün sakrifiye edilerek kan ve doku örnekleri alınan grup.



Resim 2. Ana safra kanalı ligasyonu



Resim 3: Genişlemiş safra kanalı

3.2 Biyokimyasal Analiz

Kan örnekleri kardiyak ponksiyon ile alındı. Alınan 6 ml kanın, 3 ml'si ALP, Total Bilirubin, Direk Bilirubin, İndirgenmiş Glutasyon (GSH) ve Nitrik oksit (NO) ölçümleri için cam tüplere, 2 ml'si beyaz küre ve hematokrit ölçümleri için EDTA'lı tüplere, kalan 1 ml'si de MDA tayini için özel solüsyon eklenmiş cam tüplere kondu. Biyokimyasal analizler, GSH ve NO için ayrılan 3 ml kan hemen 3000rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek serum ve plazması ayrıldı. Biyokimyasal parametreler çalışıldıktan sonra plazma, GSH ve MDA daha sonra çalışılmak üzere -20 °C'de saklandı. NO için ayrılan kan örneği de -20 °C'de saklandı.

3.2.1 Serum Enzim ve Bilirubin Ölçümü:

3 ml kan santrifüj edildikten sonra plazmaları ayrıldı ve serum total bilirubin, direk bilirubin ve indirek bilirubin spektrofotometrik yöntemle (*Hitachi Mod.912, Boehringer-Mannheim*) çalışıldı.

3.2.2 Serum Malondialdehit (MDA) Ölçümü:

Wade ve Van Rij'nin tanımlamış olduğu yöntem kullanıldı (uM TBARS) (46). Bu yöntem MDA 'nın tiobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonu sonucu oluşan ürünün fluorometrik assay ile ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, TBA ile reaksiyona girerek 532 nm de maksimum absorbands veren renkli bir kompleks oluşturur. MDA-TBA kompleksinin 532 nm deki ekstraksiyon katsayısından (1.56×10^{-4} M) yararlanılarak nmol/ ml cinsinden MDA değeri bulunur (46). Ölçümler için gerekli basamaklar aşağıda tarif edilmiştir.

Solüsyonların Hazırlanması:

1-) Karışım Solüsyonu: %15 trikloroasetik asit (TCA) (15gr/100ml), % 0.375 TBA (0.375gr/100), 0.25 N HCl (Hidroklorik asit) hazırlandıktan sonra bu üç solüsyon birbiriyle karıştırıldı.

2-) BTH Solüsyonu: % 0.02lik BTH solüsyonu için 0.02 gr BTH 100 ml %95'lik etanolde çözöldü.

TBA Ölçüm İşlemi: Çalışma süresince alınıp santrifüj edilerek derin dondurucuda saklanan kan örnekleri çözöldükten sonra tekrar santrifüj edilerek serum ve şekilli elamanlar birbirinden ayrıldı. Küçük mikrosantrifüj tüplerine hazırlanan serumlardan 500 µl alındı. Bunun üzerine 1 ml TBA/TCA/HCl karışım solüsyonu eklendi. Vartekslendikten sonra 5 dakika

oda ısısında bekletildi. Mikrosantrifüj tüpleri mikrosantrifüje alınarak 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden elde edilen süpernatantlar cam tüplere alındı. Üzerine 10 ml BHT solüsyonu eklenerek vartekslendi. Tüpler sıkıca kapatıldıktan sonra 15 dakika kaynatıldı. Kaynatma işleminden sonra tüpler çeşme suyunda soğutuldu. Eğer presipitasyon varsa tekrar 5 dakika 10000 rpm'de santrifüj edildi. Sonra örnekler 532 nm'de spektrofotometrik olarak okundu.

Kullanılan Gereçler:

- Mikrosantrifüj: Hermle, 2333 K
- Vorteks: Heidolph REAX 2000
- Isıtıcı: Heto, Maxi-Shake
- Spektrofotometre : Milton-Roy Company Spectronik3000
- ArraySpectronik 3000 Array

3.2.3 Serum indirgenmiş Glutatyon (GSH) Ölçümü:

GSH ölçüm yöntemi Hissin ve Hilfe göre yapıldı (47). 0.5 ml, 1000000xg supernatant, 4.5 ml fosfat-EDTA solüsyonu ile karıştırıldı. Bu karışımın 2 ml'si alınarak 1.8 ml OPT solüsyonu ile birleştirildi. Oda ısısında 15 dakika bekletildikten sonra solüsyon kuartz küvete alındı. 420 nm florösans ile değerlendirildi. Bulunan değerler $\mu\text{mol/gr}$ olarak değerlendirildi.

3.2.4 Serum Nitrik Oksit (Nitrit/Nitrat) Ölçümü:

Nitrit ve nitrat ölçümü Griess reaksiyonuna göre yapıldı (48). Kan örnekleri ayrıldı ve kullanılacağı zamana kadar -80 derecede saklandı. Analiz için nitrat kantitatif olarak nitrite çevrildi. Nitratin nitrite enzimatik redüksiyonunda koenzimler olarak NADPH ve FAD kullanıldı. 7V-1-(naphytanyl)-ethylenediamine dihydrochloride, sulfanilamide ve inkübasyon solüsyonu karıştırıldı. Bu karışım oda ısısında loş ışıktaki 5 dakika inkübe edildi ve 550nm'de ölçüldü. Nitrit için total 1.00 mM sodyum nitrit ve nitrat için 80mM potasyum nitrat kullanıldı (*Nitric Oxide, Colorimetric Assay; Boehringer Mannheim, Cat.No. 1756281, Mannheim, Germany*). Ölçülen değerler nmol/L olarak değerlendirildi.

3.3 Hematolojik Parametrelerin Ölçümü:

Her bir rattan alınan kan örnekleri Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji Ana bilim dalı laboratuvarlarında Beckman-Coulter T-890® ile çalışıldı.

3.4 Histopatolojik Değerlendirme:

Her bir rattan alınan patolojik materyaller örneklemeyi takiben %10 luk formalin ile fikse edildi. Fiksasyonu takiben tartıldı. Makroskopik olarak dikkati çeken inspeksiyon bulguları not edildi ve her bir lobu temsil edecek şekilde totale yakın örnekledi. Tüm örnekler rutin parafin takip aşamalarından geçirildikten sonra 5 µ kalınlığında kesildi ve H&E ile boyandı. Işık mikroskopi ile kör olarak tüm gruplara ait örnekler aşağıdaki histopatolojik parametreler yönünden belirtilen skorlamaya göre değerlendirildi (49,50).

0= Lezyon yok

1= Hafif derecede değişiklik

2= Orta derecede değişiklik

3= İleri derecede (ağır) değişiklik

Karaciğer örneklerinde incelenen histopatolojik parametreler:

- 1) V. Porta dalları ve v. santralisde dilatasyon
- 2) Sinüslerde konjesyon
- 3) Sentrilobuler nekroz
- 4) Portal alanlarda iltihabi hücre infiltrasyonu
- 5) Kupffer hücre proliferasyonu
- 6) Parankimal fokal nekroz

3.5 İstatistiksel Analiz:

Bütün veriler SPSS 12.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) paket programı kullanılarak değerlendirildi. Tüm değerler ortalama mean (SD) olarak gösterildi. Değerlendirme *One-way ANOVA* ve *Tukey posthoc test* kullanılarak yapıldı. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

IV. BULGULAR

4.1 Serum Enzim ve Bilirubin Sonuçları:

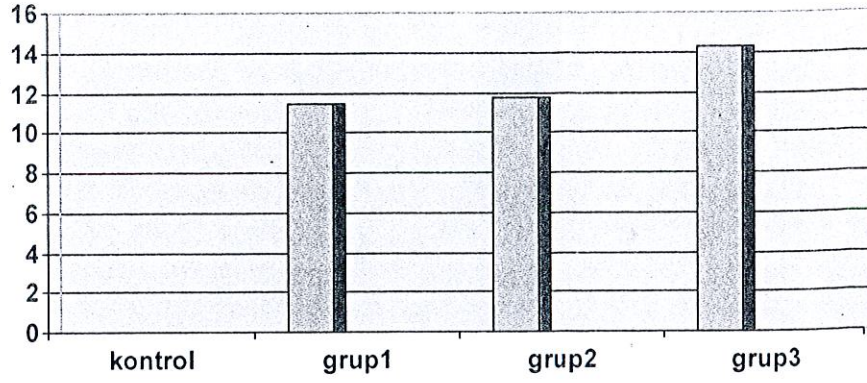
Grupların ortalama serum total bilirubin, direk bilirubin, alkalen fosfataz (ALP) ve beyaz küre değerleri Tablo-3'de verildiği gibidir.

