



T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

FK506 'NIN DENEYSEL HEPATEKTOMİ MODELİNDE
KARACİĞER REJENERASYONU
VE
ANTIOKSİDAN SİSTEMLERİ ETKİSİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. NAHİDE GÜNAY
KAYSERİ 2004



T.C. ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

FK506 'NIN DENEYSEL HEPATEKTOMİ MODELİNDE
KARACİĞER REJENERASYONU
VE
ANTİOKSİDAN SİSTEMLERİN ETKİSİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. NAHİDE GÜNAY

DANIŞMAN
PROF. DR. SABAHATTİN MUHTAROĞLU
KAYSERİ-2004

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	I
TABLO VE RESİM DİZİNİ.....	III
ŞEKİL VE GRAFİK DİZİNİ.....	IV
ÖZET.....	V
SUMMARY.....	VII
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. TAKROLİMUS.....	3
2.1.1. Takrolimusun Farmakodinamik Etkileri.....	3
2.1.2. Takrolimusun Farmakokinetik Özellikleri.....	6
2.1.3. Takrolimus ve Hepatik Etkileri.....	8
2.1.4. Takrolimusun Renal Etkileri.....	8
2.1.5. Takrolimusun Metabolik Etkileri.....	9
2.1.6. Takrolimusun Kardiyovasküler Etkileri.....	10
2.2. KARACİĞER REJENERASYONU.....	11
2.2.1. Karaciğerin Proliferatif Kapasitesi.....	15
2.2.2. Karaciğer Rejenerasyonunun Moleküler Mekanizmaları.....	17
2.3. KARACİĞER BÜYÜMESİNİ DÜZENLEYEN HORMONLAR VE BÜYÜME FAKTÖRLERİ.....	18
2.3.1. Hepatosit Growth Faktör	20
2.3.2. Epidermal Growth Faktör.....	20
2.3.3. Transforming Growth Faktör- α	21
2.3.4. Transforming Growth Faktör- β	21
2.3.5. Tümör Nekrozis Faktör.....	22
2.4. KARACİĞER REJENERASYONUNUN BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLERİ.....	23
2.4.1. Timidin Kinaz.....	23
2.4.2. Ornitin Dekarboksilaz.....	24
2.4.3. Mitotik İndeks ve Karaciğer Ağırlığı.....	25

2.4.4. Hepatik Ekstrasellüler Matriks	27
2.4.5. Adenozin 5'Trifosfat.....	28
2.4.6.Karaciğer Rejenerasyon Oranı.....	29
2.5. GİNKGO BİLOBA EKSTRESİ.....	29
2.6. ANTİOKSİDAN ENZİM SİSTEMİ VE SERBEST RADİKALLER.....	31
2.6.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Fizyolojik Fonsiyonları.....	31
2.6.2. Süperoksid Dismutaz (SOD).....	36
2.6.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx).....	37
2.6.4. Glutasyon Redüktaz.....	38
2.6.5. Miyeloperoksidaz.....	39
2.6.6. Katalaz.....	39
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1. NİSBİ KARACİĞER AĞIRLIĞININ TAYİNİ.....	44
3.2. MİTOTİK İNDEKS TAYİNİ.....	44
3.3. HİSTOPATOLOJİK ANALİZ.....	45
3.4.TİMİDİN KİNAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ.....	45
3.5.SÜPEROKSİDAZ DİSMUTAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ.....	48
3.6.GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ.....	51
3.7.GLUTATYON REDÜKTAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ.....	53
3.8.MİYELOPEROKSİDAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ.....	54
3.9.DOKU MDA TAYİNİ.....	56
3.10. PLAZMA MDA TAYİNİ.....	57
3.11.İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	58
4. BULGULAR.....	59
5. TARTIŞMA.....	73
6. SONUÇLAR.....	87
7. KAYNAKLAR.....	93
8. EKLER.....	116
9. TEZ ONAY SAYFASI.....	121

KISALTMALAR

ALP	: Alkalen Fosfataz
ALT	: Alanin Transaminaz
AP-1	: Aktivatör Protein-1
AST	: Aspartat Transaminaz
ATP	: Adenozin 5'-trifosfat
C-RP	: C Reaktif Proteini
CyA	: Siklosporin
EGF	: Epidermal Growth Faktör
eNOS	: Endotelial Kökenli Nitrik Oksit Sentaz
FGF	: Fibroblast Growth Faktör
FKBPs	: FK506 Bağlayıcı Protein
GGT	: γ -glutamil transferaz
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
Grx	: Glutaredoksinler
GSH	: Redükte Glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
GVHD	: Graft Versus Host Disease
HEM	: Hepatik Ekstrasellüler Matriks
HGF	: Hepatosit Growth Faktör
HSS	: Hepatik Stimulatör Substans
IGF	: İnsülin-Like Growth Faktör
IKK	: I κ B Kinaz Kompleksi
IL-2	: İnterlökin-2
IL-3	: İnterlökin-3
iNOS	: Uyarılabilir Nitrik Oksit Sentaz
KGF	: Keratinosit Growth Faktör
LAK	: Lenfokin Activated Killer
MDA	: Malondialdehid

MPO	: Miyeloperoksidaz
NF-κB	: Nüklear Faktör B inhibitörü
NK	: Naturel Killer
NO	: Nitrik oksit
OD	: Ornitin Dekarboksilaz
PDGF	: Platelet Kökenli Growth Faktör
PH	: Parsiyel Hepatektomi
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
RPM	: Rapamisin
SOD	: Süperoksid Dismutaz
STAT3	: Transkripsiyonun Aktivatör Ve Transdüksyon Sinyal
T ₃	: Tri-iodo Treonin
TBARS	: Tiobarbitürik Assay Substans
TGF	: Transforming Growth Faktör
TGF-β	: Transforming Growth Faktör-Beta
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör-Alfa
TxCAD	: Transplant İlişkili Koroner Arter Hastalığı
TK	: Timidin Kinaz

TABLO VE RESİM DİZİNİ

Tablo I.Karaciğer Hücre Proliferasyonunu Değerlendirmede Kullanılan Belirteç ve Metodlar.....	17
Tablo II. Karaciğer Büyümesini Düzenleyen Hormonlar Ve Büyüme Faktörleri.....	19
Tablo III. Hepatik Rejenerasyon Sırasında Büyümeyi Uyaran Faktörler.....	19
Tablo IV Temel ROT Molekülleri ve Metabolizmaları.....	36
Tablo V.Süperoksid Dismutaz Aktivitesi Tayininde Standart Hazırlama Prosedürü..	49
Tablo VI. Süperoksid Dismutaz Aktivite Tayini Çalışma Prosedürü.....	50
Tablo VII. Glutasyon Peroksidaz Tayini Çalışma Prosedürü.....	52
Tablo VIII. Miyeloperoksidaz Çalışma Prosedürü.....	55
Tablo IX. Rat ağırlıkları.....	60
Tablo X. Rejenerasyon Parametreleri.....	62
Tablo XI. Rutin Biyokimya Parametreleri.....	65
Tablo XII. Antioksidan Enzim Parametreleri.....	71
Resim I. Normal rat karaciğerinin hepatektomi öncesi ve 2/3 parsiyel hepatektomi sonrası 48.saatte makroskopik görünümü.....	15
Resim II. Wistar Albino Erkek Rat.....	43
Resim III. Kontrol grubu karaciğer dokusu mikroskopik görünümü.....	63
Resim IV. Egb+hep grubu karaciğer dokusu mikroskopik görünümü.....	63
Resim V. FK506+hep grubu karaciğer dokusu mikroskopik görünümü.....	63
Resim VI. Egb+FK+hep grubu karaciğer dokusu mikroskopik görünümü.....	64
Resim V. Sham grubu karaciğer dokusu mikroskobik görünümü.....	64

ŞEKİL VE GRAFİK DİZİNİ

Sekil I. Takrolimus molekül yapısı.....	3
Sekil II. Takrolimus molekülünde kalsinörinin bağlanma bölgesi.....	4
Sekil III. Takrolimusun Muhtemel Nöroprotektif Etkisi.....	5
Sekil IV. Hücre Siklus Dönemlerine Göre Kc Rejenerasyonunu Düzenleyen Faktörler.....	14
Şekil V. Şekil Hücre Siklusunun Fazları.....	16
Şekil VI. Ornitin Dekarboksilaz İle Putresin Oluşumu Denklemi.....	25
Şekil VII. Enerji Değişimi Formülü.....	28
Şekil VIII. Flavinoid glikozid ve Terpen laktonunun moleküler yapıları.....	31
Şekil IX. Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidanlar.....	35
Şekil X. Myeloperoksidaz Reaksiyon Denklemi.....	39
Şekil XI. Rat Karaciğer Anatomisi.....	43
Şekil XII. Rat Hepatektomi Modeli.....	44
Grafik I. Timidin Kinaz Standart Eğrisi.....	48
Grafik II. Süperoksid Dismutaz Standart Eğrisi.....	51
Grafik III. MDA Standart Eğrisi.....	57
Grafik IV. Ratların sakrifikasyon anındaki total kc ağırlıklarının karşılaştırılması...	60
Grafik V. Timidin kinaz değerlerinin karşılaştırılması	61
Grafik VI. Mitotik indeks ve rejenerasyon oranlarının gruplar arası Karşılaştırılması.....	62
Grafik VII. AST ve ALT değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	66
Grafik VIII. Alkalen fosfataz değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması	67
Grafik IX. Total protein değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	67
Grafik X. Ürik asit değerlerinin gruplar arası karşılaştırması.....	68
Grafik XI. Kolesterol ve trigliserid düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	69
Grafik XII. Miyeloperoksidaz doku ve plazma değerlerinin karşılaştırılması.....	70
Grafik XIII. TBARS düzeylerinin karşılaştırılması.....	71
Grafik XIV. Mitotik indeks ve TK korelasyon Eğrisi.....	72
Grafik XV. Rejenerasyon oranı ve MPO korelasyon Eğrisi.....	72

ÖZET

İmmünsüpresan bir ajan olan Takrolimus (FK506)'un iskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarlanmasında koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, FK506'nın ve bir serbest radikal yakalayıcısı olan EGb761'in, oksidatif stresini azaltma yoluyla karaciğer (kc) rejenerasyon sürecine etkisini araştırmayı amaçladık.

Ratlar; sham grubu, kontrol grubu ve hepatektomi yapıp FK506, EGb761 ve bunların kombinasyonunun verildiği gruplar olmak üzere beşe ayrıldı. Ölçülen parametreler için spektrofotometrik, histolojik ve radioimmünoassay metodları kullanıldı.

Karaciğer rejenerasyonu; timidin kinaz (TK), mitotik indeks ve rejenerasyon hızı üzerinden değerlendirildi. Rezeksiyon sonrası antioksidan sistemdeki değişim; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve miyeloperoksidaz (MPO) ile lipid peroksidasyonunun göstergesi olan tiobarbitirik reaktif substans (TBARS) düzeylerinin ölçülmesi ile incelendi.

FK506 verilen grupta TK; sham ve EGb761+FK506 grubuna göre yüksek, rejenerasyon hızı; EGb761 grubundan düşük, mitotik indeks oranları; kontrol ve sham grubundan yüksek, doku MPO; EGb761+FK506 grubundan düşük, plazma MPO; sham grubundan yüksek, plazma TBARS; sham grubundan düşük, EGb761+FK506 grubundan yüksek, doku TBARS; diğer dört gruptan yüksek bulundu.

EGb761 verilen grupta; ıslak kc ağırlığı kontrol grubundan yüksek, TK; sham grubuna göre yüksek, rejenerasyon hızı; diğer üç gruba göre yüksek, mitotik indeks

oranları; sham ve kontrol grubuna göre yüksek, doku MPO; EGb761+FK506 ve kontrol grubundan düşük, plazma MPO; sham grubundan yüksek, doku TBARS; FK506 verilen gruptan düşük, sham grubundan yüksek, plazma TBARS; EGb761+FK506 verilen gruptan düşük, sham grubundan yüksek bulundu.

EGb761 ve FK506 kombinasyonunda TK; FK506 grubuna göre düşük, rejenerasyon hızı; kontrol grubundan yüksek iken EGb761 grubundan düşük, doku MPO; sham, EGb761 ve FK506 gruplarına göre yüksek, plazma MPO; sham grubundan yüksek, plazma TBARS; diğer dört gruptan yüksek, doku TBARS; sham grubundan yüksek iken FK506 grubundan düşük bulundu.

Sonuç olarak; EGb761'in hepatektomide rejeneratif sürece olan olumlu etkisinin, en azından rejeneratif etkisi bilinen FK506 kadar olduğu, birlikte kullanılması durumunda antioksidan ilaç dozunun azaltılması yanında, kortikosteroid gibi destekleyici ilaç gereksinimini de azaltabilir.

Anahtar kelimeler: FK506, Egb761, rejenerasyon, oksidatif stres, timidin kinaz.

LIVER REGENERATION IN THE FK506 EXPERIMENTAL HEPATECTOMY MODEL AND ITS EFFECT ON ANTIOXIDANT SYSTEM

SUMMARY

It has been shown that Takrolimus (FK506), an immunosuppressant agent, has a protective role in the injuries related to ischemia-reperfusion. In this study, we have aimed to find out the effect of FK506 and EGb761, a free radical scavenger, on the liver regeneration process by diminishing the oxidative stress.

The rats have been divided into five groups as sham group, control group, hepatectomy administered FK506, EGb761, and a combination of these. Spektrophometric, histologic and radioimmunoassay methods have been used for the measured parameters.

The liver regeneration has been evaluated according to the thymidine kinase (TK), mitotic index and regeneration speed. The change in the antioxidant system after the resection has been studied measuring the superoxide dismutase (SOD), Glutathion peroxidase (GPx), Glutathion reductase (GR), and thiobarbituric reactive substance level (TBARS), an indicator of myeloperoxidase (MPO) and lipid peroxidation.

In the FK506 administered group, TK has been found higher than sham and EGb761+FK506 group, the regeneration speed lower than EGb761 group, the mitotic index rates higher than control and sham group, tissue MPO, lower than EGb761+FK506 group, plasma MPO higher than sham group, plasma TBARS lower than sham group, higher than EGb761+FK506, tissue TBARS higher than the other four groups.

In the EGb761 administered group, the wet liver weight has been found higher than control group, TK high compared to the sham group, the speed of regeneration higher compared to the other three groups, the mitotic index rates high compared to the sham and control group, tissue MPO, lower than

EGb761+FK506 group, plasma MPO higher than sham group, tissue TBARS, lower than FK506 administered group, higher than sham group, plasma TBARS lower than EGb761+FK506 administered group and higher than sham group.

In the combination of EGb761+FK506, TK has been found low compared to FK506 group, the speed of regeneration higher than the control group but lower than EGb761 group, tissue MPA, high compared to sham, EGb761 and FK506 groups; plasma MPO, higher than sham group; plasma TBARS higher than the other four groups, tissue TBARS, higher than sham group but lower than FK506 group.

As a result, the fact that EGb761 has a positive effect at least as much as FK506, which is known to have regenerative effect, on the hepatectomide regenerative process may decrease, if used together, the need to use the additional drugs such as corticosteroid as well as decrease the antioxidant drug dose.

Key words: FK506, EGb761, regeneration, oxidative stress, thymidine kinase

1.GİRİŞ VE AMAÇ

İmmünsüpresan bir ajan olan ve FK506 olarak da bilinen takrolimusun bir çok kullanım alanı bulunmakla birlikte, organ transplantasyonunda allograft rejeksiyonundan korunmak ve psöriyazis, piyoderma gangrenozum, Behçet hastalığı gibi dermatolojik hastalıkların tedavisi olmak üzere belli başlı iki kullanım alanı vardır (1-5). Takrolimusun kc dahil birçok organda iskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarlanmasına karşı koruyucu etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (6-9).

Karaciğer rejenerasyonun erken fazında, serbest radikal hasarlanması olduğu bilinmekte olup, karaciğer rejenerasyonunun erken fazındaki karaciğer homojenatlarında lipid peroksidasyon bulguları gösterilmiştir (10). Proliferasyon enzimi olan Timidin Kinaz (TK) ile yapılmış çalışmalar bulunmakla birlikte takrolimusun kullanımı ile, kc rejenerasyonuna etkisinin TK ile araştırıldığı bir çalışmaya rastlamadık. Deneysel hepatektomi modelinde; TK, kc rejenerasyon hızı, mitotik indeks değerleri, rejenere kc kütle ölçümü ile rejenerasyonun değerlendirilmesi planlandı. Aynı zamanda takrolimusun antioksidan sistem üzerine etkisi plazma örneklerinde tayin edilen, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), süperoksid dismutaz (SOD), miyeloperoksidaz (MPO) ve doku lipid peroksidasyonu göstergesi olan tiobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) düzeyleri ile değerlendirilmesi ve hepatosit fonksiyonunun göstergeleri olarak total ve direkt bilirubin, AST, ALT, ALP, LDH, GGT, total protein, ürik asit ve lipid profil düzeylerinin araştırılması amaçlandı.

Karaciğer doku hasarında nötrofil infiltrasyon derecesi indirekt olarak MPO aktivitesi ile gösterilebilir. Etkilenen organlarda plazmada malondialdehit (MDA) düzeyi ölçülerek iskemi sonrası nötrofil infiltrasyonu ile lipid peroksidasyonu arasındaki ilişkinin varlığının ortaya konması planlandı (8). Karaciğer ile ilgili eksperimental girişimlerde MDA düzeylerinin arttığı gösterilmiş olup bu artış lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kabul edilmiştir. Rejenerasyonunun ilk 24 saatinde mitokondriyal MDA üretiminde pik şeklinde belirgin bir artış bildirilmiştir. Mitokondri ATP sentezine paralel olarak, kc ağırlığının eski halini alması ile MDA düzeylerinde düşme gözlemlendiği de rapor edilmiştir (10).

Ağır kc hasarı; iskemiye takip eden reperfüzyon, rezeksiyon ve transplantasyon gibi bir çok durumda ortaya çıkabilmektedir. Karaciğerde iskemi-reperfüzyon ile oluşturulan hasarı azaltmaya yönelik çalışmalar bulunmaktadır (6-7). Doku hasarı oluşumunda başlıca sorumlu tutulan serbest radikallerin etkisizleştirilmesinin inflamasyonu azaltıcı ve rejeneratif süreci hızlandırıcı etkiye sahip olduğu bilinmektedir (8). Bu bağlamda çalışmamızda takrolimus ile birlikte bir serbest radikal yakalayıcısı olan EGb761'i kullanmayı planladık. Çalışmamızın ana noktalarından birisi olan FK506 ile birlikte antioksidan bir ajan kullanılmasının, doku oksidatif stresini azaltma yoluyla rejenerasyon sürecine olumlu katkıda bulunup-bulunmayacağının araştırılması da diğer bir hedefimizdi. Literatürde bu iki preparatın birlikte kullanımı ile, kc hasarı üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlayamadık. Dolayısıyla, FK506 ve EGb761'in kombinasyonu ile, kc'de rezeksiyon ile oluşturulmuş hasarı ve rejeneratif süreç üzerine olan etkisini de araştırmayı amaçladık.

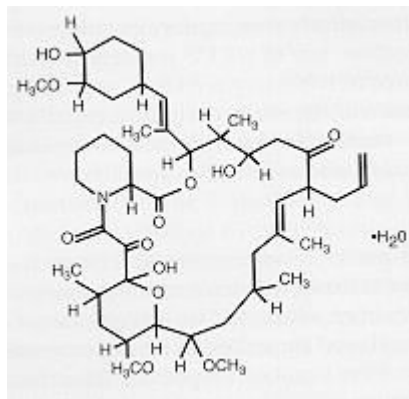
2. GENEL BİLGİLER

2.1. TAKROLİMUS

2.1.1. Takrolimusun Farmakodinamik Etkileri

FK506 olarak da bilinen takrolimus, organ transplantasyonunda allograft rejeksiyonundan korunmak için kullanılan bir makrolid immünsüpresandır (2-4) (Şekil I). Karaciğer dahil birçok organda iskemi reperfüzyona bağlı hasarlanmaya karşı koruyucu etki göstermektedir (5-8).

Takrolimus ke proliferasyonunu; interlökin-2 (IL-2) oluşumunu ve natürel killer (NK) hücre aktivitesini baskılayarak stimüle etmektedir (11).



Şekil I . Takrolimus molekül yapısı

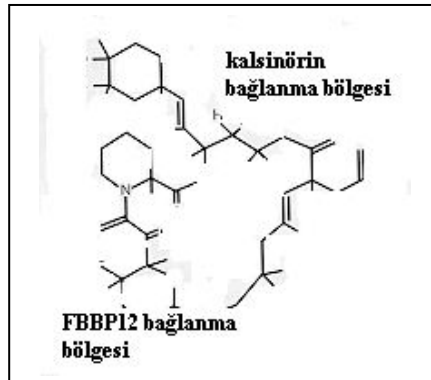
Streptomyces tsukubaensis'den izole edilen takrolimus inflamasyon sırasında nötrofilleri regüle eden mikst lenfosit reaksiyonunun ve T lenfositler tarafından İnterlökin-2 (IL-2), interlökin-3 (IL-3), interlökin-4 (IL-4), interlökin-5 (IL-5),

gama-interferon, Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) salınımının inhibisyonuna neden olur (5-12).

Takrolimus için, farklı ülkeler arasında kabul gören değişik endikasyonlar vardır. Bu endikasyonların başlıcaları; allojenik böbrek ve kc alıcılarında organ rejeksiyonunun profilaksisi, immunsupresif rejimlere rezistan greft rejeksiyon, kemik iliği transplantasyonunda Graft Versus Host Hastalığının (GVHD) primer önlenmesi ve bazı dermatolojik hastalıklardır. Takrolimus ve siklosporinin yapıları farklı iken immünsüpresan etki mekanizmaları benzerdir (13). Bu nedenle takrolimus siklosporine alternatif olarak kullanılmaktadır. Araştırmalarda her iki ilacı temel alan rejimler karşılaştırılmıştır (14-16).

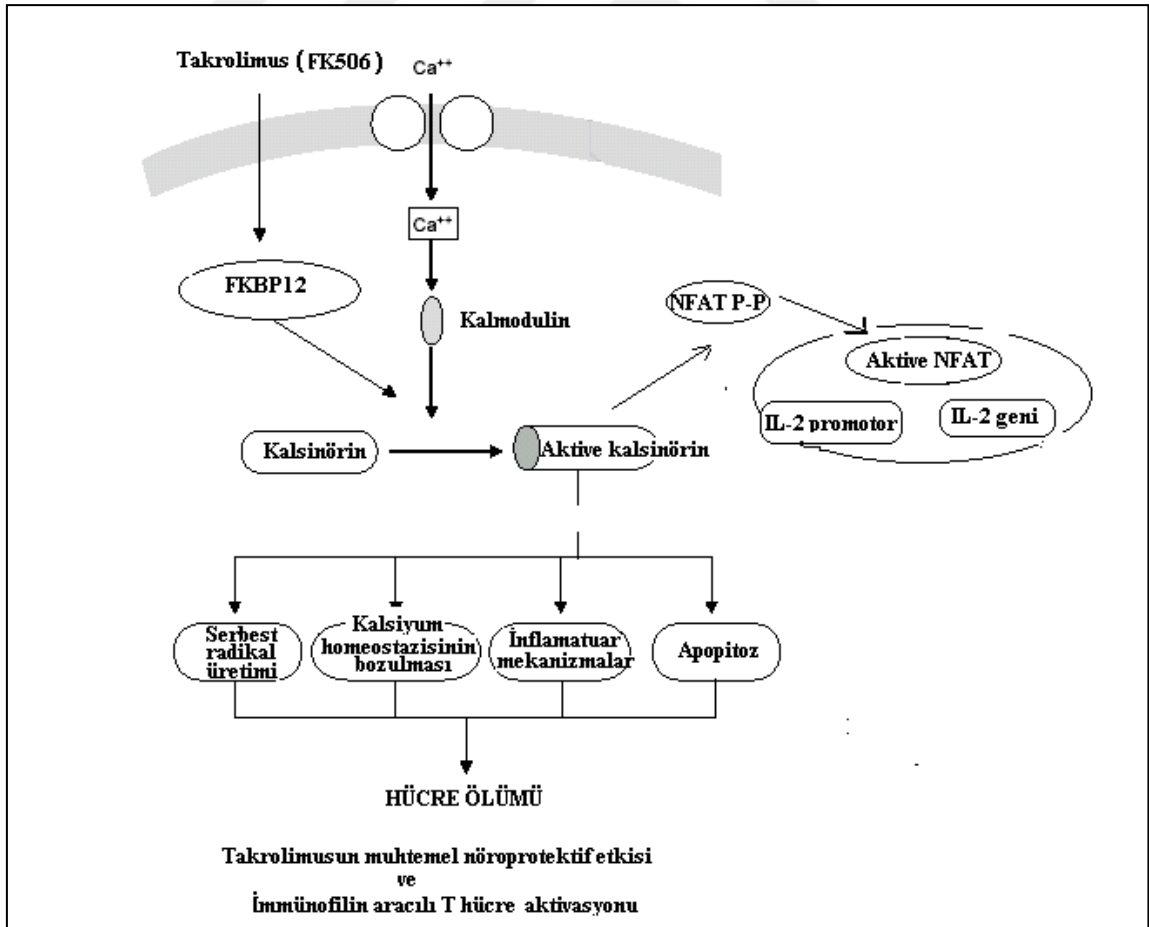
FK506, Ca bağımlı sinyal transdüksiyon yolunu süprese ederek, IL-2'nin aracılık ettiği T helper hücrelerinin proliferasyonunu ilerleterek immünsüpresan özelliğini gösterir (17-21). FK506'nın PH'de hepatosit proliferasyonunu stimüle eden güçlü immünsüpresan olduğu gösterilmiştir (22).

Bu ilaçlar etkilerini immünofilinler olarak adlandırılan, sitokinlerin yeni bir ailesi ile bağlanarak gösterirler (23). Bu yoldaki hız kısıtlayıcı enzimler bir kalsiyum-kalmodülin bağımlı protein fosfataz olan, kalsinörin (fosfataz-2B)'dir. Takrolimus, FK506 bağlayıcı protein (FKBPs) olarak adlandırılan intrasellüler protein ailesinden 12 kD bir immünofilin olan FKBP12'ye bağlanarak kalsinörini inhibe eder. Primer olay; takrolimus ve FK506 bağlayıcı protein (FKBP12)'nin bir kompleks oluşturarak kalsinörine bağlanması ve fosfataz aktivitesini inhibe etmesidir. Geç faz genlerinin transkripsiyonu ise genel olarak etkilenmez (24-26) (Şekil II).



Şekil II. Takrolimusun kalsinörine bağlanma bölgesi

Takrolimus, siklosporinin etki mekanizmasına benzer bir hücreSEL mekanizmaya sahip olmakla birlikte, siklosporinden 1×10^{-1} gibi ufak dozlarda bile, 10 ile 100 kez daha potettir. Schreiber ve arkadaşları FK506'nın spesifik immunofilinler olan kalsinörin ve kalmoduline bağlanıp pentamerik yapıda bir kompleks oluşturduğunu göstermişlerdir. Bu kompleks inositol trifosfat gibi kalsiyum kanalları için yüksek afiniteye sahiptir. DNA replikasyonunu takiben endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımına neden olur. Ayrıca takrolimus serebral iskemi hayvan modelinde nöroprotektif etki de göstermektedir (27,28). Kalıcı iskemi ve reperfüzyon hasarına karşı global ve fokal iskemi modellerinde koruma sağlayan birkaç ajandan biridir (29). Takrolimus, kardiyovasküler ve respiratuvar yan etkiler ortaya çıkarmaz (30) (Şekil III).



Şekil III. Takrolimusun Muhtemel Nöroprotektif Etkisi

Takrolimusun anti iskemik etkisi santral sinir sistemi ile sınırlı değildir. Kalp, kc, akciğer, bağırsak, deri gibi dokuları iskemi–reperfüzyon hasarından koruduğunu gösteren çalışmalar vardır (31,32).

Takrolimus; kalp, kc, deri ve invitro sistemlerde sitokinin etkisini zayıflatır. Doku nötrofil infiltrasyonunu inhibe eder, polimorfonükleer lökositler ve monositlerden serberst radikal üretimini azaltır (33-35).

İnflamatuar sinyal oluşumundaki zayıflama ve buna bağlı doku hasarında azalma takrolimusun anti iskemik aktivitesini belirler (36-38).

2.1.2. Takrolimusun Farmakokinetik Özellikleri

Takrolimusun farmakokinetik özellikleri kişiden kişiye farklılıklar göstermiştir. Takrolimus dozu; kan ilaç konsantrasyonları ve klinik bulgulara göre ayarlanır (39).

Takrolimusun gastrointestinal sistemden emilimi değişkendir ve oral kullanımdan sonra tam absorbsiyon olmaz. Biyoyararlanımı yaklaşık % 20-25’dir. Takrolimusun tam oral biyoyararlanımı için ortalama değerler renal ve kc transplant hastalarında ve sağlıklı gönüllülerde sırayla %17, %22, %18 olup, ortalama biyoyararlanım %25’dir. Kan pik konsantrasyonu oral kullanımdan yaklaşık 2 saat sonra oluşur. Sırasıyla oral olarak 0.2 ve 0.3 mg/kg/gün dozlarda takrolimus alan renal transplant hastalarında C_{max} değerleri 19.2 ve 24.2 $\mu\text{g/L}$ ’dir. İmmünsüpresyon idame periyodu takrolimusda siklosporine göre belirgin olarak kısadır (40).

Takrolimus ve siklosporin klinikte belirgin nefrotoksik etkiye sahip oldukları için kombine edilerek kullanılmazlar. Tipik olarak bir kortikosteroid (Prednizon), bir anti-proliferatif ajan (Azatioprin veya Mycophenolat Mofetil) ve/veya anti-lenfosit antibadi indüksiyon tedavisi Muromonab CB3 (OKT3) yada anti-timosit globulin ile kombine edilerek kullanılır (41).

Pratikte ilaç dozları transplantasyon sonrası yüksek olarak başlanır ve yavaşça aşağı doğru çekilir. Oral takrolimus dozları, kan konsantrasyonu 20 $\mu\text{g/L}$ ’den az olacak şekilde uygulanır (39).

Takrolimus invitro geniş bir etki alanına sahiptir ancak etki mekanizması tam olarak tanımlanmamıştır.

İnterlökin-2 ve T-helper hücreleri tarafından salınan diğer sitokinler immün cevapta önemlidir ve greft rejeksiyonunda rol oynarlar. Takrolimus, T lenfosit aktivasyonu ve IL-2'yi de içeren sitokin genlerinin yazılımını da inhibe ederken, moleküler etkilerin sonucu olarak da hücreyel immün cevabı inhibe eder (42-44). Takrolimus; T hücre proliferasyonunun mitojen ve allojen stimülasyonunu, sitotoksik T hücrelerin çoğalmasını ve mikst lenfosit reaksiyonunu inhibe eder. Hücreyel cevapta anahtar rolü üstlenen T-helper 1 hücreleri tarafından üretilen sitokinler tercihen T-helper2 hücreleri tarafından üretilenleri süprese ederler. Bunlar ise antikor üretimi ve B hücre sitümülasyonu için önemlidirler. Böylelikle T hücre bağımlı B hücre aktivasyonu ve proliferasyonu inhibe edilir. Takrolimus kalsiyum bağımlı B hücre aktivasyonunu inhibe ederek etki yapar (45).

Takrolimus, IL-8 gibi lenfosit kemotaktik faktörlerin üretimini olduğu kadar kemotaksis üzerine de genel bir inhibitör etkiye sahiptir. Takrolimus muhtemelen aktin polimerizasyonu ve hücreyel iskeletin reorganizasyonda protein kinaz C iletimli yolun inhibisyonuyla lenfosit migrasyonunu önler. Takrolimus, IL-2'ye cevapta aktive olmuş T hücrelerinin sekonder proliferasyonunu inhibe etmez, ayrıca naturel killer hücre mononükleer fagositlerin fonksiyonunu da değıştirmez (46).

Takrolimus ve siklosporinin her ikisi de kalsinörin seviyesinde sinyal iletimini baskırlar. Ancak bu etki, FKBP12 ve siklofilin A gibi farklı proteinler ile kompleks oluşturma yoluyla olur (47).

Takrolimus ve siklosporin kardiyak transplantasyon modelinde T-helper2 hücre sitokin gen ifadesinin farklı paternleri ile birliktedir. IL-10, takrolimus tarafından siklosporinden daha fazla oranda inhibe edilirken, siklosporin sadece IL-6'yı suprese eder ve IL-4'ü de artırır. Hücre yüzey belirleyicilerinin, T-helper 1 hücre sitokinlerinin, inflamatuvar sitokinlerin ve sitotoksik faktörlerin gen yazılımı bu iki ilaçla benzerdir. Allogerft rejeksiyonda T-helper 1 hücre aktivasyonunun iyi kurulan bu rolüne karşılık, T-helper 2 hücre sitokinlerinin katkısı ters olmaktadır. Her iki

ilacın da immunosüpresif ve immunositümlatör etkilere sahip olduğu ileri sürülür (47).

Renal transplantasyonda takrolimustan siklosporin tedavisine geçmek CD₄ helper aktivitesini yeniden düzenleyerek, T-helper 1 cevapları, adezyon molekül yazılımı ve baskılayıcı ligandların süpresyonunu sağlar (48). Diğer taraftan Thelper 2 ve monosit cevapları artmış olduğundan siklosporine göre takrolimus ile daha az olarak hümmoral cevap süpresyonu olur. Takrolimusla tedavi edilen kc transplantlı hastalarda invitro T hücre IL-10 sekresyonu belirgin olarak bozulmuştur (49). Takrolimus yada siklosporin monoterapisi alan kc transplantlı hastalarda lenfosit subtipleri dağılımdaki tek belirgin fark siklosporin alan hastaların daha düşük B hücresi (CD19) sayısına sahip olmasıdır (50).

2.1.3. Takrolimus Ve Hepatik Etkileri

Takrolimus hayvanlarda PH'den sonra hepatik rejenerasyon stimölasyonunda organ spesifik etkiye sahiptir. Bu etki muhtemelen IL-2 ve IL-1 α 'nın blokajı, hücre büyüme faktörlerinin düzenlenmesi ile olur. Takrolimusun organ rejenerasyonu parsiyel nefrektomi yada intestinal rezeksiyonda gözlenmemiştir. Takrolimus hayvan modelinde hepatik iskemi ve reperfüzyon hasarını azaltır. Bu etki kısmen sitotoksik reaktif oksijen türlerine (ROT) karşı hücrelerin rezistansının artmasına bağlanabilir (51).

Takrolimus rat hepatositlerinde NF- κ B üzerinden uyarılabilir nitrik oksit sentaz (INOS)'ın indüksiyonunu inhibe eder. İlaç immünsüpresif etkisine ilave olarak nitrik oksit yolunun kontrolü ile de hepatik disfonksiyondan korur (52).

Duodenal reperfüzyon çalışması ile takrolimusun sekonder safra asitleri olan deoksikolik asit ve litokolik asit seviyelerini düşürebileceği tesbit edilmiştir (53).

2.1.4. Takrolimusun Renal Etkileri

Takrolimus da siklosporine benzer olarak nefrotoksisite sebebi olabilir (42). İki ajanın sebep olduğu klinik ve histopatolojik değişiklikler benzerdir. Ancak

takrolimus bağımlı nefrotoksisite fonksiyonel ve yapısal olabilir (53). Fonksiyonel toksisite biyopsi örneklerinde belirgin değişiklikler yapmaksızın glomerül filtrasyon hızında azalma ve vazokonstriksiyon ile birlikte renal disfonksiyon , hipertansiyon, hipomagnezemi ve hiperkalemiyi içerir. Akut yapısal nefrotoksisite sıklıkla bariz tübüler değişiklikler gibi belirti verir. Bunlar kesit prepoaratlarında tübüler hücre sitoplazmasında izometrik vakuolizasyon, dev mitokondri ve mikroklasifikasyon olarak izlenir. Bazı vakalarda mikrovasküler değişiklikler baskındır. Kronik yapısal nefrotoksisite sıklıkla tübülointertisyel hasar, glomerüloskleroz, arteriolar duvarın hiyalin ya da fibromukoid kalınlaşmasını içerir. Takrolimus bağımlı renal vazokonstriksiyon, geçici ve amino asit infüzyonunun vazodilatasyonu stimüle etmesiyle kısmen geri dönüşümlüdür. Takrolimus bağımlı renal vazokonstriksiyon hayvan deneylerinde gösterilmiş olsa da veriler insanlar için sınırlıdır. Bununla birlikte pediatrik renal transplant alıcılarında yapılan çalışmada bariz renal vazokonstriksiyon bulguları görülmemiştir (54).

İmmünsüpresif ve nefrotoksik etkiler takrolimusla ilişkili olarak görülür ve muhtemelen kalsinörin inhibisyonu nedeniyledir. Takrolimus ile renal hasarın muhtemel mekanizması siklik adenozin monofosfatın (cAMP) bağımlı sinyal modülasyonu ve fibroblastlarda NFκB'nin aktivasyonu ve mezengial hücrelerdir. Bu son etki böbreklerde IL-6'nın üretiminde artmaya neden olur. Artmış endotelin seviyesi ve/veya tromboksan A₂ üretimi takrolimus bağımlı renal toksisitenin gelişmesinde ilişkilidir. Bu aynı zamanda TGF-β1'in takrolimus bağımlı hiperekspresyonunun nefrotoksik etkilerinin artmasına yardımcı olduğunu düşündürür (56).