Tablo-3

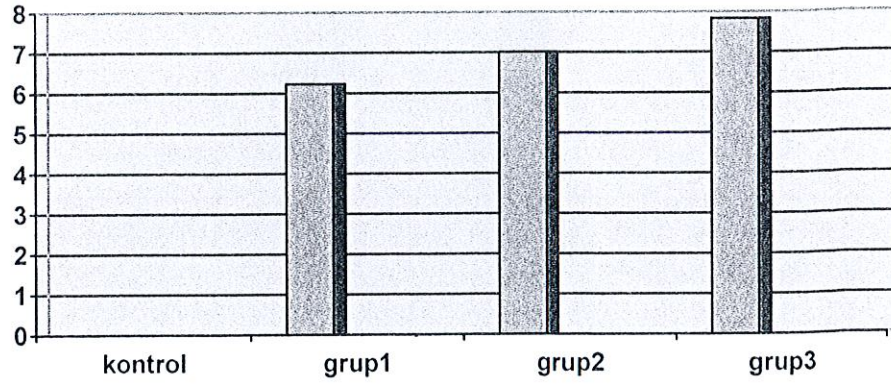
	Total Bilirubin (mg/dl)	Direk Bilirubin (mg/dl)	ALP (U/L)	Beyaz Küre (WBC) (K/uL)
Kontrol	0.02 (0.01)	0.01 (0.0)	307 (77)	2760 (0.34)
Grup I	11.45 (2.03)	6.22 (0.98)	542 (100)	4780 (1.92)
Grup II	11.75 (0.91)	7.01 (1.03)	611 (90)	6387 (1.24)
Grup III	14.31 (2.65)	7.83 (1.48)	737 (90)	12037 (5.47)

Total ve direk bilirubin değerleri açısından sonuçlar birbirine benzer bulunmuştur. Kontrol grubu dışındaki tüm gruplarda ligasyon sonrasında bilirubin değerlerinde belirgin yükselme olduğu izlenmiştir ($p<0.001$). Bu durum deney modelimizin etkin olduğunun kanıtıdır. Her ne kadar EPO alan gruplarda da bilirubin değerleri artmış olarak izlense de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu durum, CBD ligasyon devam ettiği sürece EPO'nun serum bilirubin düzeylerine direk bir etkisinin

olmadığı şeklinde açıklanabilir. Grupların bilirubin değerleri Şekil-13 ve Şekil-14'de gösterilmiştir.

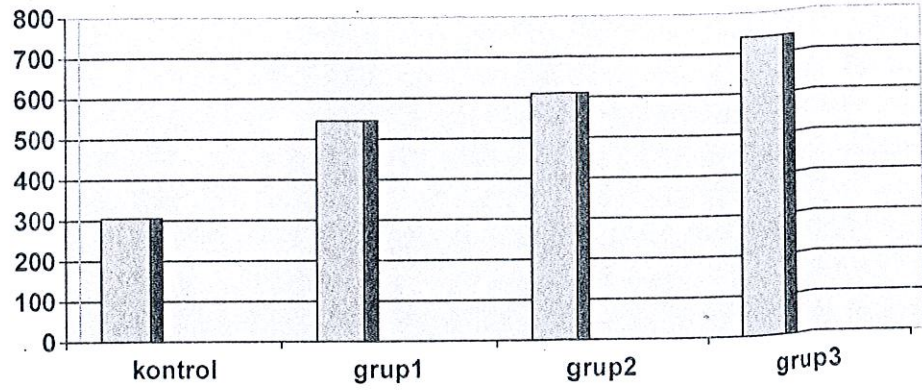


Şekil-13. Total Bilirubin (mg/dl)



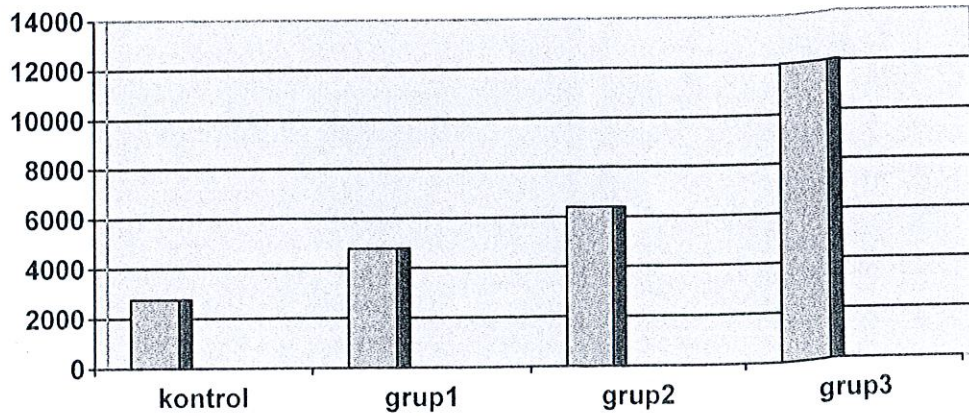
Şekil-14. Direk Bilirubin (mg/dl)

ALP düzeylerine bakıldığında, tüm gruplarda ALP düzeylerinde yükselme olduğu saptandı. Kontrol grubuna kıyasla diğer tüm gruplarda ALP değerlerinde süreye bağlı olarak değişmek üzere belirgin artış olduğu izlendi ($p<0.05$). Grupların ALP değerleri Şekil-15'de gösterilmiştir.



Şekil-15. ALP (U/L)

Beyaz Küre değerleri incelendiğinde kontrol grubuna göre tüm gruplarda sürenin uzaması ile uyumlu olarak belirgin artış olduğu izlendi ($p<0.01$). 3. günde sakrifiye edilen EPO verilen ve verilmeyen gruplar arasında (grup I ve II) ise anlamlı fark saptanmadı ($p=0.95$). Grupların WBC değerleri Şekil-16'da gösterildi.



Şekil-16. Beyaz Küre (K/uL)

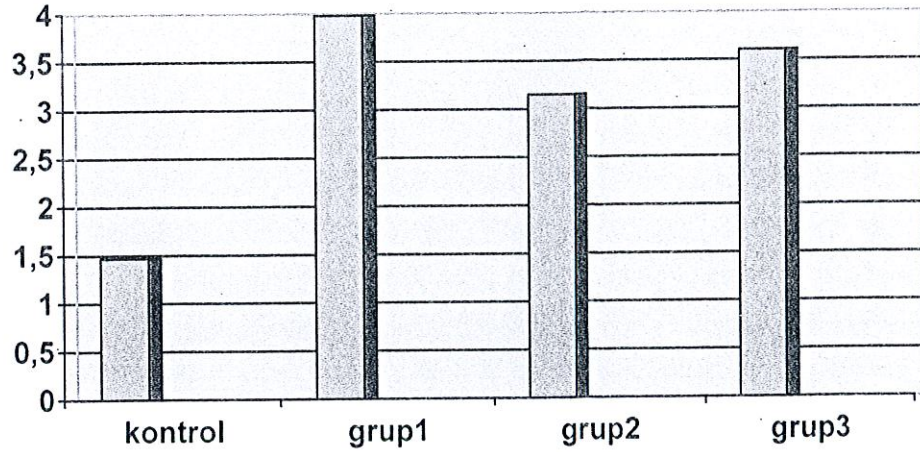
Grupların serum MDA, İndirgenmiş Glutasyon (GSH) ve Nitrik Oksit ortalama değerleri Tablo-4'de özetlenmiştir.