2.1.5. Takrolimusun Metabolik Etkileri

İmmünsüpresif tedavinin diyabetojenik etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Post-transplant diabetes mellitus takrolimusun en ciddi yan etkisidir ve kortikosteroidin eşzamanlı kullanımı ile bu etki şiddetlenir (55). Takrolimusun bazı

hastalarda siklosporinden daha diyabetojenik görülmüştür. Takrolimusun toksik etkileri, pankreasın asiner dokudan daha çok adacık hücrelerinde kalsinörin ve FKBP12'nin selektif yerleşimi ile ilişkilidir. Jindal ve Spencer yaptıkları preklinik bir çalışmada, takrolimusun insülin reseptörleri yada glukagonun üretimini etkilemeksizin transkripsiyon seviyesinde insülin üretimini süprese ettiğini öne sürmüşlerdir (56). Dolayısıyla, insülin sekresyonu azalmakta ve glukoz intoleransı artmaktadır. Hayvan çalışmalarında adacık hücrelerinin morfolojik hasarı rapor edilmiştir ancak takrolimusla tedavisinde bu etki net olarak bilinmemektedir. Takrolimus kc transplanthlı hastalarda β hücresi sekretuar rezervini azaltır, bozulmuş β hücre α hücre ilişkisi ile belirgin insülin rezistansı oluşumuna sebep olur. (57).

Takrolimus verilenlerde siklosporine göre daha düşük total kolesterol, LDL ve/ veya trigliserid seviyeleri gözlenmiştir. Takrolimus tedavisi alan renal transplant hastalarında, siklosporin tedavisi alan hastalara göre LDL oksidasyon eğilimi daha fazladır ve serum antioksidan seviyeleri belirgin olarak düşüktür. Bu sonuçlar standart formülasyonlu siklosporinde LDL'nin oksidasyon eğiliminin arttığını söyleyen çalışmalara karşıttır. Siklosporin ile oluşan bu yan etkinin muhtemel açıklaması antioksidan DL- α -tokoferol eksikliği şeklindedir (58).

2.1.6. Takrolimusun Kardiyovasküler Etkileri

Transplant ilişkili koroner arter hastalığı (vaskülopati; TxCAD) endotelial hücrelerde hasarlanma şeklinde başlar ve kardiyak transplant hastalarında ölümün ana sebebidir (59,60). Endotelial hücrelerde hasar durumunda salgılanan antiendotelial antikorların varlığı ile TxCAD'nin gelişmesi doğru orantılıdır. Takrolimus alan kardiyak transplant hastalarında antiendotelial antikor (anti-vimentin) pozitif olarak bulunmuştur (59).

TxCAD'da koagülasyon sisteminin aktivasyonu da gözlenir. Takrolimusun invitro antitrombotik etkisi de rapor edilmiştir. Bu monosit NF- κ B'nin nükleer translokasyonu ile ilacın etkileşimi ve sonuçta doku faktör yazılımının azalması ile meydana gelir (61).

Azatioprin ve prednizon alan hastalarda siklosporin tedavisi ile takrolimus kıyaslandığında daha az endotelial hücre kökenli nitrik oksit sentaz (eNOS) gen ifadesi, daha fazla İNOS gen ifadesi, IL-6'nın allogreft ilişkili transkardiyak salınımında sitotoksik cevap ve uzamış inflamasyon nedeniyle fonksiyon bozukluğuna sebep olduğu öne sürülür (62).

Kardiyak transplantasyondan sonra endotel bağımlı mikro sirkülatuar cevapta, takrolimus alanlarda adenozinle ilişkili epikardiyal çeper artışı bariz olarak yüksek bulunmuştur (59).

Randomize prospektif çalışmalarda renal ve kc transplant hastalarında takrolimusun sol ventrikül posterior duvar kalınlığında artışa neden olduğu ve hipertrofik kardiyomyopati geliştirdiği bildirilmiştir. Takrolimusun sarkoplazmik retikuluma kalsiyum salınımını kolaylaştırmasına bağlı olarak oluşan kardiyak dokunun kalsifikasyonu ve arteritisi, ilaca bağlı kardiyomyopatinin mekanizmasını açıklamak üzere öne sürülmüştür (63).

Düşük doz takrolimus, viral IL-10 gen transferi ile kombine edildiğinde mürin kardiyak greft sağ kalımını uzatmada sinerjistik etkiye sahiptir. Buyüzden immünsüpresif gen tedavisi araştırmanın diğer bir aşaması olarak düşünülmektedir. (64).

2.2. KARACİĞER REJENERASYONU

Sağlıklı memelilerde kc ağırlığı ile vücut ağırlığı arasında iyi tanımlanan bir ilişki vardır (65). Cerrahi rezeksiyon, viral veya toksik ajanlar ile volümü değiştiğinde, kc kendi volümünü oluşturur (66).

Karaciğerin bir kısmının cerrahi olarak çıkartılması, kütlesini yeniden oluşturmak üzere kc hücrelerinin istirahat fazından proliferasyon fazına geçişini uyarır (67). Bu rejeneratif süreç; büyüme faktörleri, mitojenler ve inhibitörler ile kontrol edilir ve organ orijinal kütlesine ulaştığında durdurulur (68,69). Parsiyel hepatektomi, hücresel bileşenlerin biyosentezini karşılamak için kc'in hücresel enerji ihtiyacının artırması ile sonuçlanır (70).

Karaciğer rejenerasyonu düzenleyen iki mekanizma olduğu öne sürülmüştür. İlk teoride Michalopoulos ve arkadaşları, kc kütlesindeki azalmanın, ekstra hepatik bölgelerden mitojenik uyarı etkisi yapan sinyaller doğurduğunu iddia etmişler ve bu uyarıyı meydana getiren en önemli faktörün, norepinefrin ve HGF olduğunu ileri sürmüşlerdir. İkinci teoride ise, Fausto ve arkadaşları PH'ye bağlı plazmaya ilişkin değişiklikler ile hepatositlerin kendi mitojenik uyarımını sağladığını rapor etmişlerdir (71).

Her iki teoride de, kc rejenerasyonunun kontrolünde agumentörler G1-S geçişinde önemli rol oynar. Mitojenik stimulus iki tür intrasellüler sinyal iletimi ortaya çıkarır. Vazopressin, bombesin, bradikinin gibi peptidler guanin nükleotid proteinine bağlanır ve spesifik fosfolipaz C'yi inositol trifosfat oluşturarak aktive ederler (72). Diğer taraftan Epitelial Growth Faktör (EGF), Platelet Kökenli Growth Faktör (PDGF) ve FGF α - internal domain olarak tirozin kinaz bulunduran reseptörlere bağlanarak direkt olarak yada önceki grubun growth faktörler tarafından fosfolipaz C2'yi aktifleyerek sinyal oluşumuna sebep olur. Her iki durumda da inositol trifosfat, bir haberci gibi etki yaparak endoplazmik retikulumun spesifik reseptörlerine bağlanarak, intrasellüler serbest kalsiyumun artması ve kalsiyumun salıverilmesini sağlar. Kalsiyumun artması PH ile ilişkili DNA replikasyonuna yol açan basamaklarda önem arz eder (23).

Karaciğer rejenerasyonu PH'den sonra farklı türlerde farklı hızlarda gerçekleşir. Rat bu alanda en çok çalışılan türdür (73). Ratta rejenerasyon piki 24 saatte olmaktadır (74,75). Farede 48 saatte iken (76), bu olay köpekte ve domuzda 72 saatte gerçekleşir (77).

Karaciğer dokusundaki rejenerasyonun kantitatif ölçümü için kabul edilmiş ve yaygın olarak kullanılan 4 parametre vardır:

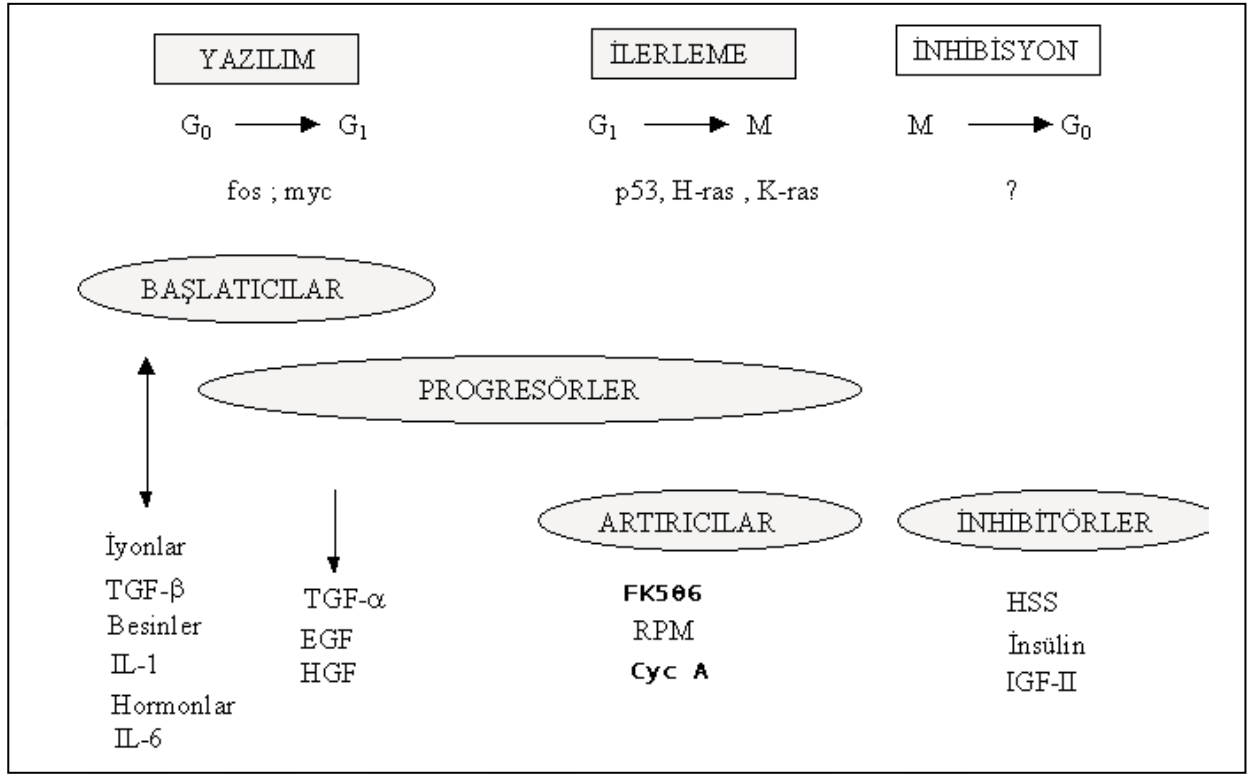
- a) Mitozdaki hepatositlerin sayısı
- b) Hepatik DNA'ya timin bağlanması
- c) DNA sentezinin bir göstergesi olan hepatik Timidin Kinaz
- d) Poliamin metabolizmasının göstergesi olan Ornitin Dekarboksilaz aktivitesi

Timidin Kinaz ve Ornitin Dekarboksilaz hepatektomize ratların kanında ölçülebilen ve kc rejenerasyonu için pratik noninvazif bir parametredir. Bu parametrelerin plazma glukagon, insülin (78) ve seks hormon düzeyleri ile ilgisi gösterilmiştir (79,80).

Ratlarda plazma insülin seviyelerinde ilk 12 saatte bir düşme gözlenirken, insanlarda bu durum 3 gün civarında olmaktadır (81,82). Hiperglukangonemi ise, hayvanlarda erken dönemde gözlenen bir durum olmasına karşın, bu durum insanlarda muhtemelen altta yatan kc hastalığına bağlı olarak glukagon seviyelerinin normalden dört kat fazla olmasına bağlanmıştır.

Erkeklerde hepatektomiden sonraki ilk birkaç saatlik dönemde seks hormonlarında değişiklik gözlenirken, yüksek estradiol seviyesine sahip kadınlarda seks hormon seviyelerinde değişiklik gözlenmemiştir (83).

Hepatosit Growth Faktör, Transforming Growth Faktör- α , interlökin 6, Tümör Nekrozis Faktör- α , insülin , norepinefrin, gastrin, prostaglandin E₂, kalsiyum, vitamin D ve FK506 gibi birçok büyüme faktörü ve sitokinler kc rejenerasyonunda önemli rol oynar (84-87) (Şekil IV).



Şekil IV. Hücre Siklus Dönemlerine Göre Kc Regenerasyonunun Düzenleyen Faktörler

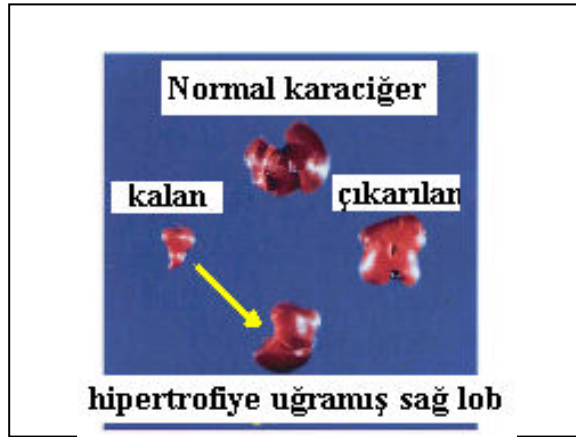
CyA;siklosporin , EGF; epidermal growth faktör , HGF; hepatosit growth faktör, HSS;hepatik stimulator substans IGF; insülin-like growth faktör , IL; interlökin, RPM; rapamisin, TGF; transforming growth faktör

Parsiyel hepatektomiden sonraki regenerasyonun ilk 2 ile 3 .günlerinde, matriks hücre oranı azalır. Matriks yeni replike olan sinüzoidlerden yoksun hepatosit kümeleri şeklindedirler. Parsiyel hepatektomiden sonra 6. güne kadar hepatositler arasında sinüzoidler oluşur ve hücrenin normal mimarisi ortaya çıkar. Ito hücreleri tarafından salınan laminin zincirleri pencereci sinüzoidler ile hepatosit kümelerinin neovaskularizasyonunda görülebilir. Entaktin ve spesifik laminin zincirlerinin; hepatik hasarlanmanın sonucunun tesbitinde ve normalden sirotik kc parankiminin oluşmasında kritik rol oynadığı bildirilmiştir. Ekstrasellüler matriksin elemetleri gibi parakrin ve otokrin geçiş yapabilen faktörler, bu faktörlerin depo yerleri gibi de iş görürler.İşte bu mikro mimarinin aslına uygun inşası akut ve kronik hasarlanmasını birbirinden ayırmada anahtar rol oynar (88).

Karaciğer rejenerasyonunda immünsupresif ajanların rolü rapamycin kullanılarak yapılan başka bir çalışma serisi ile doğrulanmıştır. Bu ilaç yapısal olarak FK506'ya benzer ve %70 hepatektomize ratlara verildiğinde hepatosit proliferasyonuna negatif bir etki yapar. Bu sonuçlar immunofilinlerin hem inhibitör hem stimülatör olarak hepatik rejenerasyonu etkilediğini göstermiştir (89).

2.2.1.Karaciğerin Proliferatif Kapasitesi

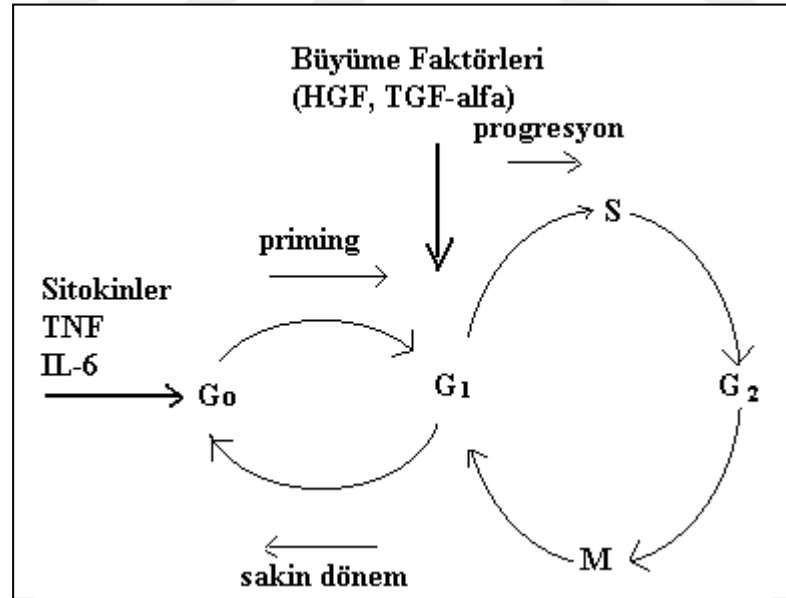
Parsiyel hepatektomiden sonra matür kc hücrelerinin proliferasyonu ile kayıp hepatik doku yenilenir. Matür kc hücreleri; hepatositler, endoteliyal hücreler, bilier epitel hücreleri, hepatik satellit hücreleri ve Kupffer hücreleridir. Progenitör hücre ya da kök hücreleri rejeneratif kapasitenin çoğundan sorumlu tutulamaz. Geriye kalan kc küreleri ilk olarak proliferer olur. Parankim rejenerasyonu ana hedeftir. Erişkin kc genellikle minimal replikasyon gücünde her 20.000 hepatositte yaklaşık bir mitoz gözlenen sakin durumdadır (90).



Resim I. Normal rat karaciğerinin hepatektomi 2/3 parsiyel hepatektomi öncesi ve sonrası 48. saatte makroskopik görünümü.

Doku kaybı ve hasarında hepatosit G0 (sakin durumundan), G1 prereplikatif duruma geçer. Bunu DNA sentezinin olduğu sentez (S) ve hücre bölünmesinin tamamlandığı mitoz (M) fazı takip eder. Hücre siklusunun prereplikatif dönemi de kendi arasında G0G1 başlatıcı (priming) durum ve G1S ilerleyici (progresyon)

durumu olmak üzere ikiye ayrılır. Başlatıcı durum (priming); sitokinler, besinsel ve hormonal sinyaller ile oluşturulan geri dönüşümlü bir süreçtir. G1 fazına geçiş büyüme faktörlerini gerektirir. G1S noktasında siklin D1 sinyali büyüme faktörlerinden bağımsız replikasyonu sağlar (91). Parsiyel hepatektomiye cevapda, hepatositler yaklaşık 12 saatlik bir bekleme ve düşük seviyede DNA sentezi durumundadır. Hepatositlerin bazıları S fazına girer. 6-8 saat sonra bunu DNA sentezinin olduğu mitoz takip eder. Hepatik rejenerasyon süresince, hepatositlerin büyük bir kısmı bir veya iki kez replike olur. Hepatosit dışı rezidü ke hücrelerinin replikasyonu (parankim dışı hücreler) 24. saate kadar uzayabilir. Ancak hepatositlerdeki gibi bir mitoz ve DNA sentez paterni gösterir. Karaciğer eski boyut ve hacmine geldiğinde hepatositler non-replikatif sakin ancak, fonksiyonel duruma geçerler. Ratta rejenerasyon prosesi genel olarak yedi ile on dört günde tamamlanır (66) (Şekil V).