Tablo-4: Serum MDA, İndirgenmiş Glutasyon (GSH) ve Nitrik Oksit ortalama değerleri

	GSH (serum) (umol/g)	MDA (serum) (nmol/ml)	NO (nmol/L)
Kontrol	3.07 (0.28)	1.47 (0.15)	3.75 (0.56)
GrupI	2.08 (0.20)	3.98 (0.31)	15.2 (3.13)
GrupII	2.50 (0.14)	3.15 (0.20)	7.62 (1.16)
GrupIII	2.90 (0.80)	3.60 (0.49)	8.27 (0.48)

4.2 Serum Malondialdehit Sonuçları:

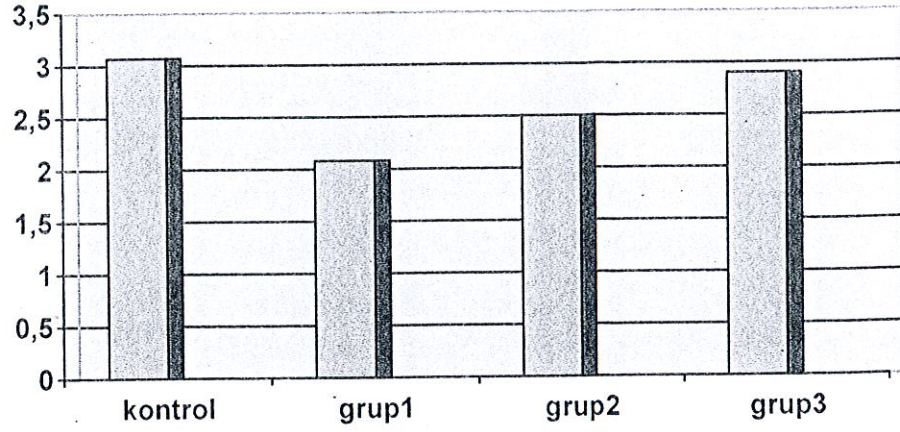
Grupların ortalama serum MDA değerleri Tablo-4'de verildiği gibidir. Kontrol grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.005$). Bütün grupların değerleri sham grubundan daha yüksektir. EPO alan gruplarda MDA düzeyleri almayan gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha düşüktür. Bu durum EPO'nun oksidatif stresi ve dolayısıyla lipid peroksidasyonu azaltması ile açıklanabilir.



Şekil-17. MDA (nmol/ml)

4.3 Serum İndirgenmiş Glutatyon (GSH) Sonuçları

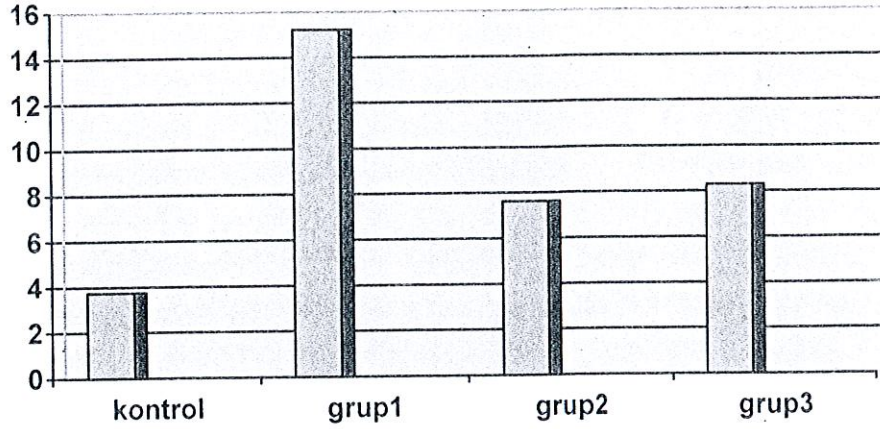
Kontrol grubunun serum GSH düzeyleri grup I'den anlamlı olarak daha yüksektir ($p=0.007$). Buna rağmen kontrol grubu dışındaki gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında grup III 'ün belirgin olarak daha yüksek serum GSH seviyesine sahip olduğu izlendi. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı ($p>0.05$). Ancak EPO almayan grupla karşılaştırıldığında EPO alan gruplarda GSH düzeyleri kontrol grubu değerlerine daha yakındır. Bütün gruplarda GSH düzeyi yüksek olmasına karşın, sadece Grup I ve III arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p=0.049$). Bu durum değerlerin küçük, hayvan sayılarının da az olması ile açıklanabilir. Sonuçlar Şekil-18'de özetlenmiştir.



Şekil-18. GSH (Serum) (μmol/g)

4.4 Serum Nitrik Oksit (NO) Sonuçları:

Serum NO ortalama değerleri Tablo-4'de gösterilmiştir. Tüm gruplarda serum NO düzeylerinin kontrol grubuna göre belirgin ölçüde artmış olduğu izlendi. Gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde CBD ligasyon yapılan grupta, EPO verilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.01$). EPO verilen gruplarda NO düzeyleri daha az yükselme eğiliminde idi.



Şekil19. Nitrik Oksit (nmol/L)

4.5 Histopatolojik değerlendirme sonuçları

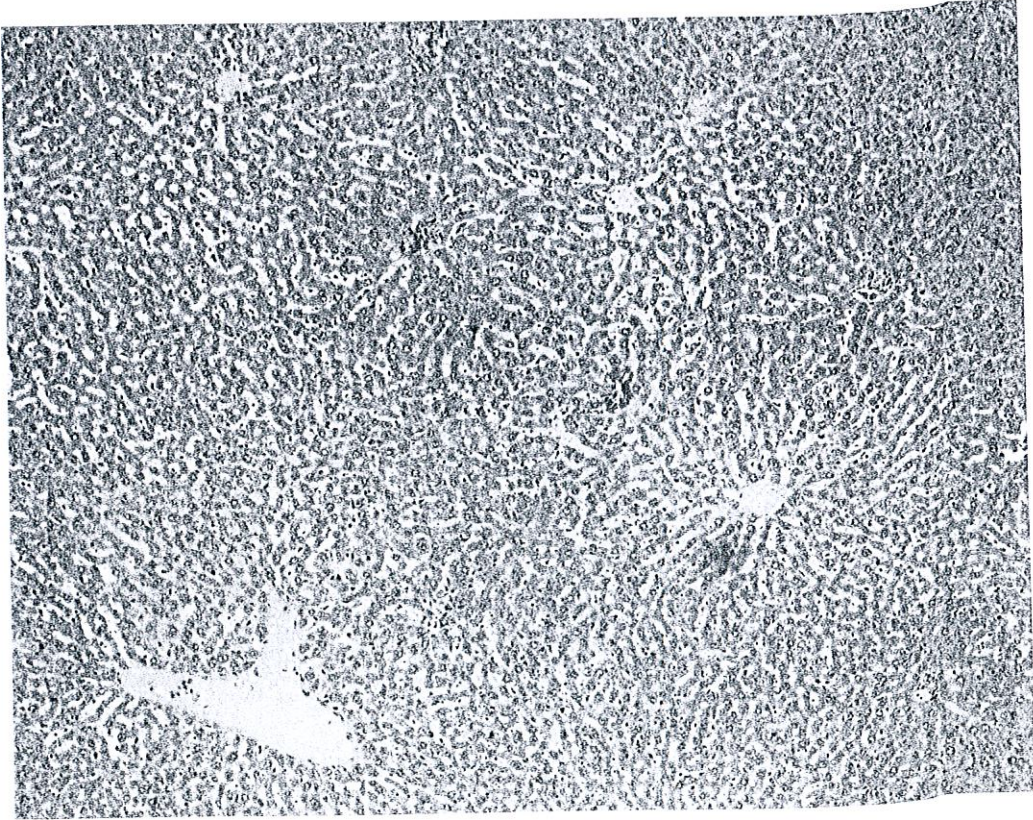
Tüm grupların histopatolojik hasar skorları ortalama (SD) olarak aşağıdaki tablo-5'de gösterilmiştir:

Tablo-5

	v.porta dilatasyon	v.santralis dilatasyon	Sinüslerde konjesyon	Sentrilobüler nekroz	Portal alan iltihabi hücre infiltrasyonu	Kupfer hücre proliferasyon	Parankimal fokal nekroz
Kontr	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
GrupI	1 (0)	2 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1)	0 (0)	0.2 (0.4)
GrupII	1 (0)	3.4 (0.7)	1.1 (0.6)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	0.8 (0.3)
GrupIII	1.1 (0.3)	2.3 (0.4)	1.8 (0.4)	1.8 (0.8)	1.38 (0.5)	0.75 (0.4)	1.6 (0.5)

Tüm gruplar histopatolojik olarak karşılaştırıldığında; v.porta dilatasyonu dışında, tüm gruplardaki histopatolojik parametreler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.001$). V.santralis dilatasyonu

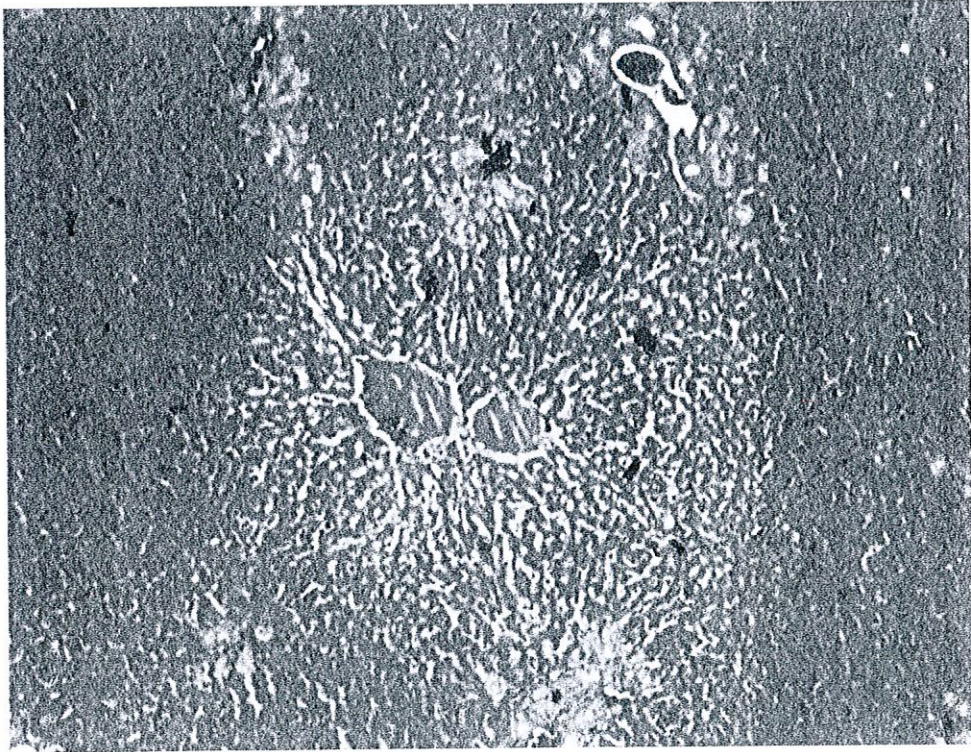
açısından grup II'deki (CBD ligasyon+ EPO) dilatasyonun diğer bütün gruplardan istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha fazla olduğu görüldü ($p<0.005$). Sinüzoidal konjesyon açısından kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı. Kontrol grubunda konjesyon gözlenmezken özellikle grup III'de belirgin ölçüde konjesyon izlendi. Sentrilobüler nekroz açısından bakıldığında, nekroz gözlenmeyen kontrol grubu, grup I ve grup II ile nekroz gözlenen grup III arasındaki fark anlamlıydı ($p<0.05$). Portal alan iltihabı hücre infiltrasyonu açısından değerlendirildiğinde kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi ($p<0.005$). Kontrol grubu dışındaki diğer gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde grup I ile grup II ve III arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.01$). Kupffer hücre proliferasyonu değerlendirildiğinde, kontrol grubu ile grup III arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken ($p<0.003$), yine grup I ve II ile grup III arasında da anlamlı farklılık bulunduğu izlendi ($p=0.001$). Kontrol grubunda grup II ve III'e göre parankimal fokal nekroz anlamlı ölçüde daha azdı ($p<0.05$).



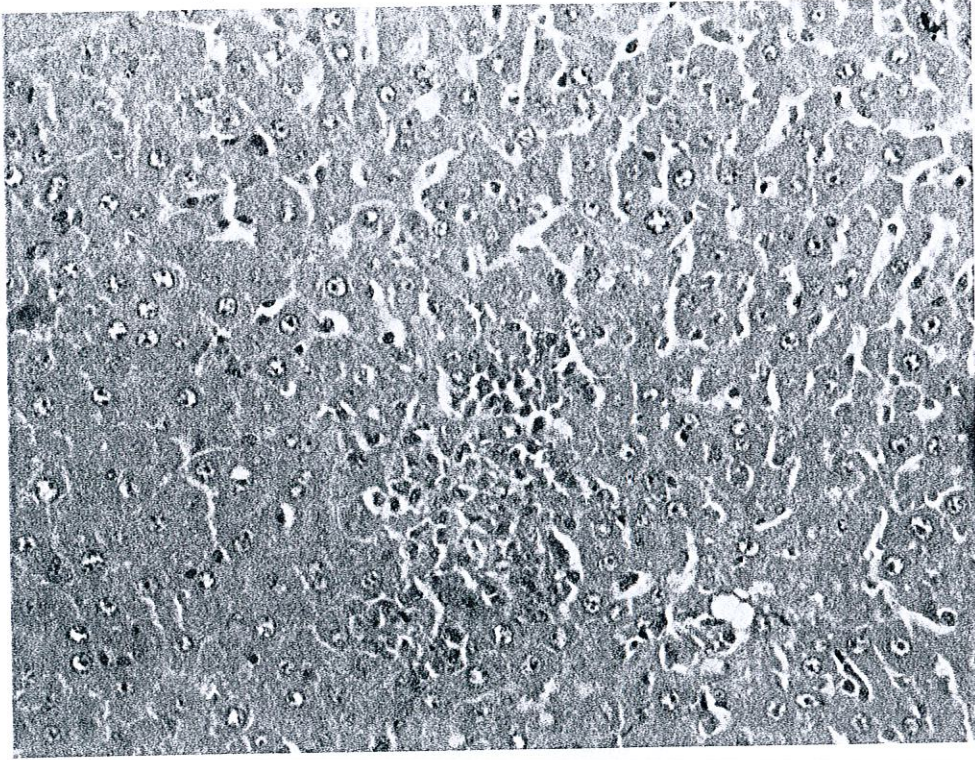
Resim-4: Normal karaciğer (H&E x100)



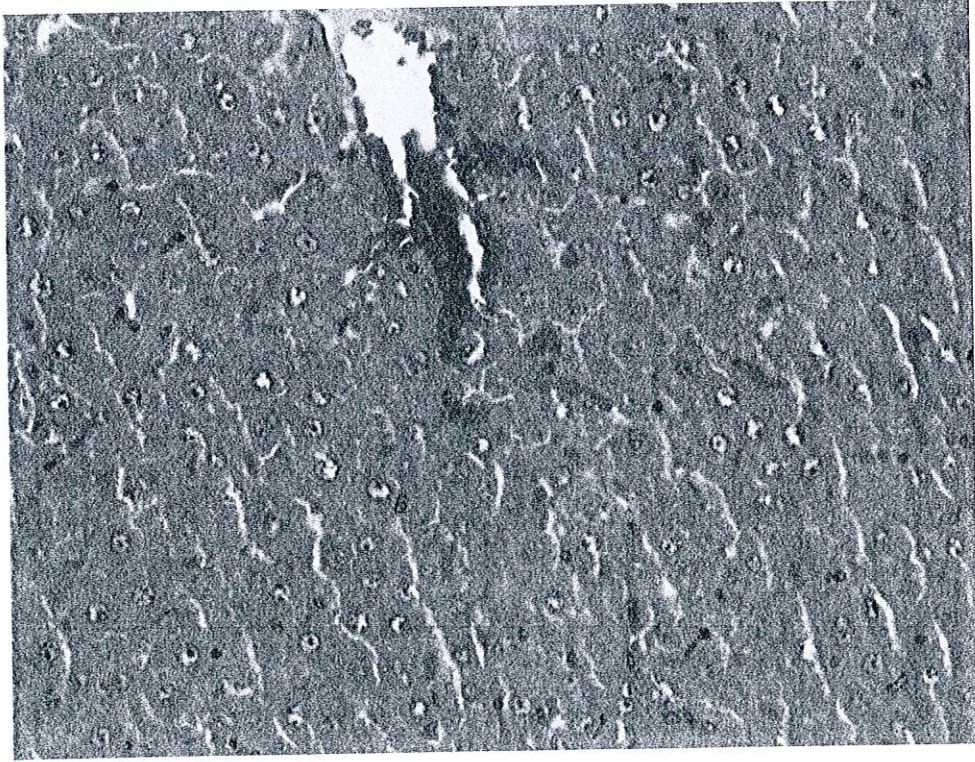
Resim-5: Sentrilobüler nekroz (H&E x 400)



Resim-6: Sinüsoidal dilatasyon ve konjesyon (H&E x 200)