Şekil V. Hücre Siklusunun Fazları

Normal bir rat karaciğeri 3×10^8 hepatositten oluşur. Bu bir ke'in yaklaşık 50 rat karaciğeri üretebilecek kolonik potansiyele sahip olduğunun göstergesidir.

Normal kc'in %90'lık bir PH'den sonra bile rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu bilinir (92,66,73).

İnsanlarda, kc'in eski hacmi alması üç hafta alırken, ratlarda ilk 24 saatteki piki takiben 10-14 gündür (93).

Aktive hepatik makrofajlar tarafından üretilen sitotoksik mediyatörler akut kc hasarının gelişmesinde rol oynar (94).

Aktive makrofajlardan salınan TNF, IL-1, aktif oksijen (95) sinüzoidal epitel hücreleri ve hepatositlere hasar verir. Daha önceki çalışmalar TNF- α antibadileri ve süperoksid dismutazın invivo kc hasarlanmasını azalttığını ve prostoglandinlerin sitoprotektif etkilerini açığa çıkarttıklarını göstermiştir (96-98).

Tablo I. Karaciğer Hücre Proliferasyonunu Değerlendirmede Kullanılan Belirteç ve Metodlar

DOKUDA	KANDA	İMMÜNOHİSTOKİMYA
Karaciğer ağırlığı	Kanda Timidin kinaz	PCNA
Mitoz sayımı	Ornitin Dekarboksilaz	Ki-67
S-faz metodları	Fibronektin	DNA polimeraz alfa
H3 timidin işaretleme	Erken gebelik faktörü	NOR proteinleri
BrdU		Endojen genler
Flow sitometri		RNA histon 3

2.2.2. Karaciğer Rejenerasyonunun Moleküler Mekanizmaları

Karaciğer kendi kütlesi ve büyümesini tam olarak düzenleyebilir. Hepatik lopların cerrahi rezeksiyonu, kimyasal ya da viral hasarı sonucu hepatosit kaybı apoptoz ile kc kütlesini eski haline getirmek üzere hepatosit replikasyonunu tetikler. Hepatositlerin replikasyon kapasitesi büyüktür ve kc yeniden oluşumunu gerçekleştirebilir. Bununla beraber hepatosit replikasyonu bloke edilmiş veya geciktirilmiş olduğu zaman kök benzeri (stem-like) hücreler proliferasyona neden olur (99,100).

Hepatositlerin tam bir rejenerasyon cevabı oluşturabilmesi için, Hepatosit Growth Faktör (HGF), Transforming Growth Faktör-alfa (TGF α) ve Epidermal Growth Faktöre ihtiyacı vardır. Sitokinlerden Tümör Nekrozis Faktör ve IL-6, diğer ajanlara karşı sitotoksiteden korunması için gereklidir. Reaktif oksijen türleri ve glutasyon, apopitotik ya da proliferatif hepatositlerin TNF'ye etki edip etmediğini gösterebilir. Nükleer Faktör B inhibitörü (NF κ B), TNF ile indüklenebilen Transkripsiyonun Aktivatör ve Transdüksyon Sinyali (STAT3), hepatosit proliferasyonu için sitokin sinyal iletiminde rol oynar. NF κ B, TNF, AP-1 ve C/EBP β ke rejenerasyonundaki transkripsiyon faktörleridir. Parsiyel hepatektomiden kısa süre sonra hepatik ekstrasellüler matriks yoğun olarak oluşmaya başlar. Hücre siklusunun başlama fazının devamı büyüme faktörlerini gerektirir (101).

Siklin D1, hepatosit hücre siklus G1 fazı için en güvenilir belirteçtir, in vivo ve in vitro olarak gösterilmiştir. Siklin D1 muhtemelen bu büyüme faktörlerinden bağımsız otonom replikasyonun gerçekleşmesini sağlar. Growth Faktör yokluğunda da hepatosit DNA replikasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. p53 ve p21 hücre siklusunu inhibe ederken, siklin D1 ve mdm2 mRNA replikasyonunu indüklemektedir (102,103).

2.3. KARACİĞER BÜYÜMESİNİ DÜZENLEYEN HORMONLAR VE BÜYÜME FAKTÖRLERİ

Hepatosit mitojenlerinden en çok çalışılanları Epidermal Growth Faktör (EGF), Transforming Growth Faktör alfa (TGF α) ve Hepatosit Growth Faktör (HGF)'dir. Keratinosit Growth faktör (KGF), Fibroblast Growth Faktör (aFGF ya da HBGF1) ve Heparin bağlayan EGF (HB-EGF) hepatosit replikasyonunu değişik derecelerde indükler (104) (Tablo II-III).

Tablo II. Karaciğer Büyümesini Düzenleyen Hormonlar ve Büyüme Faktörleri

Hormonlar	Büyümeyi Uyarıcı Faktörler	Büyümeyi İnhibe Eden Faktörler
Prolaktin	IGF-II	TGF- β
Anjiotensin	EGF	IL-1
Vazopressin	TGF- α	IL-6
Norepinefrin	HSS	RPM
Estradiol	HGF	Aktivin
T3		İnhibin
İnsülin		

Hepatik stimülatör madde (HSS), siklosporin A, FK 506, insülin benzeri growth faktör II; augmentörler olarak adlandırılır. Bunlar invitro olarak aktif değil iken invivo G0-G1 geçişini tamamlamış hepatositlerin proliferasyonunu stimüle ederler. Hepatik stimülatör madde, molekül ağırlığı 33kD olan bir proteindir. Proliferatif cevap vermekte olan köpek, tavşan ve ratların sitozolik ekstraktlarında bulunur (105).

Tablo III. Hepatik Rejenerasyon Sırasında Büyümeyi Uyarıcı Faktörler

<u>Mitojenler</u>	<u>Yardımcı mitojenler</u>
Hepatosit growth faktör	İnsülin
Transforming Growth Faktör- α	Glukagon
Epidermal Growth Faktör	Anjiotensin
İnsülin-like Growth Faktör	Norepinefrin
Tümör Nekrozis Faktör	Vazopressin
Asidik Fibroblast GrowthFaktör	Parathormon
	Tiroid hormonları
	Adrenal kortikal hormonlar
	Kalsiyum
	Vitamin-D

2.3.1. Hepatosit Growth Faktör (HGF)

Yedi yüz yirmi sekiz amino asit prekürsöründen büyük bir α ve küçük bir β subünitesinden oluşan, disülfid bağlı bir heterodimerik bir glikoproteindir. Yapısal olarak plazminojen ve plazmin ile homojenite gösterir. β subüniti serin proteaz yapısına benzer. Ancak katalitik bölgedeki amino asit diziliminden dolayı proteolitik aktivitesi yoktur (106). Karaciğerde en çok İto hücrelerinde bulunur (107).

Karaciğer mitojenlerinin en potenti olup, reseptörleri yoluyla hepatik büyüme sırasında anahtar biyolojik rol oynayan, reseptör tirozin kinaz grubunun bir üyesi olan dağıtıcı (scatter) faktör olarak bilinir. Hepatosit Growth Faktör mezenkim hücreleri tarafından üretilirken, diğer epitel hücreleri ve hepatositler tarafından üretilmez. Rejeneratif cevap sırasında, dalak ve akciğer gibi diğer dokuların mezenkimal hücrelerinde de HGF mRNA da artış gözlenir. Parsiyel hepatektomiden sonra bu dokularda HGF mRNA'nın indüksiyonunun sebebi belli değildir. HGF parakrin ve endokrin anlamda hepatositlerin mitojenik etkisini açığa çıkarır. Rat plateletlerinden, normal ve fulminan kc yetmezlikli hastaların karaciğerinden, plasentadan ve insan embriyonik akciğer fibroblastlarından saflaştırılmıştır (108,109). Morfogenezis ve hücre motilitesini kolaylaştırmak gibi biyolojik geniş bir aktiviteye sahiptir (110).

Parsiyel hepatektomiden sonra HGF plazma konsantrasyonu ilk 3 saatte artar. Bu yükselme kc'den başka akciğer, dalak, böbreklerde olur (111,112).

2.3.2. Epidermal Growth Faktör (EGF)

Elli üç amino asitten oluşan bir polipeptiddir. $TGF\alpha$ nin benzeri olup üç disülfid köprüsüne sahiptir (113). Parsiyel hepatektomiden sonraki ilk saatlerde EGF reseptör sayılarında artış olur (114). Parsiyel hepatektomiden sonraki ilk iki saatte tesbit edilebilir. Hepatik dokuda rejenerasyonu başlattığı gösterilmiştir (115).

Tükürük, gastrik sıvı, safra ,süt gibi vücut sıvılarında bulunur. Farelerin tükürük bezlerinden salınan EGF, siyalenadenektomi yapılan ratlarda seviyelerinde

azalması sonucunda rejeneratif cevap bozulmasına neden olur. EGF kültürde hepatositler için primer mitojendir (116).

2.3.3.Transforming Growth Faktör- α

Aynı reseptöre bağlandığı EGF ile aynı pozisyondaki üç disülfid köprüsüne sahiptir. Hepatosit proliferasyonunun bir komponenti ancak esansiyel olmayan bir önemi vardır (117). Otokrin mekanizmalar aracılığı ile hepatositlerin mitojenik stimulusuna neden olur. Adezyon moleküllerinde olduğu, gibi membranlardan geçmeden growth faktöre bağlanarak etkir. Yenidoğan dönemindeki hepatosit proliferasyonunun progresif azalışına paralel olarak düşme gösterir (118,119).

2.3.4. Transforming Growth Faktör- β

Herbiri 112 amino asitten oluşmuş iki benzer zincirin birleşmesinden oluşan bir homodimerdir (120). Kültür hepatositlerinde growth faktör bağımlı DNA sentezini inhibe eder (121-123). İlaç olarak PH yapılan hayvanlara verildiğinde rejenerasyon sırasında oluşan DNA replikasyonunu reverzibl olarak ihhibe eder (124).

Hepatik perifer hücrelerinden sekrete edilen fibrojenik bir sitokin olup, hepatosit proliferasyonunu inhibe eden potent bir ajandır. Hepatik rejenerasyonu sonlandıran esas faktör olduğu ileri sürülmektedir. Parsiyel hepatektomi sonrası TGF- β , HGF'ye benzer şekilde hızla yükselmektedir. Normalde TGF- β mRNA karaciğerde saptanmazken, parsiyel hepatektomi sonrası 3-4. saatte artmakta ve 48-72. saatlerde plato yapmaktadır (125).

Transforming Growth Faktör- β , potent immünsüpresif aktivitesi ve fibrojenik potansiyeli ile çok fonksiyonlu bir sitokindir. Takrolimus ve siklosporin in her ikisi ile de memeli hücrelerinde TGF- β 1 hiperekspresyonu gözlenir. Bu sonuçlar takrolimus ve siklosporin tarafından üretilen TGF β 1'in artışının ilaçların normal nefrotoksik ve

immünsüpresif etkilerine katkıda bulunduğunu düşündürür. Siklosporin tarafından TGF- β 1 sentezinin artışının, takrolimus ile olmadığına dair veriler vardır.

Hepatik rejenerasyonda mito-inhibitör rol oynayan TGF- β 'ya ek olarak etkili olabilecek diğer faktörler; metabolitler, büyüme faktörleri, sitokinler ve ekstra-sellüler matrikstir. Bu faktörler hem mito-inhibitör aktivite ile, hem de hepatik rejenerasyonu sonlandırmak için agregatlar oluşumunu uyarak etki etmektedir (137).

2.3.5. Tümör Nekrozis Faktör (TNF)

Tümör Nekrozis Faktör (TNF), hepatik hasarlanmada ve parsiyel hepatektomiden sonra bir proinflamatuvar sitokin ve akut faz cevabı mediyatörü gibi etkir (126).

Tümör Nekrozis Faktör'ün aktivasyonu ile stres kinazlardan olan jun-N terminal kinaz (127) ve kaspaz 8 gibi proteazlar aktiflenir (128). TNFR-1 (p55) ve TNFR-2 (p57) reseptörleri ile hepatik hasarlanmada akut faz cevabının mediyatörü gibi etki yapar. Bu da NF κ B, IL-6 ve STAT-3 sinyal yolağının aktiflenip rejeneratif sürecin devamını ve DNA replikasyonunu stimüle eder. Rejeneratif süreçte TNF sinyal yolağı TNF $\rightarrow$ TNFR-1 $\rightarrow$ NF κ B $\rightarrow$ IL-6 $\rightarrow$ STAT3 şeklindedir (129,130).

Tümör Nekrozis Faktör kc rejenerasyonunu başlatabilir ancak apoptoza neden olmaz. Sadece Aktinomis-D veya siklohegzimid gibi ilaçlarla beraber kullanıldığında apoptozu indükler, gen transkripsiyonu ve translasyonunu bloke eder. Parsiyel hepatektomiden önce TNF-alfa antitadileri verildiğinde DNA sentezinde azalma olur (131).

Apoptoz; TNF sekretuar ajanlar, lipopolisakkarid galaktozamin, diğer hepatotoksik ilaçlar ve toksik kimyasallar ile oluşur. Tümör Nekrozis Faktör apoptotik ve proliferatif etkilerin her ikisinde de çok miktarda ROT'u ortaya çıkartır. Normal hepatositte artmış ROT glutatyon ve diğer tiyollerin etkisi yoluyla uzaklaştırılır. Ayrıca ROT direkt olarak NF κ B nin aktivasyonunu IKK enzimleri yoluyla etkiler. NF κ B inflamasyon hücre adezyonu proliferasyon ve apoptozda gen gen yoluyla aktivasyonda kullanılan bir transkripsyon faktörüdür. Reaktif oksijen

türlerinin, TNF aracılı aktivasyonunda ke NFκB aktivasyonu önemli bir adımdır. Bu aktivasyon basamağını inhibe eden enzim sisteminine IKK (IκB kinaz) kompleksi adı verilir. Tümör Nekrozis Faktör bağımlı apoptozda artmış olan ROT, γ-glutamil sistein sentetaz sentezinde blokaj ve glutatyonun azalması sebebiyle nötralize edilemez. Bu şartlar altında ROT mitokondri membranında hasara neden olur, mitokondri membran potansiyeli düşer ve sitozole sitokromC salınır. Bu son olay kaspazın aktivasyonunu tetikler ki bu da hücre ölümüne neden olacaktır. Tümör Nekrozis faktör bağımlı hepatosit proliferasyonu ve apoptoz arasında hassas bir denge vardır. Bu denge aşırı ROT'a karşı hepatosit defansının etkinliği ile diğer yöne geçer. Glutatyon ve diğer tiyollerin bu defansda anahtar element oldukları düşünülmektedir (132).

Ayrıca İnterlökin-6 (IL-6) ise ke rejenerasyonunda TNF ye cevabı için salınan önemli bir sitokindir. Plazma seviyeleri PH den 24 saat sonra hızla artar (133).

2.4. KARACİĞER REJENERASYONUN BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLERİ

2.4.1.Timidin Kinaz

Timidin kinaz (EC.2.7.1.21), deoksitimidinin deoksitimidin monofosfata dönüşümünü katalizleyen ve daha sonra da deoksitimidin trifosfat oluşturarak DNA sentezinde görev alan bir enzimdir. Memeli hücrelerinde iki farklı izoenzimi vardır. Fetal izoenzimi (TK1) sitoplazmada yerleşmiştir ve hücre siklusunda moleküler seviyede düzenlenir. Bu form G1/S fazı bölünmekte olan hücrelerde bulunup hücre bölünmesini düzenler. Erişkin formu TK2 ise mitokondride bulunur ve hücre siklusu boyunca stabil olarak kalmaktadır. Normal ve patolojik durumlarda serum TK aktivitesinin %95 ini TK1 sağlar (134).

Timidin kinaz bir proliferasyon belirtecidir. Hücrelerdeki TK1 aktivitesi hücrelerin proliferatif aktivitesi ile orantılıdır. Bu yüzden TK aktivitesinin ölçümü

ile hücre bölünüm hızı hesaplanabilir. Ekzojen timidin TK etkisi ile fosforile edildikten sonra DNA ile birleşebilir. Timidin kinazın kc rejenerasyonu ve mitotik indeks ile direkt olarak ilgili olduğu gösterilmiştir (135-136).

Timidin kinaz akut yada patolojik doku stresine primidin sentezinin bütünleyici ya da alternatif kurtarma yolunda anahtar rol oynar.

Timidin kinaz DNA sentezi için hız sınırlayan bir enzimdir. Timidin kinaz, ATP ve timidinden, timidilat oluşumunu katalizler. Timidin fosforlanması ve proliferasyon hücrelere bağlanmasında gereklidir (137).

Yüksek TK seviyeleri hızlı büyüyen dokularda gözlenir. Timidin fosforilazın katabolik ürünleri nedeniyle TK ekspresyonu neoanjiogenezis ile indirekt olarak uyumlu olabilir ve TK substratının desteğinde anjiogenetik rol oynar (138).

Majör kc rezeksiyonuna giden insanlarda TK düzeyleri cerrahiden sonraki 5. günde bariz olarak yükselir (139).

α -adrenoseptör blokörleri fenoksibenzamin ve fentolamin TK aktivitesini inhibe ederken, Ca kanal blokörleri, verapamil, diltiazem, nifedipin ve kalmodulin inhibitörleri trifluoperazin ise PH den 24 saat sonra TK aktivitesini artırır (139).

Parsiyel hepatektomi yapılan hayvanlarda kc rejenerasyon periyodu timidin kinaz aktivitesinin regüler yükselmeleri ile karakterizedir.

Ratların kc mikrozomlarında, maksimum timidin kinaz aktivitesi olduğu zamanda kontrole göre karşılaştırıldığında lipid peroksidasyon hızında düşme gözlenmiştir. Timidin kinaz yüksek iken lipid peroksidasyon hızı düşmektedir (140).

Geleneksel olarak TK aktivitesi radyoaktif timidinin hücrelerle birleşmesi ile ölçülmektedir.