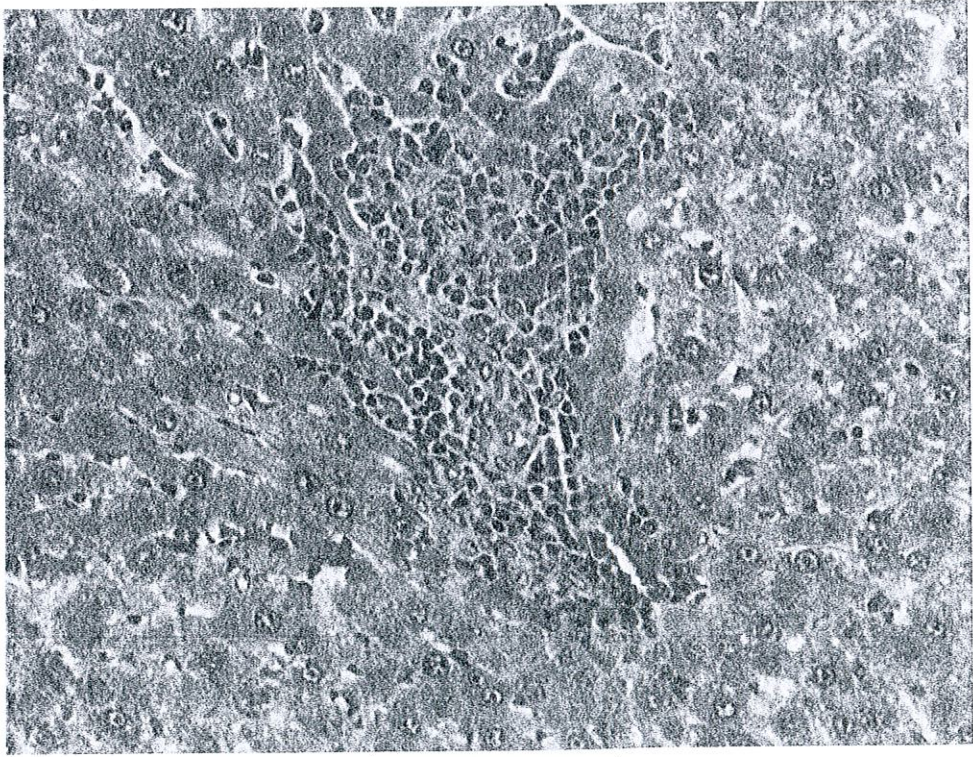
Resim-7: Parankimal fokal nekroz (H&Ex200)



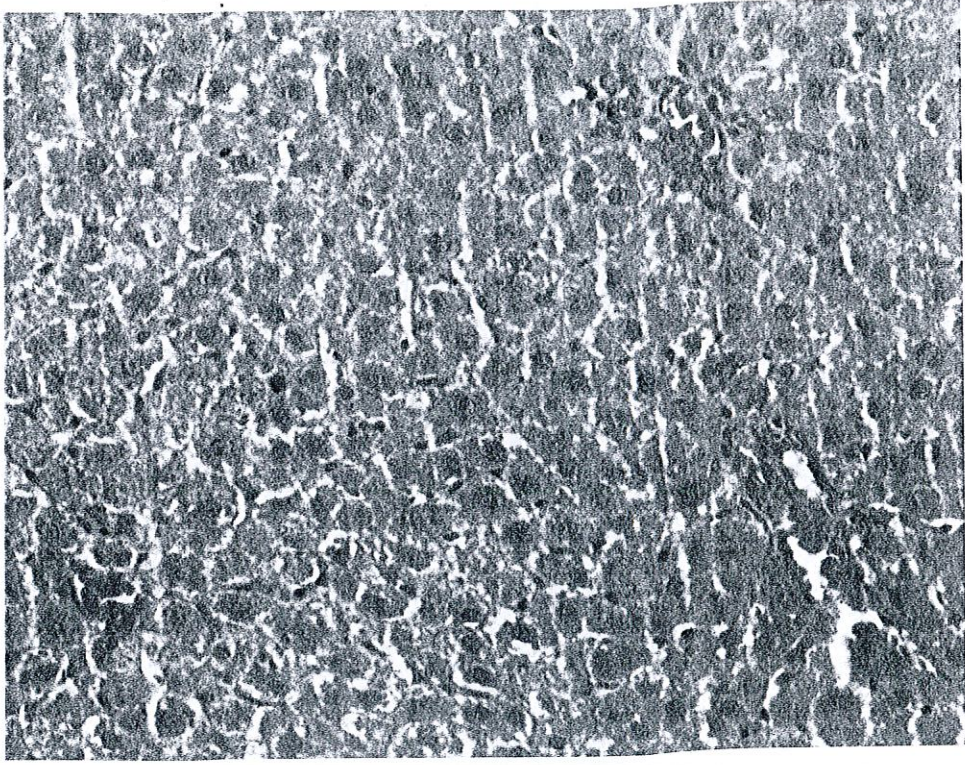
Resim-8: Sinüsoidal dilatasyon ve konjesyon (H&E x 200)



Resim-9: Vena sentralis ve vena porta dilatasyonu (H&E x200)



Resim-10: Portal inflamasyon (H&E x400)



Resim-11: Kupfer hücre hiperplazisi (H&E x400)

V. TARTIŞMA

Tıkanma ikteri ekstra veya intra hepatik safra yollarının kısmi veya tam obstrüksiyonu sonrası, safra retansiyonu ve normal safra akışının bozulması olarak tanımlanır. Karaciğerin yanı sıra, renal sistem, kardiovasküler sistem, koagülasyon kaskadı, immünolojik sistem ve solunum sistemi gibi pek çok organ sisteminde harabiyete yol açan, yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden önemli bir hastalıktır (51,52). Kolestatik karaciğer hastalığı hepatotoksik maddelerin birikimi, mitokondriyal disfonksiyon ve karaciğer antioksidan savunma sisteminin bozulmasıyla karakterizedir (5). Tıkanma ikterinde ortaya çıkan serbest oksijen radikallerine veya antioksidan sistemlerin yetersiz kalmasına bağlı olarak hepatotoksisite görülür. Tıkanma ikterinde ortaya çıkan endotoksemi de direk yolla doku hasarına ve serbest oksijen radikallerinin artmasına neden olmaktadır (3,6). Tıkanma ikterinde hücre içinde fazla miktarda biriken safra tuzları karaciğerde direk etki ile, PMNL ve makrofaj gibi inflamatuvar süreçte rol alan hücrelerden serbest oksijen radikallerinin salgılanmasını sağlayarak hasara neden olur (53,54). Safra tuzları bu etkilerini mitokondriyal elektron transport zinciri üzerine olan negatif etki ile yapmakta ve oksidatif hasar ile sonuçlanan artmış serbest oksijen radikali üretimi oluşturmaktadır (3,6). Aynı zamanda indirek olarak da süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz gibi serbest radikalleri ortadan kaldıran antioksidan özellikteki enzimleri azaltırlar (55).

Normal hücre fizyolojisinin sürdürülmesi sırasında meydana gelen bazı reaksiyonlarda ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri, sistemik pek çok hastalık patofizyolojisinde önemli rol oynayan moleküllerdir. Halen çeşitli organ sistemleri üzerinde oluşturdukları etkiler araştırılmaktadır. Normal şartlarda bazal seviyede oluşan serbest radikaller, antioksidan savunma sistemleri ile ortadan kaldırılabilirler. Ancak tıkanma ikteri gibi serbest

oksijen radikali oluşumunu artırdığı bilinen bir hastalık durumunda antioksidan savunma sistemleri yetersiz kalmaktadır (56). Serbest oksijen radikallerinin hücrede oluşturduğu temel hasarlar, protein denatürasyonu, DNA baz çiftlerinde mutasyonlar ve lipit peroksidasyonudur. Tüm bunların sonucu olarak hücre içi enerji oluşum basamaklarında aksamalar olmakta, hücre membran stabilitesi bozulmakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir (57). Tıkanma ikterinde dokuda artan serbest oksijen radikalleri hücre membranında bulunan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olur. Lipit peroksidasyonu sonucu MDA (malondialdehit) oluşur. MDA oluşumu lipit peroksidasyonunun önemli bir göstergesidir. Tıkanma ikterinde karaciğerde MDA'nın arttığı deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (58). Lipit peroksidasyonunun oluşabilmesi için ortamda mutlak Fe^{+2} iyonunun olması gerekmektedir. Fe^{+2} lipit peroksidasyonu için kofaktör olarak rol oynar. Sonuçta hücre membranının seçici geçirgen özelliği kaybolur. Dolayısıyla hücre içi negatif iyon yükü artar ve hücre hasarı oluşur.

Eritropoetin (EPO) esas olarak eritroid seri üzerine etkili, glikoprotein yapıda . fetal hayatta karaciğerden, daha sonrasında ise normal koşullarda tamamı böbreklerden sentezlenen büyüme hormonudur. Ciddi hipoksi durumunda total eritropoetin % 10'u karaciğerden sentezlenmektedir. Ayrıca EPO reseptörleri eritroid hücreler dışında damar endotel hücrelerinde, karaciğerde, dalakta, beyinde, kalpte, overlerde, testislerde, akciğerlerde ve bazı kanser hücrelerinde tespit edilmiştir (59).

Anabolik yapıda pozitif nitrojen dengesi sağlayan bir hormon olan EPO, hücre içi Ca^{+2} seviyelerini artırarak hücresel stabiliteyi artırır (45). Aynı zamanda serbest radikal oluşumu sırasında ortamda kofaktör olarak bulunması gereken Fe^{+2} iyonunun uzaklaştırılmasını sağlayarak serbest radikal oluşumunu azaltıcı etki gösterir. Eritropoetin ayrıca nitrik oksit (NO) sentezini inhibe ederek de serbest radikal oluşumunu azaltır (60). Ayrıca antiinflamatuvar etki göstererek makrofaj ve PMNL'den inflamatuvar sitokinlerin salınmasını inhibe eder. Fatorous ve ark. yaptıkları çalışmada EPO'nun dokuda anjiyogenezi, fibroblast proliferasyonunu ve kollajen

üretimini artırdığını dolayısıyla yara iyileşmesi üzerine de olumlu etkilerinin bulunduğunu bildirmişlerdir (45).

Eritropoetinin etkinliği ile ilgili intestinal (61) ve nöronal iskemik hasarın araştırıldığı deneysel çalışma modellerinde elde edilen sonuçlarda, EPO'nun NO oluşumunu, dolayısıyla NO aracılığı ile oluşan serbest radikal hasarını azalttığı gösterilmiştir (60). Ayrıca bu çalışmalarda EPO uygulamasının lipit peroksidasyonunun ve serbest oksijen radikali oluşumunun önemli bir göstergesi olan MDA (malondialdehit) seviyesinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir.

Bu bilgilerin ışığında bu tez çalışmasının planlanmasındaki amaç tıkanma ikterinin patofizyolojik mekanizmalarından pek çoğunun EPO'nun etki mekanizmaları ile bağlantılı olup olmadığını ortaya koymaktır. Daha önce yapılmış olan pek çok çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda teorik olarak EPO'nun tıkanma ikteri kliniği üzerine olumlu etkisinin olabileceği düşünülebilir. Deneysel tıkanma ikterinde oluşturulan obstrüktif sarılık modeli (CBD ligasyon), ratlarda ortak safra kanalının bulunmasını takiben, 1/3 orta kısımdan koledok ligasyonunu içermektedir. Bu model daha önce deneysel tıkanma ikteri çalışmalarında kullanılmış, etkinliği ve güvenilirliği tam olan deneysel bir modeldir. Bu deneysel tıkanma ikteri modelinde, obstrüktif sarılık varlığında karaciğer hücre hasarı ve serbest oksijen radikalleri üzerine EPO'nun kısa ve uzun süreli etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bizim çalışmamızda bilirubin değerleri CBD ligasyonuna bağlı olarak oluşan akut kolestaz sonucunda kontrol grubu dışındaki tüm gruplarda artmıştır. Bu durum deney modelimizin etkin olduğunun kanıtıdır. EPO uygulamasının özellikle erken dönemdeki bilirubin seviyelerindeki değişimlere belirgin etki göstermediği saptanmıştır. Her ne kadar EPO alan gruplarda da bilirubin değerleri artmış olarak izlense de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu durum, CBD ligasyon devam ettiği sürece EPO'nun serum bilirubin düzeylerine direk bir etkisinin olmadığı şeklinde açıklanabilir. Ya da uygulanan EPO dozu her hangi bir değişikliği yol açacak düzeyde değildir.

Alkalen fosfataz (ALP), hepatosit plazma membranının bir ektoenzimidir. Bir çok diğer patolojide de yüksek saptanabilir fakat genellikle serum ALP'deki artış karaciğer hücre membranındaki hasar ile ilişkilidir. Çalışmamızda oluşan safra stazına bağlı hepatosit hasarına uygun olarak ALP seviyeleri anlamlı artış göstermiş ve bu artış EPO uygulamasından etkilenmemiştir.

Yapılan çalışmalarda tıkanma sarılığında karaciğer dokusunda ve dolaşımda redukte (indirgenmiş) glutatyon'un (GSH) azaldığı gösterilmiştir. GSH hücre içinde serbest oksijen radikallerini azaltan önemli bir antioksidan maddedir. Tıkanma ikterinde glutatyon okside glutatyona (GSSG) dönüşür. Dokuda okside glutatyon konsantrasyonu artarken GSH oranı azalmaktadır. Dolayısıyla karaciğerde GSH/GSSG oranında düşme olur. Bu oran tıkanma ikterinde oksidatif stresin önemli göstergelerindendir.

Bizim çalışmamızda daha önceki çalışmalara benzer olarak serum GSH düzeyleri tıkanma ikteri gruplarında azalmıştır. EPO uygulanan tıkanma ikteri grubundaki serum GSH düzeyleri, EPO uygulanmayan gruplara oranla kontrol grubu değerlerine daha yakındır. Bu durum, eritropoetinin tıkanma ikterinde ortaya çıkan oksidatif hasarı azalttığı şeklinde ya da antioksidan yapımını artırdığı şeklinde yorumlanabilir.

Lipopolisakkarit ile oluşan endotokseminin neden olduğu hücresel hasar, lipid peroksidasyonunu artırır. Bu da hem hepatik hem de renal hasara yol açar. Kawamira ve ark. tıkanma sarılığında aşırı nitrik oksit sentezi üzerinden artmış lipid peroksidasyonunu ve karaciğer hasarını göstermişlerdir (30). Shiomi ve ark. tıkanma sarılığında lipid peroksidasyonu üzerinden rat karaciğer dokusunda mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna yol açan nitrik oksit üretimini göstermişlerdir (62). Karaciğerde normal fizyolojik olaylar sırasında az miktarda NO oluşur. NO kısa yarı ömürlü serbest radikal özelliğinde bir moleküldür. Organizmada pek çok reaksiyonda rol alarak olumsuz etkilere neden olabilir. Endotoksemi, şok, iskemi, sepsis, enfeksiyon gibi sistemik olaylar sırasında normalden fazla NO sentezlenir ve antioksidan savunma sistemleri yetersiz kalabilir. Çalışmamızdaki nitrik oksit (NO)

düzeyleri incelendiğinde, tüm gruplarda serum NO düzeylerinin kontrol grubuna göre belirgin ölçüde artmış olduğu izlendi. Yalnızca CBD ligasyon yapılan gruba, CBD ligasyon yapıp EPO verilen gruplar arasında belirgin farklılık vardı. Buna göre EPO verilen gruplardaki NO yüksekliği, EPO verilmeyen gruba göre daha azdı. Bu veriler de eritropoetinin, tıkanma ikterinde oluşan oksidatif hasardan sorumlu olduğu bilinen NO düzeylerini olumlu yönde etkilediği şeklinde yorumlanabilir.

Tıkanma ikteri sonrasında karaciğerde lipit peroksidasyonu artmaktadır (58). Malondialdehit (MDA), lipit peroksidasyonu sonucu oluşan polyjenik yağ asitlerinin son ürünüdür ve lipit peroksidasyonu ve oksidatif stresin derecesini gösteren bir belirteçtir. Bizim çalışmamızda, EPO alan gruplarda MDA düzeyleri, almayan gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha düşük saptanmıştır. Bu durum EPO'nun oksidatif stresi ve dolayısıyla lipid peroksidasyonu azaltması şeklinde açıklanabilir.