2.4.2. Ornitin Dekarboksilaz

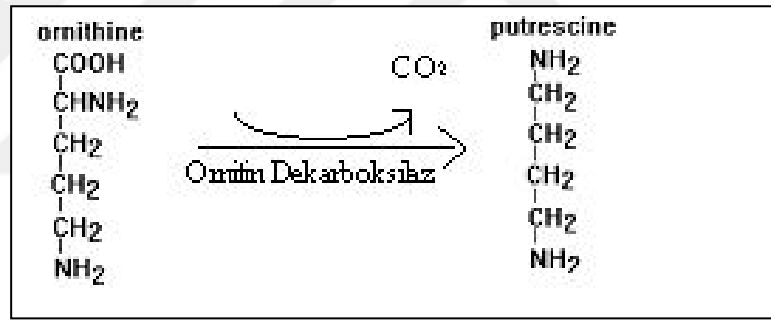
Karaciğer rejenerasyonu için esas olan putresin, spermidin ve spermin gibi poliaminlerin sentezi için gerekli Ornitin Dekarboksilaz (EC.4.1.1.17), DNA sentezinin bir belirtici olarak da kullanılır. Ornitin Dekarboksilaz hepatik

rejenerasyon için L-ornitinden, esansiyel kabul edilen bir diamin olan putresinin sentezinde görev alır ve 461 amino asitten oluşan bir homodimerdir (141).

Ornitin yapısal olmayan bir amino asittir ve üre siklusu ara metabolitidir. Ornitinin dekarboksilasyonu ile putresin oluşur ve putresin değerleri de 24. saatte pik yapar (ŞekilVI).

Ornitin Dekarboksilaz pridoksal 5'-fosfatı bir kofaktör gibi kullanır.

Karaciğer homojenatlarında C14 işaretli ornitin substratının serbestleştirdiği CO₂' nin kantitasyonu ile enzimin ölçümü yapılır. Parsiyel hepatektomiden 6-24 saat sonra pik deylerine ulaşır (142). Ornitin karboksilazın spesifik kompetitif inhibitörü α -difluorometilornitin'dir.



Şekil VI. Ornitin Dekarboksilaz Aracılığı ile Putresin Oluşumu

Arjinin hidrolizi ile üre ve ornitin açığa çıkar. Bu yüzden üre siklusu protein metabolizmasında da önemli bir rol oynayabilir

Poliamin sentezinin inhibisyonu sonucu DNA, RNA ve protein sentezinde azalma olur. Poliaminlerin hücre proliferasyonunda potansiyel düzenleyici rolü vardır (142).

2.4.3. Mitotik İndeks ve Karaciğer Ağırlığı

Karaciğerin %70 alınmasıyla oluşturulan PH, deney hayvanlarında yaygın olarak kullanılır. Segmenter veya lobar rezeksiyon insanlarda kc vericilerinden transplantasyon için ve tümör rezeksiyonu amacıyla yapılmaktadır. Karaciğer

kütlesinden çok vücut kütlesi ile kc kütlesi arasındaki oran kc büyümesinin düzenlenmesinde esastır (set point). Karaciğer kütlesinin düzenlenmesi büyümenin tek bulgusu değildir. Karaciğer kütlesi vücudun fonksiyonel gereksinimini aştığında, kc/beden kütle oranına geriler Bu durum ilaç bağımlı kc hiperplazisi ve hipertrofisinde ilaç tedavisinin sonlaması ile olur (77).

Mitotik indeks (MI) tayini; potasyum klorid ya da alkol ile inkübe edilen hepatositlerin santrifüjü ile elde edilen süpernatanda veya % 10'luk formaldehit ile fikse edilmiş dokuların standart mikroskop kesit örneklerinde sayımı ile yapılır. Karaciğer dokuları parafin ile bloklanır. Hematoksilen eozin ile boyanan bu örneklerin ışık mikroskopunda yüksek büyütme ile her grubun en az yirmi alanda sayımının ortalaması alınarak 1000 hücre başına mitotik figür sayısına göre MI sonucu verilir. Karaciğer hücrelerinin PH'den sonra rejeneratif cevabının kinetiği ilk 12 saatte gözlenir ve normalin 11 katına çıkabilir (139). Hepatositler dinlenme durumdan hücre siklusuna geçerler ve DNA sentezine doğru gelişme gösterirler. DNA sentezi PH den 12-16 saat sonra başlar ve 22-24 saatte pik yapar. Bunu 6-8 saat sonra bir mitoz dalgası takip eder (143).

Parsiyel hepatektomiden sonra hepatosit proliferasyonu sonucunda, 10- 14 hepatositten oluşan hücre kümeleri gözlenir. Bu kümeler sinüzoidlerden ve ekstrasellüler matriksden yoksundurlar. Hepatektomiden sonraki dört gün, İto hücreleri kümelerinde hepatositler arasında hassas hücre oluşumlarına dönüşürler. Kümelerin bu invazyonu birkaç laminin zinciri için kodlanan genlerin İto hücrelerinde aktivasyonu ile aynı zamana rastlar. Kümelere İto hücrelerinin penetrasyonu pencereci endotel hücrelerince takip edilir ve bu yolla normal hepatosit damar ilişkisi yenilenir. Normal vasküler yapı oluşur oluşmaz laminin genleri kapanır (turned off). Sürekli kapillerler, sinüzoidlere dönüştürüldüğü zaman , olaylar zinciri hepatogenez sırasındakilere benzer bir hal almıştır. Hepatogenez ve rejenerasyonundaki bu benzerlik salınan laminin zincirlerin pencereci sinüzoidler tarafından vaskülarizasyon için işaret olabildiğini destekler. Bu oluşum süresince ne entaktin ne de laminin alfa zincirleri salgılanır. Kümelerin rejenerasyonundaki vaskülarizasyon, sirotik nodüllerdeki vaskülarizasyon için çelişki oluşturur. Daha

sonraki olay entaktin ve belki de alfa1 laminin zincirleri salgılanır. Bazal membran ve kapillerlerin devamının oluşumu ve pencereli sinüzoidlerin oluşumundan daha fazladır. Araştırmalar hepatik hasarlanma sonucunu tesbit etmede entaktin ve spesifik laminin zincirlerinin kesin rol oynadığını desteklemektedir (144).

2.4.4. Hepatik Ekstrasellüler Matriks

Hepatik Ekstrasellüler Matriks (HEM), çoğunluğunu endotel ve epitel hücrelerinin oluşturduğu kompleks makromoleküler yapısal bir ağ ile çevrili stromal hücrelerdir. HEM'in hücre tutunması, migrasyonu, farklılaşması, tamiri ve gelişiminde çok önemli modülatör görevi vardır. Bunu sitokinleri salgılamak, hücre yüzey reseptörleri ile bir polipeptid gibi etkileşerek yada bir solid faz agonisti gibi etkileyerek düzenler.

Kollogenler, elastin, yapısal glikoproteinler ve proteoglikanlar HEM in majör gruplarını oluştururlar.

HEM'e ait bazal membranın yapısı laminin, entaktin, kollojen tip VI, perlekan olmak üzere 4 majör komponentten oluşmuştur.

Rejenerasyonda HEM'deki tablo subletal CCl₄ hasarlanmasından sonrakine benzerdir. Bununla birlikte CCl₄ hasarlanması inflamasyon hücreleri ve ve hepatosit nekrozuyla birliktedir. CCl₄ hasarlanmasında yeni hepatik lobül oluşumu yoktur ve sadece sentrilobüler zonlar yenilenir.

Parsiyel hepatektomiden sonraki ilk 24 saatte ekstrasellüler matriks (EM) de dikkate değer bir değişiklik yoktur. Mitotik aktivite periportal zonlarda belirgindir. Eşzamalı bir artış olmaksızın EM de hepatositlerin sayısı artmıştır. Hücre/EM oranı artmıştır. Hepatektomiden sonraki 3. gün periportal hepatosit kümeleri 10-14 hücre içerir. Bu ilk hücreler mitoz girer ve midlobüler hepatositler oluşur (16 saat). Bunu 48. saatteki sentrilobüler hepatositlerin oluşumu izler. Hepatektomiden sonra 4. gün mitotik aktivite azalır, küçük ekstrasellüler birikimler olan laminin İto hücrelerinde demonstratif olarak gösterilebilir. Normal lobuler vasküler yapı kurulur ve 8.

günlerde ise laminin içeren İto hücreleri nadirdir. Onuncu günde normal ekstrasellüler matriks görünümü oluşmuştur (145).

2.4.5. Adenozin 5'-Trifosfat

Adenozin 5'-trifosfat (ATP), hücrel metabolizmanın integrasyonu ve regülasyonunda kritik bir rol oynar ve ATP'nin hücrel seviyesi hücrel canlılığın bir göstergesi olarak kabul edilir (146).

Rejenerasyonunun ilk 24 saatinde mitokondriyal düzeyde ATP sentez hızında izlenen azalma, kc büyümesinin lag kinetiği ile birlikte gözlenmektedir ve minimum değer 24. saattedir (10).

Hipoksik hücre hasarlanmasında en erken değişiklikler mitokondride oluşur. İç membranındaki nonspesifik porların açılmasını da içeren değişiklikler disfonksiyonun geri dönüşümsüz olduğunun göstergesidir. Por oluşumu ile adenin nükleotid azalması eşzamanlıdır.

Araştırmalar FK506'nın, hipoksik hasarlanma sırasında bu mitokondriyal durumun düzelmesine yardım ettiğini göstermiştir. Bununla birlikte hasarlanmadan koruma mekanizması açık değildir (7)

Hepatik enerji metabolizma parametrelerinin en önemlilerinden biri Atkinson tarafından tanımlanan enerji değişimi (EC) ölçümüdür (147) (Şekil VII).

$$EC = \frac{(ATP + 0.5 ADP)}{ATP + ADP + AMP}$$

Şekil VII. Enerji Değişimi Formülü

Buna göre EC adenilat kinaz tarafından 0,85 civarında idame ettirilir. Eğer değer daha düşük ise bu ATP tüketiminin artması yada ATP sentezinin azalmasını düşündürür (148).

Parsiyel hepatektomiden sonra erken prereplikatif fazda, F_0F_1 ATP sentazda selektif bir etkilenme gözlenir. Bunun sebebi, F_0F_1 ATP sentazın F_1 kısmının büyük miktarda mitokondri matriksinde bulunması ve ROT atağından diğer membran komplekslerinden daha fazla etkilenmesi ile açıklanabilir. Enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu ile ATP sentaz fonksiyonu arasında direkt bir ilişki olduğu öne sürülmüştür (149).

Parsiyel hepatektomiden sonra kc mitokondrisinden izole edilen ATP sentaz kompleksi pro-SSG nin düzeyinden 2-3 kat daha fazla artış gösterir. Mitokondriyal proteazlar tarafından enzimin proteolitik parçalanmasında artmanın pro-SSG formasyonu ile sonuçlandığı düşünülebilir.

2.4.6. Karaciğer Rejenerasyon Oranı

Sakrifikasyon anındaki kc ağırlığından, hepatektomi sonrası kalan karaciğer ağırlığı çıkartılır ve bu değerin tüm karaciğer ağırlığına oranı hesaplanır. Elde edilen değer 100 ile çarpılarak karaciğer rejenerasyon oranı bulunur. Rat total kc ağırlığı ise rat ağırlığının %3.5 olarak kabul edilir (150). Sonuçlar yüzde (%) olarak verilir. Child's tarafından tanımlanan formüle göre kc rejenerasyon hızı şöyledir (151).

$$\frac{(\text{Sakrifikasyondaki kc ağırlığı}) - (\text{hepatektomide hesaplanan rezidü kc ağırlığı})}{\text{çıkarılan kc ağırlığı}} \times 100$$

2.5. GİNKGO BİLOBA EKSTRESİ

Çin'de yüzyıllardan beri ilaç amaçlı kullanılan ginkho ağacından elde edilen bir ekstredir. Yaş ile ilgili fizik ve mental bozukluk, demans ,akut koklear işitme kaybı, makuler dejenerasyon ve astma tedavisinde kullanılır (152).

Arteriel ve kapiller kan akımını artırdığı ve serebral glukoz metabolizmasını artırdığı gösterilmiştir (153). Membran lipid peroksidasyonunu inhibe eden antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (154,155).

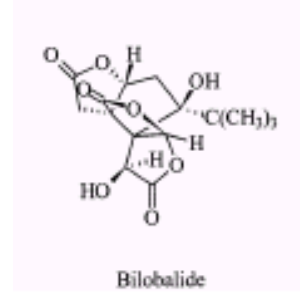
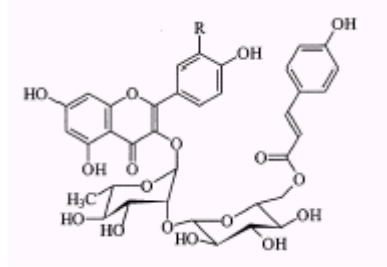
Ginkgonun antioksidan etkisi iskemi ve reperfüzyon yapılan hayvan modellerinde mitokondrial hasara karşı koruyucu kapasitesini açıklayabilir (156).

Hipoksi sırasında, endotelial hücrelerden inflamatuvar hücrelerin salınımı ve onların aktivasyonunun yol açtığı ATP miktarındaki azalma ile giden bir olaylar dizisi oluşur. EGb761 ve onun bileşeni olan bilobalide invitro endotelial hücrelerde hipoksiye bağlı ATP içeriğinde azalmayı inhibe eder. Bu şartlar altında artmış laktat üretimi olduğu gibi glukoz transportunu artırmak yoluyla glikoliz aktive edilir. Bilobalide hipoksik şartlar altında değil ancak normoksik durumda glukoz transportunu artırır. İskemi mitokondrinin bir ayrılmazı olarak bilindiğinden, EGb761'in varlığında hipoksi süresince gözlenen glikoliz aktivasyonundaki gecikme, EGb761 ya da bilobalidin mitokondrial respiratuvar aktiviteyi koruması ile en iyi şekilde açıklanabilir (157).

İskemiye bağlı hasarda en erken olay mitokondrideki değişikliklerdir ve dokunun korunması reperfüzyonunun sağlanması ile mümkündür. Adenin translokaz ve kompleks I aktivitesi iskemi ile hızla etkilenir. Ginkgo biloba ekstraktın terpenoid bölümünün anti iskemik özelliğe sahip olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Bunun mekanizması tam olarak bilinmemektedir (158).

Üç doğal antioksidanın olan; buğday kepeği, alfalfa ve ginkgo biloba ekstraktın serbest radikal yakalayıcı etkisi ratlarda çalışılmıştır. Ginkgo biloba ekstraktın serbest radikaller ve oksidatif hasar bulunan insan hastalıklarından korunmada en umut verici ajan olduğu gösterilmiştir. Bu ekstraktın aynı zamanda lipid peroksidasyonunu ve rat mikrozomlarında lipid radikallerini yakalamada diğerlerinden daha etkili olduğu bulunmuştur (159).

Ginkgo biloba ekstraktın standardize edilmiş formülasyonunun %24'ü flavinoid glikozidler ve % 6 s1 terpen laktonlarından (ginkgolid, bilobalid) oluşur (160) (Şekil VIII).



Şekil VIII. Flavinoid glikozid ve Terpen laktonunun moleküler yapıları

Hidroksil radikalleri membran proteinlerinin sülfidril grup bağlanma yerlerinde değişikliklere sebep olur ve lipid peroksidasyonunu indükler. Hidroksil radikalleri farklı sinyal yolları ile apoptozu uyarır. Bcl-2, Fos ve Jun genlerinin düzenlenmesi ile başlayan lipid peroksidasyonu ve metabolitleri hücre yüzey reseptörlerinden başlayan özel sinyalleri iletebilirler yada membran hasarı ile tamamen apoptoza yol açabilirler. EGb 761 bu sinyal yolu üzerinde değişiklikleri zayıflatmak için farklı etkiler gösterir.

EGb761'in %24 lük kısmını oluşturan ginkgo flavanoidlerinin, EGb ile tamamen aynı hidroksil yakalama etkisi yaptığını gösterilmiştir. EGb'nin terpen kısmı hidroksil radikalini direkt olarak yakalamaz ve bu molekülün kafes benzeri yapısı ile ilişkili olabilir. Flavanoidlerin ve terpenlerin bu anlamda sinerjistik etkisi yoktur (161).

2.6. ANTİOKSİDAN ENZİM SİSTEMİ VE SERBEST RADİKALLER

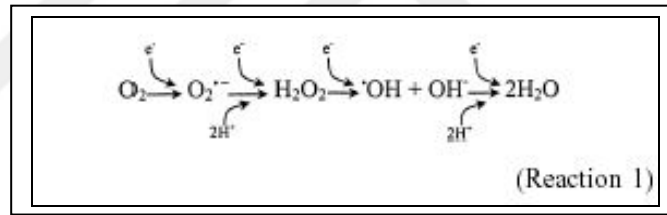
2.6.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Fizyolojik Foksiyonları

İntrasellüler serbest radikaller, orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulunduran düşük molekül ağırlıklı ROT'lardır ve bu terimler çoğu zaman birbirlerinin yerlerine kullanılır (162). Reaktif Oksijen Türleri oksijenden üretilmiş kimyasal reaktif moleküllerin bir kısmını kapsar. Bu moleküllerin bir kısmı hidroksil radikali gibi oldukça reaktif, bir kısmı ise süperoksit ve hidrojen peroksit

gibi daha az reaktiftirler. Bunlar birçok biyomolekül ile direkt olarak reaksiyona girerler ve serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatırlar. Bu zincir reaksiyonunun durdurulması istendiğinde; yeni oluşmuş bir radikal başka bir serbest radikal ile reaksiyona girerek paylaşılmamış elektronu ortadan kaldırılır ya da primer bir antioksidan veya zinciri kıran bir serbest radikal yakalayıcısı ile reaksiyona girdirilir (163).

Parsiyel hepatektomiden sonra hepatositlerce üretilen oksijen radikallerinin, erken rejeneratif prosesin potansiyel mediatörleri gibi etki edebileceği öne sürülmüştür (164).

İntrasellüler seviyede ROT oluşumu:



Süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet -}$) bir elektron ilavesiyle moleküler oksijenden oluşan süperoksit anyonu serbest radikal olarak kalma kararlılığındadır ve reaktivitesi yüksek değildir (Reaksiyon 1). Lipid membranlara penetrasyon kabiliyeti düşüktür ve üretildiği kompartımanda sınırlıdır. Süperoksit formasyonu özellikle respiratuar zincirin iç mitokondriyal membranında elektron zengin aerobik ortamda spontan olarak gerçekleşir.

Süperoksit, hidrojen peroksit gibi iskemi reperfüzyonda aktive edilen ksantin oksidaz gibi flavoenzimler tarafından endojen olarak üretilir (165,166). Lipooksijenaz ve siklooksijenaz süperoksit üreten diğer enzimlerdir (167).