Sonuç olarak CBD ligasyon ile deneysel obstrüktif sarılık oluşturulan ve eritropoetin verilen ratlarda, NO, MDA, GSH'nun serum düzeyleri ve karaciğer histolojisi üzerinde oluşturduğu değişiklikler incelenmiştir. Tıkanma ikteri sonrası ölçülen NO ve MDA düzeyleri, EPO verilen gruplarda belirgin olarak azalmış, aynı şekilde GSH serum düzeyleri de EPO verilmeyen gruba göre belirgin olarak yüksek saptanmıştır. Tıkanma sarılığı oluşturulan ratlarda hepatik hasarın NO üzerinden gerçekleşen mekanizmalarla olduğu ve eritropoetinin hem NO düzeylerini azaltarak ve hem de antioksidan sistem üzerine etkileriyle Glutasyon düzeylerini artırarak hasarı azaltabileceği gösterilmiştir. Daha uzun süre devam eden sarılık halinde yanıtın nispeten daha kötü olması, EPO uygulamasının belirli aralarla tekrarını ya da dozunun yükseltilmesini gerektirebilir. EPO'nun tüm bu olumlu etkilerine rağmen bu deneysel çalışmadan elde edilebilen sonuçların klinikte uygulanabilmesi için insanlar üzerinde de yapılacak plasebo kontrollü benzer çalışmalara gereksinim vardır...

VI. ÖZET

Giriş ve Amaç: Tıkanma ikteri çeşitli patofizyolojik mekanizmalarla karaciğer hasarına neden olan, mortalitesi ve morbiditesi yüksek bir hastalıktır. Tıkanma ikterinde oluşan değişikliklerde eritropoetin etkisi daha önce değerlendirilmemiştir. Bu tezin amacı deneysel tıkanma sarılığı oluşturulan ratlarda, eritropoetin oksidatif stres, serbest radikaller ve hepatik hasar üzerine olan etkinliğinin araştırılmasıdır.

Yöntem ve Gereç: Ortalama ağırlığı 242 (234-250) gr olan 29 adet Wistar Albino tipi dişi rat, her grupta 8 rat olacak şekilde 3 ana alt gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki 5 rata sadece laparotomi yapıldı. Diğer gruplardaki tüm ratlarda ortak safra kanalı bulunduktan sonra orta 1/3 kesiminden 5/0 prolene ile ligate edildi ve bırakıldı. Grup I'e EPO verilmedi ve bu gruptaki ratlar 3. günde sakrifiye edildi. Grup II ve III'deki ratlara 500 IU/kg/gün EPO uygulanarak 3. ve 7. günlerde genel anestezi altında kardiyak ponksiyon ile sakrifikasyon uygulandı. Alkalen fosfataz (ALP), total ve direk bilirubin, beyaz küre, Nitrik oksit (NO), glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA) ölçümleri için kan örnekleri, histopatolojik inceleme için de karaciğer doku örnekleri alındı. Tüm ölçümler SPSS'e kaydedildi ve *One-way ANOVA* ve *Tukey posthoc* test kullanılarak karşılaştırıldı.

	GSH ($\mu\text{mol/g}$)	MDA (nmol/ml)	NO (nmol/L)
Kontrol	3.07 (0.28)	1.47 (0.15)	3.75 (0.56)
Grup I	2.08 (0.20)	3.98 (0.31)	15.2 (3.13)
Grup II	2.50 (0.14)	3.15 (0.20)	7.62 (1.16)
Grup III	2.90 (0.80)	3.60 (0.49)	8.27 (0.48)

Bulgular: CBD ligasyonu sonrası kontrol grubu dışındaki tüm gruplarda serum MDA ve NO düzeyleri artmış, serum GSH düzeyleri azalmıştır. CBD ligasyon yapılan ve EPO uygulanan grup II ve grup III'deki ratlarda serum GSH düzeyleri, CBD ligasyon yapıp EPO verilmeyen grup I' deki ratlara göre yüksek bulunmuştur. Aynı şekilde serum MDA ve NO düzeyleri EPO uygulanan grupta daha düşük bulunmuştur. ALP, bilirubin ve beyaz küre değerleri kontrol grubu dışında kalan tüm gruplarda yüksek bulunmuştur.

Sonuç ve Yorum: Tıkanma ikteri, karaciğerde oksidatif stresi ve hepatik hasarı artıran bir hastalıktır. EPO'de özellikle NO üzerinden oksidatif stresi azaltan, bilinen pek çok olumlu etkisi olan bir maddedir. CBD ligasyon ile deneysel obstrüktif sarılık oluşturulan ve eritropoetin verilen ratlarda, NO, MDA, GSH' nun serumdaki düzeyleri ve karaciğer histolojisi üzerinde oluşturduğu değişiklikler incelenmiştir. Sonuçta, tıkanma sarılığı oluşturulan ratlarda hepatik hasarın NO üzerinden gerçekleşen mekanizmalarla oluştuğu ve eritropoetin hem NO düzeylerini azaltarak ve hem de antioksidan sistem üzerine etkileriyle Glutatyon düzeylerini artırarak hasarı azaltabileceği gösterilmiştir.

VII. SUMMARY

Background and Aim: Obstructive jaundice is a disease which causes hepatic injury by different pathophysiological mechanisms that can lead a high rate of morbidity and mortality. The relation between many of these physiological mechanisms concerning obstructive jaundice and the mechanisms of Erythropoietin (EPO) activity has not been established yet. The aim of the study is to determine the effect EPO on oxidative stress, free radical formation and hepatic injury caused by induced obstructive jaundice in an experimental model.

Material and Methods: 29 wistar albino type female rats with an average weight of 242 (234-250)gr were divided into 3 groups of 8 rats. Only simple laparotomy was performed in the sham group (n=5). Common bile duct was found and ligated at the middle 1/3 by 5/0 prolene in all study groups. EPO was not applied to the rats in group I and they were all sacrificed on the third day. 500 IU/kg/day EPO was infused to the rats in group II and III and these rats were sacrificed at days 3 and 7 by cardiac puncture under general anesthesia. Blood samples were collected for measurement of nitric oxide (NO), glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), alkaline phosphatase (ALP), total and direct bilirubin and white blood cell counts (WBC) and liver tissue samples are collected for histopathologic examination. All measurements were recorded at SPSS and the results are comparisons were done by using One Way ANOVA and Tukey Posthoc tests.

Results: After the CBD ligation, serum levels of MDA and NO were found increased, while serum GSH levels were found decreased in all groups except the sham group. Serum GSH levels were higher in the groups II and III than in the group I. Similarly serum levels of MDA and NO were also reduced in the groups that had been infused EPO. ALP, bilirubin levels and WBC were found increased in all of the groups except the sham group.

	GSH ($\mu\text{mol/g}$)	MDA (nmol/ml)	NO (nmol/L)
Kontrol	3.07 (0.28)	1.47 (0.15)	3.75 (0.56)
Grup I	2.08 (0.20)	3.98 (0.31)	15.2 (3.13)
Grup II	2.50 (0.14)	3.15 (0.20)	7.62 (1.16)
Grup III	2.90 (0.80)	3.60 (0.49)	8.27 (0.48)

All values are shown as mean (SD).

Conclusion: Obstructive jaundice increases oxidative stress and causes injury in hepatic tissue. EPO is a molecule that has many beneficial effects as reducing oxidative stress particularly through NO. It has been shown that hepatic injury, in the rats with induced obstructive jaundice occurs through the mechanisms concerning NO. It might be concluded that EPO can improve the injury both by reducing NO levels and increasing GSH levels by inducing the antioxidant system.

VIII. KAYNAKLAR

1. Sabiston DC (ed.). Textbook of Surgery 14th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1991
2. İstanbul Tıp Genel Cerrahi, Editör Kalaycı G, 1. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, 2001
3. Sheila Sherlock & James Dooley. Diseases of the Liver And Biliary System. Eleventh Edition
4. Andreoli, Bennet, Carpenter, Plum, Smith. Cecil Essentials of Medicine 3. Baskı, Yüce Yayınları 1997
5. Batman F, Aydınli M. Karaciger Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi. Temel cerrahi kitabı, Editor Sayek I, 3. Baskı, Ankara Günes Kitabevi, 2004
6. Micheal J Zimmer, Seymar I Schwartz, Harold Ellis Maingot'J. Abdominal Operations 1997
7. William C, Meyers R, Scott Jones. Lippincott Company Philadelphia, Disorders of the Biliary System 1990.
8. Gennari R, Alexander W.: Effects of hiperoxia on bacteriel translocation and mortality during gut-derived sepsis. Arch Surg. 1996; 131:57-62
9. Mcphee, Lingappa, Ganong, Lange. Pathophysiology of Disease Third Edition 2000.

10. Tu W, Kitade H, Satoi S, et al. Increased nitric oxide production in hepatocytes is involved in liver dysfunction following obstructive jaundice. *J Surg Res.* 2002; 106:31-36.
11. Dunn CW, Horton JW, Megison SM et al. Contribution of portal systemic shunt to Kupffer cell dysfunction in obstructive jaundice *J Surg Res* 1991;50:234-239.
12. Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 1984;222:1- 15.
13. Champe P.C., Harvey R.A, Lippincott's Biochemistry. Second Edition, Nobel Tip Kitabevi 1997
14. Halliwell B., Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron relation to biology and medicine. Some problems and concept. *Ar. Biochem. Biophys.* 1986;246:501-14
15. Sies H. Oxidative Stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med* 1991; 91 (suppi C) 315-385.
16. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as .biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 1995; 41 1819-1928.
17. Halliwell B. Wasil M, Grootweld M. Biological significant scavenging of the myeloperoxidase- derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid. *FEBS left.* 1987; 213: 15-18.
18. Slater TF. Free Radicals mechanism in tissue Injury *Biochem. J.* 1984; 222: 1-15.
19. Gutteridge JMC. The role of superoxide and hydroxyl radicals in phospholipid peroxidation catalised by iron salts. *FEBS left.* 1982; 150: 454-458.

20. Erdem M, Serbest Radikaller T. Klinikleri Tip. Bil. 1992; 12: 201-206.
21. Bast A, Haenen GRM, Doelman CJA. Oxidants and antioxidants: State of art Am J Med. 1991 Sep 30;91 (3C):2S-13S.
22. Athar M, Abdullah M, Sultana S, Fauler A, Pero R. Free radicals and trace elements. J. Trace El Exp. Med. 1993: 67-73.
23. Murray R.K, JDroper H.H.:Comperative studies on different methods of monoaldehyde detennination.Meth m Enzmol 105:299-305,1984.
24. Halliwell B, Gutteridge JMC: The antioxidant of human extracellular fluids. Arch. Biochem Biophys 1990; 280: 1-8.
25. Maxwell SRJ. Prospects for the use of antioxidant therapies. Drugs 1995; 49:345-61.
26. Konukoglu D, Akcay T. Glutatyon metabolizmasi ve klinik önemi 1995 T. Klin.TipBil. 15:214-218.
27. Harward TRS; Coe. D, Sauba W.W et al. Glutamine preserves gut glutathione levels during intestinal ischemia-reperfusion. 1994 Journal of Surgical Research. 56: 351-355.
28. Witschi A, Reddy S, Stafer B, Lauterburg BH.The systemic availability of oral Glutathione. Eur J Clin Pharmacol. 1992;43 (6):667-9.
29. Knovvles R: Nitric oxide synthesis. Biochem 1993;9:3-6.
30. Kawamira K, Kobayashi F, Kageyama F. Enhanced hepatic lipid it peroxidation in patients with primary biliary cirrhosis.. Am J Gastroenterol 2000;95:3596-601.
31. Liu S, Adcock İM, Old R_w, Baenes Pj, Evans Tw. Lipopolysaccharide treâtment in vivo induces vvidespread tissue expression of inducible

nitric oxide synthase mRNA. *Biochem Biophys res Commun* 1993; 15:1208-13

32. Criado M, Flores O, Ortiz MC, Hidalgo F, Rodriguez-Lopez AM, Eleno N, Atucha NM. Elevated glomerular and blood mononuclear lymphocyte nitric oxide production in rats with chronic bile duct ligation: role of inducible nitric oxide synthase activation. *Hepatology* 1997;26:268-76.
33. Macdougall IC, Eckardt KU. Erythropoietin In: Davison AM, Cameron JS (ed). *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*. Oxford University Press, London, 1998; 1937-44.
34. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf, R, Neill, S D, Kaufman R.J: Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*, 1985, 313: 806-10.
35. McMahon F G, Vargas R Ryan, M Jain AK: Pharmacokinetics and effects of recombinant human erythropoietin after intravenous and subcutaneous injections in healthy volunteers. *Bood* 1990; 76: 1718-22.
36. Imad A, Tabbara: Erythropoietin. *Arch Intern med*/vol 153, Feb 8, 1993; 298-304.
37. Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak L: Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature* 1957; 179: 633-4
38. Sawyer ST, Krantz SB, Goldwasser E: Binding and receptor-mediated endocytosis of erythropoietin in Friend virus-infected erythroid cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 5554-62.

39. D'Andrea AD, Koo JW: Structure and function of the erythropoietin receptor in stable erythropoietin-dependent transfectants. *Contrib Nephrol* 1991; 88: 48-56.
40. De Anagnostu A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT: Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3974-3978.
41. Juul SE, Yachnis AT, Rojiani AM, Christensen RD: Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in developing human brain. *Pediatr Dev Pathol* 1999; 2: 148-158.
42. Dame C, Fahnenstich H, Freitag P, Hofmann D, Abdul-Nour T, Bartmann P, Fandrey J: Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood* 1998, 92: 3218-3225.
43. Wald MR, Borda ES, Sterin-Borda L: Mitogenic effects of erythropoietin on neonatal rat cardiomyocytes: signal transduction pathways. *J Cell Physiol* 1996, 167: 461-468.
44. Fatouros MS, Vekinis G, Bourantas KL, Mylonakis EP, Scopelitou AS, Malamou-Mitsis VD and Kappas AM: Influence of growth factors erythropoietin and granulocyte macrophage colony stimulating factor on mechanical strength and healing of colonic anastomoses in rats. *Eur J Surg* 1999; 165: 986-992.
45. Fatouros MS, Dalekos GN, Mylonakis E, Vekinis G, Kappas AM: Alterations in body weight, breaking strength, and wound healing in wistar rats treated pre-and postoperatively with erythropoietin or granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Evidence of a previously unknown anabolic effect of erythropoietin?. *J Lab Clin Med* 1999; 133: 253-9.
46. Onat; T; Temel Biyokimya. 1995:145.

47. P. J. Hissin, R. Hilf. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Anal. Biochem.* 74 (1976) 214-226.
48. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnock JS, Tannenbaum SR. Analyses of nitrate and nitrite in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;57:131-8.
49. Egawa M, Takeuchi T, Yakamoto Y. Hepatic vascular exclusion as a model for complete and stable hepatic ischemia in dogs. *Eur. Surg. Res.* 1991;23:170-178.
50. Edwards M, Bentley F. Major hepatic resection under total vascular exclusion with extracorporeal veno-venous by-pass. *The Am. Surg.* 1994;60:231-233.
51. Singh S., Shachleton G., Singh E., Chakraborty J., Barley M. Antioxidant defences in the bile duct ligated rat. *Gastroenterology.* 1992, 103: 1625-9.
52. Krahembuhi S, Talos C, Fisher S, Reichen J. Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology.* 1994;19:471-479.
53. Bingöl F., Aydın S., Açıkgöz Ş.: Free Radicals. *Medic Jour of Ank Hosp* 28:2:Supp 1:1-23,1993.
54. Halliwell B. Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: Fact or fiction? *Ann of Neuro Suppl* 32:10-14,1992.
55. Yalçım A.S.: Antioksidanlar. *Klinik Gelişim.* 11:342-346,1998
56. William C, Meyers R, Scott Jones.: *Disorders of the Biliary System*, Philadelphia, J. B: Lippincot, 1990;303-309

57. Jairam R, Palamanda and James P, Kehrer. inhibition.of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver Microsomes. Arch Biochem biophys. 1992; 293: 103-109.
58. Alptekin N, Mehmetçik G, Uysal M, et al. Evidence for oxidatif stress in the hepatic mitochondria of bile duct ligated rats. Pharmacol. Res. 1997;36:243-247.
59. Jones BL. Evidence for erythropoietin as a molecular targeting agent. Seminars in Oncology 2002; 29 (3), suppl 11: 145-154.
60. Sakanaka M, Wen TC, Masuda S, Morishita S, Nagao M, Sasaki R. in vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. ProcNatl Acad Sci USA 1998; 95: 4635-4640.
61. Moran M, Ozmen MM, Duzgun AP, Gok R, Renda N, Seckin S, Coskun F. The effect of erythropoietin on healing of obstructive vs nonobstructive left colonic anastomosis: an experimental study. World J Emerg Surg. 2007 May 15; 2: 13
62. Shiomi M, Wakabayashi Y, Şano T. Nitric oxide suppression reversibly attenuates mitochondrial dysfunction and cholestasis in endotoxemic rat liver. Hepatology 1998;27:108-15.