Fagositik hücrelerin bir membran birleşik enzim kompleksi olan NADPH dağımlı oksidaz, yüksek derecede $\text{O}_2^{\bullet -}$ -serbestleşmesine sebep olur (168).

İki molekül süperoksit hızla hidrojen peroksit ve moleküler oksijen dönüştürülür ve SOD bu reaksiyonu katalizler. Hidrojen peroksit (H_2O_2) bir serbest

radikal değildir ancak biyolojik membranlara geçiş gücü olmasından dolayı önemlidir.

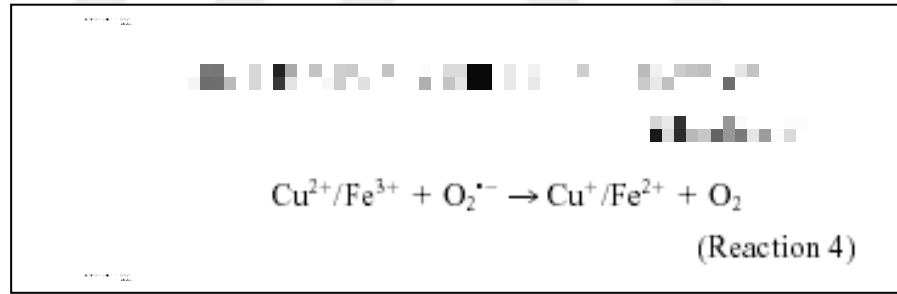
H₂O₂ nötrofil fagozomlarında bulunan miyeloperoksidaz etkisi ile HOCl (hipokloröz asid) içeren daha reaktif bir ROT üretiminde ve geçiş moleküllerinin oksidasyonu yoluyla *OH oluşumunda aracı rol oynar.

H₂O₂'nin diğer önemli bir fonksiyonu intrasellüler sinyal molekülü gibi rol oynamasıdır (169).

Hidroksil radikali (*OH) hidrojen peroksitten oluşur. Fenton reaksiyonu olarak bilinen reaksiyonu metal iyonları katalizler (Fe²⁺ veya Cu⁺).

Süperoksit de bu reaksiyonda metal iyonları resiklusunda önemli rol oynar.

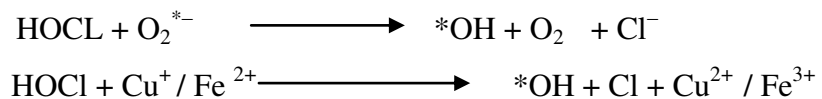
Reaksiyon 3 ve 4 Haber Weiss reaksiyonunun özetidir ve transizyon metalleri burada hidroksil radikalleri oluşumunda görevlidir (170).



Geçiş metalleri ferritin ve O₂^{*-} ile reaksiyona giren farklı dehidratazlardan salınır. Yaşayan hücreler için spesifik olan bu mekanizma in vivo Haber-Weiss reaksiyonu olarak adlandırılır.

Fagositler aktive edildikleri zaman bakterileri öldürmek için yeterli miktarda ROT üretirler. NADPH oksidaz kompleksi tarafından bu sırada oluşturulan O₂^{*-} ler, fagozomlardaki SOD ile H₂O₂'ye ve daha sonra da miyeloperoksidaz tarafından hipokloröz asite (HOCl) dönüştürülür (171).

Reaksiyon Fenton reaksiyonunun analogudur. H₂O₂ nin yerini HOCl almıştır.



Bu yüksek reaktif oksijen molekülü (HOCl ve *OH) direkt antimikrobiyel etkiye sahiptir. Miyeloperoksidaz reaksiyonunda üretilen hipokloröz asit, bakteri DNA replikasyonunun kesilmesine neden olur (172).

Reaktif oksijen türleri, tiyol gruplarının oksidasyonu ile GSH yada proteinler gibi sülfidril içeren tüm moleküllerin aktivitesi ve/veya konformasyonunu direkt olarak etkileyebilir. Birçok enzim ve membran reseptörleri, tirozin kinaz, kollojenaz, ATPaz, protein kinaz gibi karsinogenezis ve sinyal iletiminde önemli proteinleri etkileyen redoks regülasyonunu etkiler. Buna bilinen en iyi örnek redoks sensitif Nüklear Faktör-B κ (NF- κ B) ve Aktivatör Protein-1 (AP-1)'dir (173).

Reaktif oksijen türleri yüksek reaktivitesi sebebiyle hasarlama eğiliminde, potansiyel toksik mutajenik ve karsinogeniktir. Özellikle *OH; DNA yarıklanması, DNA protein çapraz bağları ve pürinlerin oksidasyonu gibi birçok reaksiyona girer. Eğer DNA tamir sistemi sağlam bir DNA oluşturmazsa replikasyon sırasında mutasyon ile sonuçlanır. Bu mekanizma oksidatif strese maruziyetteki yüksek kanser prevelansını açıklar (174).

Poliansatüre yağ asitleri multipl çift bağ içermesinden dolayı serbest radikal atakları için mükemmel bir hedeftir. Ayrıca sülfür yada selenyum artığı içeren amino asitler de ROT atağına maruz kalma eğilimindedirler (175).

Reaktif oksijen türleri intrasellüler sinyal yolunun mediyatörleri olarak bilinirler. ROT'un aşırı üretimi oksidatif strese, hücre fonksiyon kaybına ve sonuçta apopitoz ve nekroza yol açar. İntrasellüler oksidan ve antioksidan sistem arasındaki denge, hücre fonksiyonu regülasyonu ve büyüme şartlarına adaptasyonu için gereklidir.

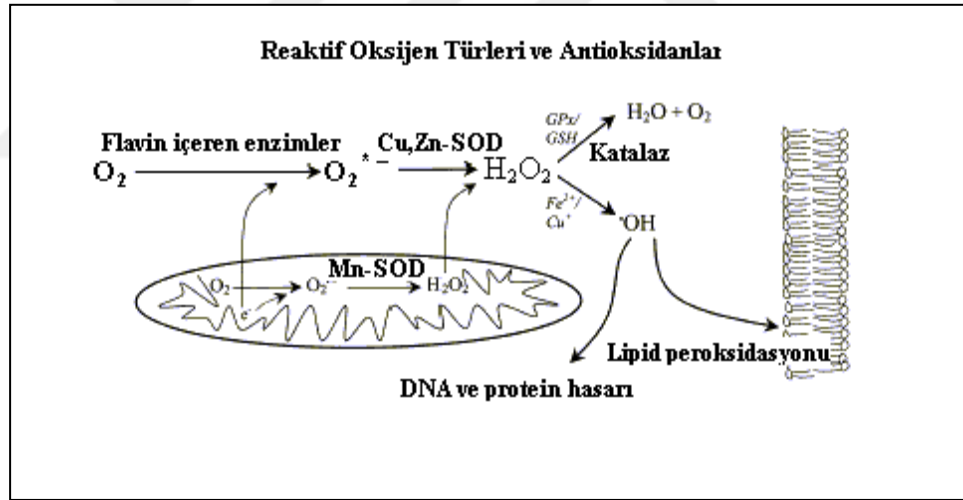
Reaktif oksijen türleri tüm aerobik organizmalarda oluşturulur ve yıkılır. Aşırı üretilmesi durumunda oksidatif stres denen durum ortaya çıkarlar ve sonuçta DNA , lipidler ve proteinlerin yapısına bağlanarak tehlikeli olmaktadır. Mitokondriyal DNA hasarlanmasını da kapsayan yaşlanma prosesinde oksidatif stresin rolü olduğu söylenmektedir (176). Aynı zamanda ROT'un hayatı faydalı fizyolojik kullanımı , redoks düzenlenmesi ve intrasellüler sinyal iletimi gibi farklı alanlardaki araştırmalarla gösterilmiştir. 1987'de tanımlanan nitrik oksit (NO) gen ifadesinin

taininde ve transkripsiyon faktör aktivitesinin düzenlenmesinde görev alır. Hidrojen peroksit ve süperoksitin bu anlamda benzer etkileri vardır (177).

Sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve nörotransmitterler intrasellüler sinyal iletiminde haberci olarak ROT'u kullanırlar (178).

Fizyolojik şartlar altında mitokondriyal elektron transport sistemi tarafından düşük miktarlarda ROT açığa çıkarılırken, mitokondriyal respirasyondaki bir dengesizlik ROT üretimi artışına sebep olabilir (179).

Antioksidan protektif sistem yada radikal yakalayıcılar yetersiz olduğunda anormal ROT üretimi ile mitokondrinin yapısında ve fonksiyonunda değişiklikler beklenmektedir (Şekil IX) (TabloIV).



Şekil IX. Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidanlar

Tablo IV. Temel ROT Molekülleri ve Metabolizmaları				
ROT	Ana Kaynağı	Enzimatik Sistemi	Defans	Ürünler
Süperoksid ($O_2^{\bullet -}$)	Elektron transport sisteminden elektronların “leakege” i Aktive fagositler Ksantin oksidaz Flavoenzimler	Süperoksid Dismutaz (SOD) Süperoksid Redüktaz (bazı bakterilerde)		$H_2O_2 + O_2$ H_2O_2
Hidrojen peroksid (H_2O_2)	$O_2^{\bullet -}$ den SOD aracılığı ile NADPH oksidaz (nötrofiller) Glukoz oksidaz Ksantin oksidaz	Glutasyon peroksidaz Katalaz Peroksiredoksinler(Prx)		$H_2O + GSSG$ $H_2O + O_2$ H_2O
Hidroksil radikali ($\bullet OH$)	$O_2^{\bullet -}$ den ve H_2O_2 den metal geçişi ile			
Nitrik Oksid (NO)	Nitrik oksit sentaz	Glutasyon		Peroksinitrit

2.6.2. Süperoksid Dismutaz

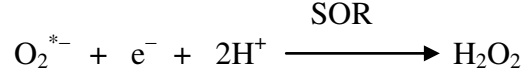
Süperoksid Dismutaz (SOD), ROT metabolizan enzimlerin ilk keşfedilenidir (EC.1.15.1.1). Ökaryotik hücrelerde $O_2^{\bullet -}$, mitokondride mevcut 80-kDa tetramerik Mn-SOD ve sitozolik 32kDa dimerik Cu/Zn-SOD ile hidrojen peroksitle ayrıştırır.



Bakterilerde Mn-SOD, Fe-SOD ve bazen Cu/Zn-SOD bulunur. Mn-SOD eksikliğinde ciddi nörodejeneratif hastalıklar rapor edilmiştir (180).

Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) hastalığında, sitozolik SOD için gen mutasyonu durumu söz konusudur ve enzimin peroksidaz aktivitesi artmıştır (181).

Anaerobik P.furiosus ve T.pallidum’da bulunmuş olan Süperoksid Redüktaz (SOR) süperoksidin direkt redüksiyonunu katalizler ve memelilerdeki durumu açık değildir.



Katalaz ve SOD un kombine subkütan kullanımı oksidatif stresin azaltılması için kullanılacak faydalı bir metod olabilir. Ne yazık ki H_2O_2 'yi yakalayan katalaz süperoksid tarafından inaktive edilir. Ancak SOD'un plazma yarı ömrünün sadece birkaç dakika gibi çok kısa olması ve endotoksin üretimini hızlandırması ile ölüme yol açabilmesi dezavantajıdır (182).

2.6.3. Glutasyon Peroksidaz

Memelilerde en az dört farklı Glutasyon peroksidaz (GPx) vardır ve tamamı kofaktör olarak selenosistein içerir (E.C.1.11.1.9). GPx1 ve GPx4 (ya da fosfolipid hidroperoksid GPx9) sitotoksiktir ve dokuların çoğunda bulunur. GPx 4 matür spermatozoada yapısal bir protein gibi bulunur ve spermatidlerde aktif enzimatik görev alır (183).

GPx2 (gastrointestinal GPx2), GPx3 (plazmada GPx3) sırasıyla gastrointestinal yol ve böbreklerde sentezlenir (184).

Tüm glutasyon peroksidazlar glutasyonu bir sübstrat gibi kullanarak H_2O_2 nin redüksiyonunu katalizleyebilir. Diğer peroksidleri de alkollere indirgeyebilir (175)



Katalitik mekanizma; GPx tarafından selenomatın aktif bölgesinin (Se^-) selenenik aside (SeOH) oksidasyonudur. Bir GSH molekülü ilavesi ile selenik asid, glutasyon (Se-SG) ile birleşerek selenilsülfite dönüşür, ikinci bir GSH ilavesi ile glutasyon disülfid (GSSG) ve aktif selenolat açığa çıkarır. Reaksiyonda iki molekül GSH , memeli ana GSSG redükleyici enzimi olan GR tarafından GSSG ye oksidize olur. Sadece oksidatif stres durumunda önemli olan diğer enzimlere karşın, GPx'ın

fizyolojik şartlar altında da antioksidan önemi olduğunu gösteren veriler vardır (185).

Karaciğer rejenerasyonunun erken fazında (0-24h) total mitokondriyal GSH içeriğinde bir düşme gözlenmektedir. Aynı dönemde glutatyona bağlı proteinlerden olan mitokondriyal proSSG seviyesi de yükselmektedir . Bu fazdan sonra 24 saatte başlangıç GSH seviyelerine ulaşılır ve mitokondriyal proSSH seviyesi tedricen azalır ve PH'den 96 saat sonra kontrol seviyelerine düşer.

2.6.4.Glutasyon Redüktaz (GR)

Hepatik glutasyon (GSH), hücrede oluşturulan hidrojen peroksid düzeyini düşürmesi ve serbest radikaller ile bağlanan bileşikler oluşturması nedeniyle antioksidan etkiye sahiptir (186,187).

Karaciğer rejenerasyonunun erken fazında mitokondriyal glutasyon düzeyindeki düşüşün, PH'yi takiben kc mitokondrisinde reaktif oksijen türlerinin anormal üretimine bağlı olduğunu düşündüren çalışmalar vardır (188).

Serbest protein tiyol gruplarının azalması mitokondriyal proteinlere glutasyon bağlanmasında artış ile birlikte dir.

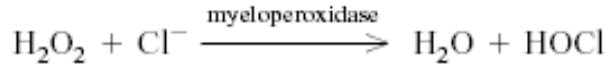
En bol bulunan intrasellüler tiyol kökenli antioksidan GSH'dır. Aynı zamanda en önemli hücre sel antioksidan ve serbest radikal yakalayıcısıdır. Glutasyon, sitozolik ve mitokondriyal GSH olarak iki farklı havuzda bulunur. Bir sülfidril tampon gibi fonksiyon görür ve glutasyon-S transferaz tarafından katalizlenen konjugasyon reaksiyonları yoluyla bileşiklerin detoksifikasyonuna da yardımcı olur. Direkt olarak hidrojen peroksidi de katalizler (189).

Okside glutasyon (GSSG), NADPH bağımlı bir flavoenzim olan glutasyon redüktaz tarafından indirgenir (190).

Glutaredoksinler (Grx), tiyoredoksinler ile aynı görevi yapar. Her ikisi arasındaki majör kalitatif fark, Grx'in GSH'yı indirgeyebilmesi ve indirgenmiş GSH ile protien disülfid yapılar oluşturabilmesidir. Bu da total hücre sel antioksidan defansta önemli bir rol oynar.

2.6.5. Miyeloperoksidaz

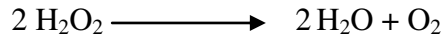
Miyeloperoksidaz (MPO), peroksidaz pozitif granüllerde tanımlanan 150kDa ağırlığında mikrobisidal bir hemoproteindir. Fagozomlardan nötrofil aktivasyonu ile ekstrasellüler alana salgılanır. Miyeloperoksidaz, H₂O₂ ve Cl oksidasyonuna sebep olarak potent oksidan hipokloröz asiti (HOCl) oluşturur. Hipokloröz asit ise mikroorganizmanın membran yüzeyine atak yapan, O₂⁻ ve H₂O₂ 'den 100-1000 kat daha toksik bir oksidan ajandır (191).



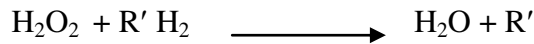
Şekil X. Miyeloperoksidaz Reaksiyon Denklemi

2.4.5. Katalaz

Esas olarak hem içeren enzimlerdir (EC.1.11.1.16). Memeli hücrelerde subsellüler olarak en çok peroksizomlarda bulunurlar. Hidrojen peroksidi su ve moleküler oksijene çevirirler.



Katalaz fenol ve alkol gibi farklı substratların detoksifikasyonunda hidrojen peroksidin eşlikli reaksiyonu yoluyla görev alırlar.



Katalazın antioksidan fonksiyonundan biri Cu ve Fe iyonları tarafından katalizlenen Fenton reaksiyonu yoluyla H₂O₂ 'den hidroksil radikal oluşum riskini azaltmasıdır. Katalaz, NADPH'ya bağlanır, etkisinin artması ve inaktivasyonuna karşı enzimi korur (192,193).

Glukoz 6 Fosfat Dehidrojenaz eksikliğinde matür kırmızı kan hücrelerinde NADPH azalmıştır. Bu sebeple katalazın inhibisyonu ve sonuçta hemoliz meydana gelir (192).

Düşük moleköl ağırlıklı bileşiklerin büyük bir kısmının biyolojik önemli antioksidanlar olduğu düşünülür. Vitamin C, E, selenyum bileşikleri, lipoik asid, melanin, tiyol içeren bileşikler (glutatyon, N-asetil sistein, kaptopril, metiyonin), seks hormonları (östradiol, östron, östriol), α -keto asitler (pirüvat ve α - keto glutarat) , histidin içeren dipeptidler (karnozin, anserin) ve ubikinon (koenzim Q) bunlardandır (194).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya, Patoloji, Nükleer Tıp Anabilim Dalları ve Hakan Çetinsaya Deneysel Araştırma Merkezi'nin işbirliği ile 01.01.2003-30.03.2003 tarihleri arasında gerçekleştirildi.

Deneysel de spektrofotometre (Shimadzu UV 1601), otoanalizör (Konelab 60i), gama sayacı (Berthold LB 2111), derin dondurucu (BOSCH, PHILCO), soğutmalı santrifüj (Sigma 3K 30), hassas terazi (AND GR), pH metre (HANNA HI 9321), su banyosu (Kötterman), etüv (Dedeoğlu), vorteks (Elektromag, velp scientifica 2x³), kronometre, otomatik (Socorex, Gilson) ve cam pipetler, sonikatör (Virsonic 50), kapaklı polistren ve cam tüpler, beher, mezür ve balon jojeler kullanıldı.

Bütün deneylerde, ağırlığı 300-400 gr olan 12 haftalık erkek Wistar albino ratları kullanıldı. Her deney grubundaki rat sayısı operasyon sırasında ve sonrasında olabilecek kayıplar göz önüne alınarak 15 olarak tesbit edildi. Sakrifikasyon anına kadar sağ kalan 51 rat verileri değerlendirmeye alındı. Hayvanlar ısı kontrollü odalarda tutuldu. Cerrahiden önce ve sonraki dönemde standart rat yemi ve yeteri kadar su verildi. Cerrahiden önceki 12 saat boyunca aç kalmaları sağlandı. Çalışma ile ilgili olarak Tıp Fakültesi Etik Kurulunun onayı alındı.

Hepatektomi Prosedürü:

Bütün cerrahi işlemler sabah 08.00-12.00 saatleri arasında ketamin (Ketalar 90mg/kg) ile sağlanan anestezi altında yapıldı. Anestezi sonrası ratlar tartılarak kaydedildi. Laparotomi öncesi bakteriel translokasyonu önlemek amacıyla 30 mg/kg

Cefamezin intramüsküler, 50 IU/kg subkutan heparin uygulandı. Karın cildi traş sonrası batikon ile temizlendi. Üst orta hat insizyon ile yapılan laparotomi sonrasında ratlara %70'lik kc rezeksiyonu uygulandı. Yüzde yetmişlik rezeksiyon kc yetmezliğinin gelişmediği kritik sınır olması nedeniyle seçildi (195). Üçte iki oranında hepatektomi, Higgins ve Anderson tekniğine uygun olarak gerçekleştirildi. Karına girildikten sonra falsiform ligament kesilerek karaciğer serbestleştirildi. Tanımlanan metoda uygun olarak orta ve sol lateral loblar vena kavaya birleşim yerinden 5/0 ipek ile bağlanarak %70'lik karaciğer rezeksiyonu gerçekleştirildi. Çıkarılan ıslak karaciğer dokusu tartılarak kaydedildi. Vena kavanın sağında kalan segmentler karaciğer kitlesinin %30'unu, solunda kalan orta lob ve sol lateral lob ise %70' ini temsil etmektedir (196). Kırksekizinci saatin sonunda sakrifiye edilen ratlardan alınan kc doku ve plazma örnekleri tüplere konularak çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı.

Deney Grupları:

Ratlar 5 gruba ayrıldı. Bu gruplar;

Sham grubu: Serum fizyolojik verilip sham cerrahi (abdominal insizyonla karnın açılıp kc asıcı bağlarının serbestleştirilmesi) uygulandı. Ratlar 48 saat yaşatıldı ve süre bitiminde sakrifiye edilip kan ve doku örnekleri alındı.

Kontrol grubu: Serum fizyolojik verilip sadece parsiyel rezeksiyon uygulandı. Ratlar 48 saat yaşatıldı ve süre bitiminde sakrifiye edilip kan ve doku örnekleri alındı. Total kc ıslak ağırlığı ölçüldü ve çalışma gününe kadar -80 °C' de saklandı. Histolojik çalışma için örnekler formaldehitde bekletildi.

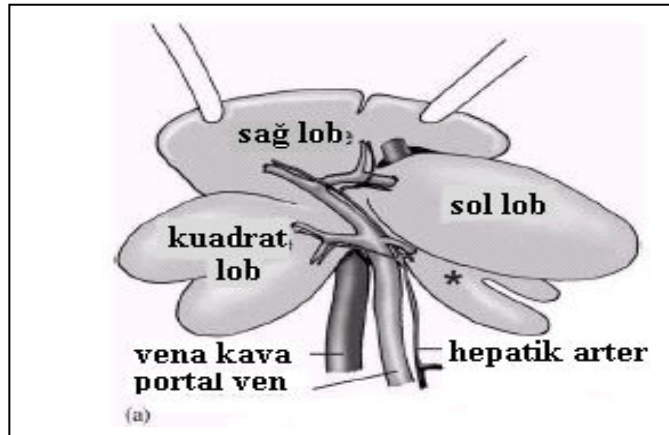
FK506 grubu: Bu gruptaki ratlara FK506, 1 mg/kg/gün dozunda i.p. olarak rezeksiyondan önce günde bir defa olmak üzere iki gün süreyle verildi. Üçüncü doz rezeksiyon tamamlanır tamamlanmaz yapıldı ve ratlar sakrifiye edilecekleri 48. saate kadar yaşatıldı. Kan ve doku örnekleri alındı. Rezeke edilen ve sakrifikasyon anında rejenerasyona uğraması beklenen total kc dokuları bekletilmeden tartıldı ve kaydedildi.

EGb761 grubu: EGb761, 25 mg/kg/gün dozunda i.p. olarak rezeksiyondan önce günde bir defa olmak üzere 2 kez verildi. Üçüncü dozlar operasyon bitiminde yapılarak 48. saatte ratlar sakrifiye edildi. Ratlardan kan ve doku örnekleri alındı ve tartılarak saklandı.

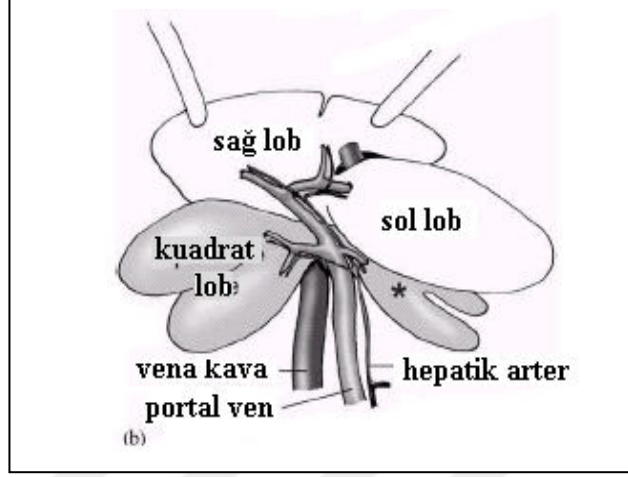
FK506 ve EGb761 grubu: Ratlar 25 mg/kg/gün EGb761 ve 1 mg/kg/gün FK506'yı operasyondan iki gün önce günde bir defa aldılar. Kırksekizinci saatin sonunda hepatektomi yapılan ratların son dozları operasyon tamamlandığında yapılarak ratlar sakrifiye edilerek, kan ve doku örnekleri alındı.



Resim II. Wistar Albino Erkek Rat



Şekil XI. Rat Karaciğer Anatomisi



Şekil XII. Rat Hepatektomi Modeli

3.1. NİSBİ KARACİĞER AĞIRLIĞI HESAPLANMASI

Sakrifikasyondaki kc ağırlığından parsiyel hepatektomi sonrası kalan kc ağırlığı çıkartıldı ve bu değerin tüm kc ağırlığına oranı hesaplandı. Elde edilen değer 100 ile çarpılarak kc rejenerasyon oranı bulundu (197). Tüm kc ağırlığı rat ağırlığının %3,5'ü kabul edildi. Sonuçlar % şeklinde ifade edildi (198).

$$\text{Rejenerasyon Oranı} = \frac{\text{Sakrifikasyondaki kc ağırlığı} - (\text{total kc ağırlığı} - \text{rezeke edilen kc ağırlığı})}{\text{Çıkarılan kc ağırlığı}} \times 100$$

3.2 .MİTOTİK İNDEKS TAYİNİ

Yüzde 10'luk formol içinde saklanan karaciğer örnekleri parafin bloklara gömülerek, 5-7 mikron kalınlığında kesitler alındı ve Hematoksilen-Eosine (H-E) boyası ile boyandılar. Mitozun en fazla olduğu 30 sahadaki mitotik hepatositlerin 1.000 hücreye oranı olarak ifade edilen mitotik indeks elde edildi (199).

3.3. HİSTOPATOLOJİK ANALİZ

Yüzde 10'luk formol içinde saklanan kc örnekleri histopatolojik takibe alındı. Parafin bloklara gömülen spesmenlerden 5-7 mikron kalınlığında kesitler alınarak H-E boyası ile boyandılar. Boyanan preparatlar ışık mikroskopisi altında değerlendirildi. Tüm histopatolojik değerlendirmelerde incelenen preparatın hangi gruba ait olduğu patolog tarafından bilinmeyecek şekilde rastgele örneklem yöntemiyle yapıldı.

3.4. TİMİDİN KİNAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Timidin Kinaz aktivitesi Sangtec Medical marka Prolifigen TK-REA kit ile ölçüldü.

Kit Komponentleri:

1-TK-REA tampon (Vial A)

2-TK-REA Radyoaktif Substrat (Vial B).

total radyoaktivitesi 185 kBq (5 μ Ci) den daha az İyot¹²⁵–iododeoksiüridin içeriyor.

3- TK-REA Sample Dilüent, 0 standart olarak da kullanılabilir (Vial C).

4- TK-REA Standart bovin serumunda liyofilize halde bulunuyor (Vial D 40U/L).

5- TK-REA Yıkama solusyonu 30 x konsantre şekilde bulunuyor.

6- TK-REA separatör tabletleri (Vial F) bir şişede 50 tablet

7- TK-REA yüksek ve düşük kontrolleri.

Reaktif 4, 5 ve 7 de %0,1 den az sodyum azid koruyucu olarak bulunmaktadır.

ÇALIŞMADA KULLANILAN MATERYALLER

1-Polistren test tüpleri

2-20-500 mikrolitrelik pipet ve 1,5 ml'lik dispenser

3-Demineralize su

4-Vorteks

5-Su banyosu 37 °C

6-Aspirasyon sistemi

7-İyot ¹²⁵ için uygun gama sayacı

Numune Toplama, Hazırlama, Saklama:

1-TK'nın kantitatif ölçümü için serum kullanılması önerilir

2-Numune eğer 24 saat içinde çalışılacaksa 2-8 °C'de saklanır, eğer süre 24 saattten uzun ise -18 °C'de saklanır.

3- Lipemik, hemolize ve kontamine örnekler kullanılmaz.

4- 40 U/L den yüksek sonuçlarda tam değeri bulmak için sample diluent ile dilüsyon yapılır. Dilüe örnek iyice çalışmadan önce karıştırılmalı ve final hesaplamada dilüsyon faktörü olarak alınmalıdır.

5- Donmuş örnekler çözündürüldükten sonra iyice karıştırılmalıdır.

Reaktiflerin Kullanımdan Önce Hazırlanması

1-TK-REA Radyoaktif Substrat

27 ml demineralize su ilave edilir ve karıştırılır.

b) TK-REA Radyoaktif Substratı açmadan önce laboratuvar çalışma yüzeyine damlatmadan 13 ml TK-REA tampondan her birine ilave edilir.

2- TK-REA Sample Diluent

4 ml demineralize su ilave edilir ve karıştırılır.

3- TK-REA Standart 40 U/L veya 80 U/L

500µL demineralize su stok solüsyona 40 U/L için yada 250 µL demineralize su 80U/L için standarta ilave edilir.

İyice karıştırılır ve 15 dakika bekletilir. Kullanımdan önce iyice karıştırılmalıdır.

Standart	Dilüsyon
40	
10	100µL Std 40 + 300 sample diluent
2,5	100µL Std 5 + 100 sample diluent
5	100µL Std 10 + 100 sample diluent

olacak şekilde standart seri hazırlandı.

4- TK-REA yıkama solusyonu

Total volüm demineralize su ile 600 ml ye tamamlanır..

5-TK-REA kontrol

herbir kontrole 250µL demineralize su ilave edilir. 15 dakika bekletilir ve kullanmadan önce iyice karıştırılır.

Çalışma Prosedürü:

TK-REA standart dan, hasta örneğinden ve TK-REA kotrolden 20 µL herbir işaretli tüpe pipetlenir.

500µL TK-REA radyoaktif substratttan herbir tüpe pipetlenir.

37 °C’de 4 saat süreyle inkübasyona bırakılır.

Herbir tüpe TK-REA separatör tablet küçük bir forseps yardımı ile konur.

Multi vorteks karıştırıcı ile 15 dakika boyunca karıştırılır.

1,5 ml dilüe yıkama solüsyonu herbir tüpe ilave edilir ve iyice karıştırılır.

Süpernatant dikkatlice alınır.

6. ve 7. Basamaklar üç kez daha tekrarlanır (toplam 4 kez)

Gama sayıcında sayılır.

Metodun CV değeri % 5.5 olarak bulundu.

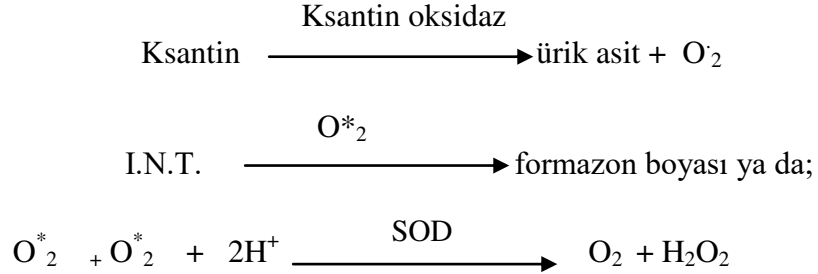


Grafik I. Timidin Kinaz Standart eğrisi

3.5. SÜPEROKSİD DİSMUTAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Süperoksit dismutaz aktivitesi; Beauchamp ve Fridovich'in spektrofotometrik yöntemine dayanan Süperoksit Dismutaz Randox-Ransod marka kiti kullanılarak çalışıldı (200).

Süperoksit dismutaz, oksidatif hasarlanmaya sebep olan ve lipid peroksidasyonu sırasında üretilen toksik süperoksit radikalının dismutasyonunu hızlandırır. Süperoksit radikali SOD yardımı ile moleküler oksijen ve H_2O_2 ye dönüşür. Bu metotda ksantin ve ksantin oksidaz süperoksit radikali üretmek amacıyla kullanılır. Deney ortamında oluşan süperoksit radikaliyle, 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5- phenyltetrazolium klorid (I.N.T) reaksiyona girer. Kırmızı renkli formazon boyası oluşur. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyonunun derecesi ile ölçülür.



Reaktifler:

1. Karışık Substrat: Ksantin 0.05 mmol/L ve I.N.T. 0.025 mmol/L. Bir şişesi 20 ml tampon çözelti ile sulandırılarak hazırlandı.
2. Tampon solusyonu: 3-(Cyclohexylamin)-1-propan sülfonic acid (CAPS) 40 mmol/L EDTA 0.94 mmol/L pH:10.2
3. Ksantin Oksidaz: 80U/L. Bir şişesi 10 ml deiyonize soda çözülerek hazırlandı.
4. Fosfat tamponu: 0.01 M pH 7.0
5. Randox Ransod Standart Cat No. SD125 .

Bir şişesi 10 ml deiyonize su ile çözülerek hazırlandı. Bu SOD enzim konsantrasyonu 5.0 U/ml olan S6 standartına karşılık gelmektedir. Tabloda gösterilmiş olduğu gibi S5: 2.5 U/ml , S4: 1.25 U/ml , S3: 0.625 U/ml, S2 0.312 U/ml konsantrasyonları olan standartlar , dilüsyonlar 10mmol/l pH 7.0 fosfat tamponu ile hazırlandı. S1 (kör) olarak da aynı fosfat tamponu kullanıldı (Tablo V).

TabloV. Süperoksid Dismutaz Aktivitesi Tayininde Standart Hazırlama Prosedürü

	Standart solusyon S2-S6	10 mmol/L pH 7.0 fosfat tamponu
S6 (%100 inhibisyon)	10 ml dilüe edilmemiş standart	—
S5 (%50 inhibisyon)	S6 'nın 5 ml'si	5 ml
S4 (%25 inhibisyon)	S5' in 5 ml 'si	5 ml
S3 (%12.5 inhibisyon)	S4'ün 5 ml 'si	5 ml
S2 (%6.25inhibisyon)	S3 ün 5 ml'si	5 ml
S1= 10 mmol/L pH 7.0 fosfat tamponu		

Ölçüm gününde hazırlanan hemolizat 1:200 oranında fosfat tamponu ile dilüe edildikten sonra uygulanan prosedür spektrofotometrik olarak çalışıldı.

TabloVI. Süperoksid Dismutaz Aktivite Tayini Çalışma Prosedürü

	Reaktif Körü	Standart	Numune
Numune	—	—	0.05 ml
Standart	—	0.05 ml	—
Fosfat tamponu	0.05	—	—
Mikst süstrat	1.7 ml	1.7 ml	1.7 ml
Pipetlenir ve iyice karıştırılır.			
Ksantin Oksidaz	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml

Ölçümler 505 nm dalga boyunda yapıldı. 30. saniyede başlangıç A1 absorbensı okundu ve süre başlatıldı. 3 dakika sonra tekrar A2 absorbensı okunarak ölçüm işlemi sonlandırıldı.

$$\Delta A / dk \text{ (kör, standart veya örnek)} = (A2-A1)/3$$

Kör standart ve numunelerin standart değışimi hesaplandı.

Körün (S1) inhibe olmamış reaksiyon oranı = %100'dür.

Bütün standart ve örnek oranları S1 in yüzdelereine dönüştürüldü ve yüzde inhibisyon vermek için % 100'den çıkarıldı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 - \frac{(\Delta A \text{ Standart} \times 100)}{(\Delta A \text{ S1/dk})}$$

Her bir standart için ayrı ayrı % inhibisyon hesaplandı. Herbir standart için yüzde inhibisyonların log 10'u alınarak, sonuçlar tam sayılara dönüştürüldü. Örneklerin yüzde inhibisyonlarına karşılık gelen konsantrasyonlar standart

eğriden bulundu. Bu şekilde her bir standarta karşılık gelen % inhibisyon standart eğrisi çizildi. Standart eğriden elde edilen örnek konsantrasyonları dilüsyon faktörü ile çarpılarak elde edilen sonuçlar hemoglobine oranlandı. Hemoglobinin tayini siyanomethemoglobin redüksyonu esasına dayanan metod ile gerçekleştirildi.

Sonuçlar; $(\text{SOD U/ml}) / \text{g Hb/ml} = \text{SOD U/g Hb}$ şeklinde verildi.

Metodun CV' si % 6.2 olarak bulundu.



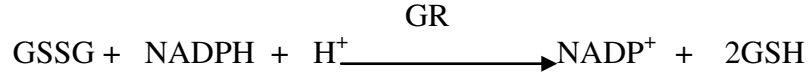
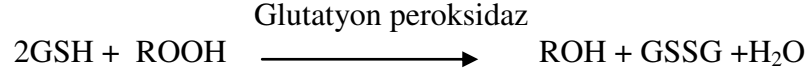
Grafik II.SOD Standart Eğrisi

3.6. GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Glutatyon Peroksidaz aktivitesi; Paglia ve Valentine'in spektrofotometrik yöntemine dayanan GPx Ransel-Randox marka kiti kullanılarak çalışıldı (201).

Glutatyon Peroksidaz kümen hidroperoksidi tarafından GSH oksidasyonunu katalizler. Glutatyon redüktaz ve NADPH varlığında GSSG, NADPH'ın NADP^+ ye eşzamanlı oksidasyonu ile indirgenir. Bunun derecesi 340 nm dalga boyunda ölçülür.

Reaksiyon Prensipleri:



Numune Hazırlama

Çalışmada heparinize tam kan kullanıldı. Örnekler 0.05 ml tam kan ve 2 ml dilüsyon ajanı olacak şekilde dilüe edildi.

Reaktifler

1.Reaktif

Glutasyon 4 mmol/l

Glutasyon Redüktaz $\geq 0.5\text{U/l}$

NADPH 0.34 mmol/l

2.Tampon

Fosfat Tamponu 0,05 mol/l; pH 7.2

EDTA 4,3 mmol/l

3.Kümen hidroperoksid 0.18 mmol/l

4.Dilüsyon Ajanı

Tablo VII. Glutasyon Peroksidaz Tayini Çalışma Prosedürü

	Dilüe Numune	Reaktif Köru
Dilüe Numune	0.02 ml	----
Distile su	----	0.02ml
Reaktif	1.00 ml	1.00 ml
Kümen	0.04 ml	0.04ml

Küvete pipetlendi ve karıştırılarak numunenin ve reaktif körünün ilk dakika, birinci ve ikinci dakikalardaki absorbansları okundu.

Hesaplama:

Glutasyon peroksidaz konsantrasyonu şu formül ile hesaplandı:

$$U/L \text{ Hemolizat} = 8412 \times \Delta A \text{ 340 nm / dakika}$$

Sonuçlar Drabkins metodu ile çalışılan hemoglobin üzerinden

$$(SOD \text{ U/ml}) / (g \text{ Hb/ml}) = SOD \text{ U/ gr Hb şeklinde verildi.}$$

Metodun CV'si % 4.5 olarak bulundu.

3.7. GLUTATYON REDÜKTAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Glutasyon Redüktaz aktivitesi; Goldenberg ve Spooner'in spektrofotometrik yöntemine dayanan Glutasyon redüktaz, Ransel-Randox marka kiti kullanılarak çalışıldı (202).

Reaktifler		
1. Tampon	Potasyum fosfat	250mmol/L pH 7.3
	EDTA	0.5 mmol/L
2. Substrat	GSSG	2.2 mmol/L
3. NADPH	0.17 mmol/L	

Reaktiflerin Hazırlanması ve Stabilitesi

Tampon +2 ile +8 ⁰C arasında son kullanma tarihine kadar saklanabilir.

Substrat tamponun 5 ml'si ile sulandırılır.

NADPH 3 ml distile su ile sulandırılır 2 ⁰C'de 2 gün stabil kalır.

Prosedür:

Dalga boyu 340 nm

Küvet 1 cm lik ışık yolu

Sıcaklık	37 °C
Ölçüm	havaya karşı
Küvete pipetlenecekler	
Dilüe lizat	40 µl
Sübrat	1000 µl
İyice karıştırıldı.	
NADPH	200 µl

Karıştırıldı ve birinci dakikadan itibaren 2., 3., 4. ve 5. dakika okumaları yapıldı.

Hesaplama

a) U/L tam kan 0 4983 X ΔA 340 nm/dk X dilüsyon faktörü

b) Hemoglobin değerleri U/ g a çevrilir.

Değer glutatyon redüktaz değerine bölünerek hemoglobin başına sonuç verilir.

Metodun CV'si % 5.0 olarak bulunmuştur.

3.8. MİYELOPEROKSİDAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Plazma MPO aktivitesi tayininde Bradley ve arkadaşları tarafından geliştirilen spektrofotometrik metod kullanıldı (203).

Metod, peroksidaz substratı olarak bilinen O-dianisidin, H₂O₂ varlığında MPO tarafından oksitlenerek sarı turuncu renkli bir ürün oluşturması ve bu oksidasyon reaksiyonunun zamana bağlı optik dansite artışının 460 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır.

Reaktifler

1- Potasyum fosfat tamponu , 50 mM , pH 6.0

2-O-Dianisidin dihidroklorid (tampon içinde günlük kullanılacak şekilde hazırlanır).

3- %0.0005 H₂O₂ substratı O-Dianisidin içeren tampon içerisinde taze hazırlanır.

Tablo VIII. Miyeloperoksidaz Çalışma Prosedürü

	Numune	Kontrol
H ₂ O ₂ substratı	2.9 ml	2.9 ml
Deiyonize su	-	0.1 ml
Plazma	0.1 ml	-

Pipetleme işleminden hemen sonra, 460 nm dayga boyunda 25 °C de deiyonize suya karşı, numune ve kontrol tüplerindeki optik dansite artışı 6 dakika boyunca kaydedildi.

Hesaplama:

Numune ve kör tüpleri için $\Delta OD/dk$ değerleri hesaplandı.

Bir ünite MPO standart deney şartlarında dakikada 1 μ mol O-dianisidinin oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

Okside O-dianisidinin molar ekstinksiyon katsayısı üzerinden ($\epsilon = 1.13 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ünite birimlerine geçildi.

$$U/L = \frac{\Delta OD/dk}{\epsilon} \times \frac{\text{Total hacim ml}}{\text{Plazma hacmi ml}} \times 10^6 \mu\text{mol/mol}$$

$$U/L = \frac{\Delta OD/dk}{1.13 \times 10^4} \times \frac{3.0}{0.1} \times 10^6$$

$$U/L = \Delta OD/dk \times 2564.8$$

Plazma örneklerinde MPO aktivitesi , litre plazma başına verildi (Ü/L).

Prosedür CV' si % 7.4 olarak bulunmuştur..

3.9. DOKU MDA TAYİNİ

Rat kc dokusu MDA tayininde, Okhawa ve ark.(204) tarafından geliştirilen metod kullanıldı. Lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek 532 nm'de absorbands veren kompleks oluşturması esasına dayanan metoda göre sonuçlar verildi.

Reaktifler:

% 8.1 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

% 20 lik Asetik asit (pH 3,5 olacak şekilde NaOH ile ayarlandı)

% 0.8 TBA (taze hazırlanır)

n-Butanol/ pridin karışımı (15:1;v/v)

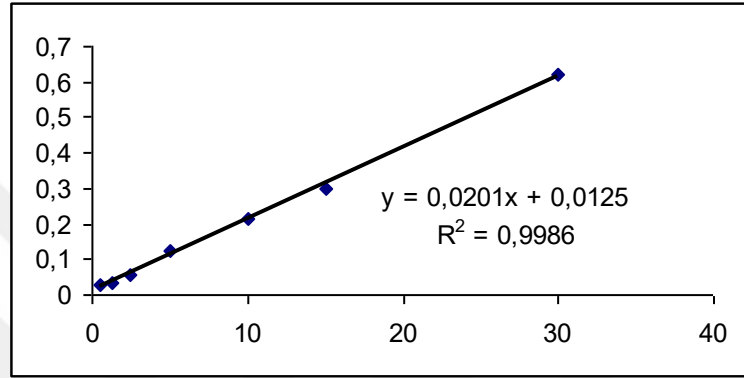
5.848 M MDA (Malondialdehid bis (dimetil asetal) stok standartı

Prosedür:

Rat kc dokusu % 10 (w/v) olacak şekilde pH 7.4 fosfat tamponu içinde homojenize edildi. Dokular santrifüj edildi ve süpernatant MDA ölçümünde kullanıldı.

Süpernatantlardan 0.1 ml alınarak kapaklı cam tüplere aktarıldı. Üzerlerine sırasıyla 0.1 ml SDS, 0.75 ml asetik asit , 0,75 TBA ve 0.3 ml distile su ilave edilerek vortekslendi. Kapakları sıkıca tüpler kaynar su banyosunda 60 dakika tutuldu. Süre bitiminde tüpler musluk suyu altında soğutuldu. Soğuyan tüplere 0.5 ml distile su ve 2.5 ml n- butanol-pridin karışımı ilave edilerek iyice vortekslendi. Tüp içerikleri PVC tüplere aktarıldı ve 4 °C'de 4000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Tüplerin üst kısmındaki pembe renkli organik fazın absorbandsı 532 nm de, distile su ile aynı şekilde çalışılan köre karşı okundu. Değerlendirme standart eğri üzerinden

yapıldı. Standart seri hazırlamak için stok MDA çözeltisinden 100 nmol/ml konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı. Ara stoktan 2,5; 5; 10; 20; 40; 50 nmol/ml konsantrasyonda olacak şekilde çalışma satandartı hazırlandı. Standart serinin her birinden 0.1 ml alınarak numune gibi çalışıldı ve standart eğrisi çizildi (Grafik III)



Grafik III. Doku MDA Standart Eğrisi

3.10. PLAZMA MDA TAYİNİ

Stocks ve Dormandy tarafından geliştirilen metod kullanıldı (205). Metoda göre MDA oluşumu in vitro lipid peroksidasyonunun bir indeksi olarak kabul edildi.

Reaktifler

1. Fosfat tamponlu salin (PBS) pH: 7.4

(8.1 g NaCl + (2.302 g Na₂HPO₄) distile suda çözündürülerek 1000 ml ye tamamlanır.)

2. 154 mM NaCl

3. % 30 luk TCA

4. 0.1 M EDTA

5. % 1 lik TBA (0.05 M NaOH içinde hazırlanmış)

6. 5.848 M MDA bis (dimetil asetal) stok satandart çözeltisi

Prosedür:

Deney tüplerine sırasıyla

0.4 ml plazma

1.6 ml PBS

1 ml % 30 TCA

pipetlenerek vortekslendi. Tüpler iki saat süreyle buz banyosunda inkübe edildi ve 2000 x rpm de 15 dakika süreyle santrifüj edildi.

Süpernatantlardan 3 ml alınarak ağzı kapaklı tüplere aktarıldı ve üzerlerine sırasıyla

0.15 ml 0.1 M EDTA

0.5 ml % 1 TBA

Pipetlenerek 15 dakika 100 °C'lik su banyosunda tutuldu. Tüpler soğuduktan sonra 0.4 ml distile su ile çalışılan kör tüpüne karşı, her tüpün absorbans değeri spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda okundu. Değerlendirme, MDA-TBA reaksiyonu sonucu oluşturulan; 0.5, 1.25, 2.5, 5, 10, 15, 30 µmol/L konsantrasyonlarına karşılık gelecek şekilde hazırlanmış standart eğri üzerinden yapıldı.

3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

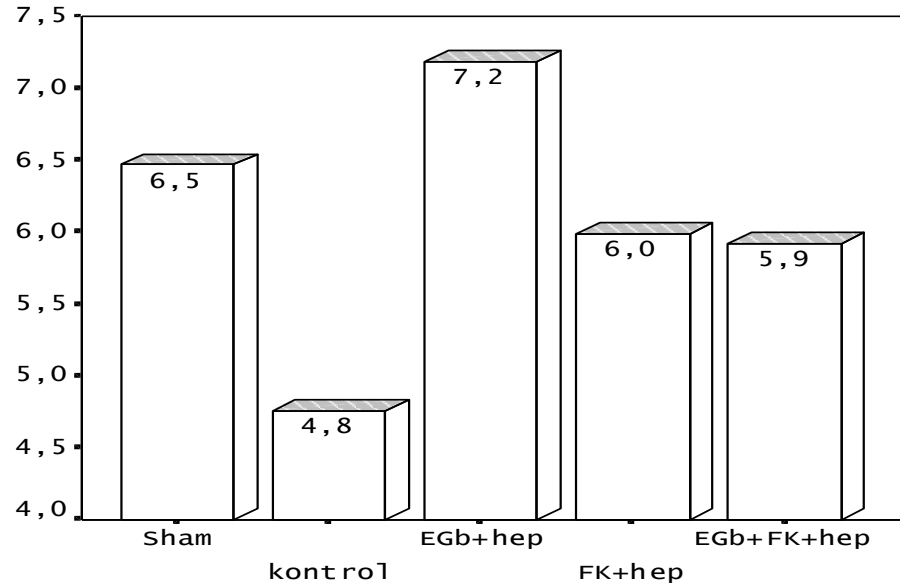
İstatistiksel değerlendirme için veriler Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)'in 10.0 version programına girildi. Elde ettiğimiz bütün verilerde ortalama ve standart sapmalar hesaplandı. Gruplardaki biyokimyasal ve histopatolojik değerlerin karşılaştırılmasında, ikiden çok bağımsız örneklem ortalamasının karşılaştırılmasında kullanılan One Way ANOVA testi kullanıldı. Gruplardaki çoklu karşılaştırmalarda ise Post-Hoc Scheffe prosedürü uygulandı. Parametreler arasındaki ilişki pearson korelasyon testi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

Deneylerde ağırlığı 300-400 gr olan 12 haftalık erkek Wistar albino ratları kullanıldı. Her deney grubundaki rat sayısı operasyon sırasında ve sonrasında olabilecek kayıplar göz önüne alınarak 15 olarak tesbit edildi. Sakrifikasyon anına kadar sağ kalan 53 ratın verileri değerlendirmeye alındı. Ratlar; sham grubu, kontrol grubu, FK506 verilip hepatektomi yapılan grup, FK506 ve EGb761 verilip hepatektomi yapılan grup ve EGb761 verilip hepatektomi yapılan grup olarak beşe ayrıldı.

Plazma örneklerinde tayin edilen; TK, GPx, GR, SOD, MPO (plazma ve doku), TBARS (plazma ve doku), total ve direkt bilirubin, AST, ALT, ALP, LDH, GGT, total protein, ürik asit, kolesterol, HDL, LDL, trigliserid düzeyleri ile karaciğer rejenerasyon hızı, sakrifikasyon anındaki kc ağırlıkları, mitotik indeks değerleri bakımından deney grupları aralarında karşılaştırıldı.

Çalışma grubu verilerden elde edilen grup ortalama değerleri, hazırlanan tablolarda, aritmetik ortalama ve standart sapma ($X \pm SD$) şeklinde verildi. Her bir gruptaki rat sayısı, tablolarda “n” olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.



Grafik IV. Sakrifikasyon Anındaki Rat Total Kc Ağırlıklarının Karşılaştırılması

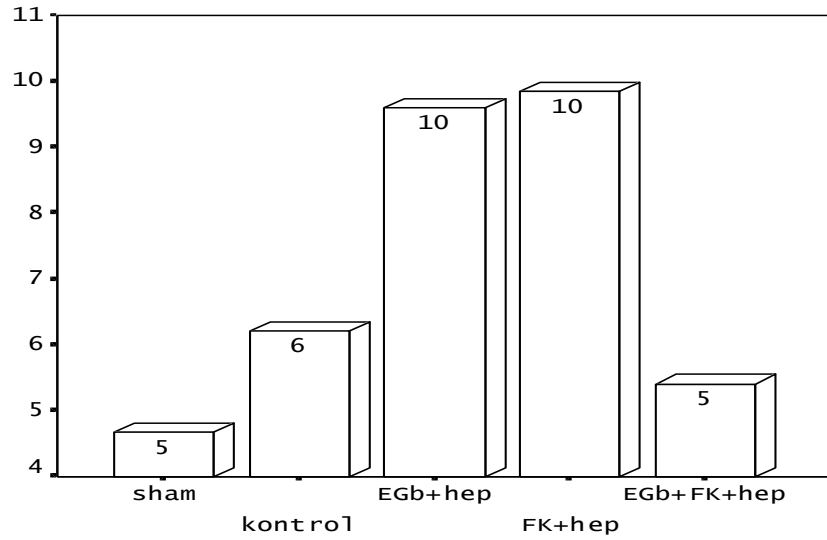
Sakrifiye edildikten sonra elde edilen rat ıslak kc ağırlıkları karşılaştırıldığında; EGb761+hep, FK506+hep ve EGb761+FK506+hep gruplarının her üçünde de kontrole göre yükseklik vardı. EGb761+hep grubundaki yükseklik ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$) (Grafik IV) (Tablo IX).

Tablo IX. Rat ağırlıkları

Parametreler	Sham (n: 10) X±SD	Kontrol (n: 11) X±SD	Egb+hep (n: 11) X±SD	FK+hep (n: 10) X±SD	Egb+FK+hep (n: 11) X±SD	P
Ratların Ağırlıkları (gr)	322,7± 36,7	366,8± 37,0	344,2± 34,8	342,9±38,5	337,6±39,37	0,196
Rezeke Edilen Kc Ağırlığı (gr)	yok	7,9±1,1	8,1±1,3	7,1±0,9	7,6±0,4	0,086
Formüle Göre Tahmini Kc Ağırlığı (gr)	yok	11,6±1,1	11,7±1,1	11,6±1,3	11,4±1,3	0,196
Sakrifiye Edildikten Sonraki Total Kc Ağırlığı (gr)	6,4 ± 1,1 ^b	4,7± 0,6 ^{a,c}	7,1±1,2 ^b	5,5±0,8	5,5±0,9	0,000*

Scheffe prosedürüne göre; a. Sham grubuna göre farklı olan grubu gösterir. b: Kontrol grubuna göre farklı olan grubu gösterir. c: EGb+hep grubuna göre farklı olan grupları gösterir. d:FK+hep grubuna göre farklı olan grubu gösterir. e: EGb+Fk+hep grubna göre farklı olan grubu gösterir.

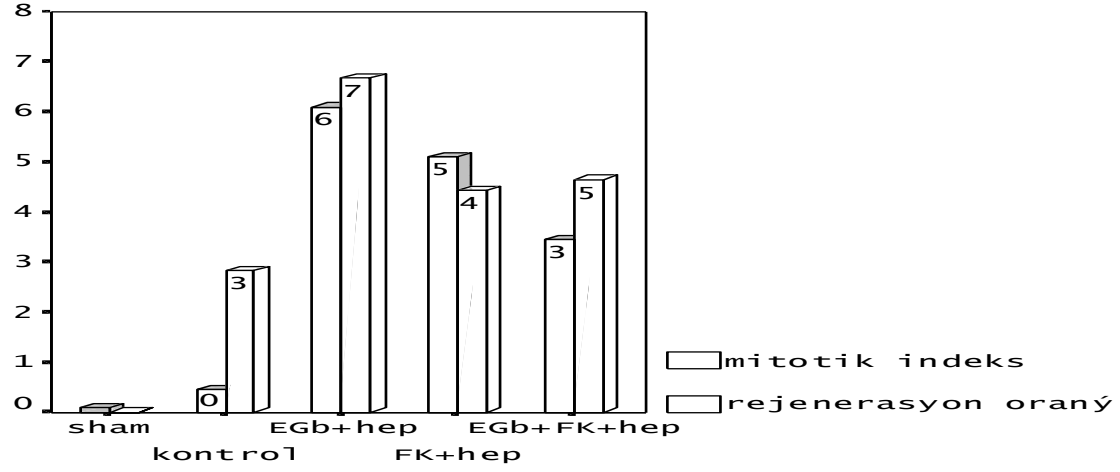
Rejenerasyon parametrelerimizden birisi olan TK değerlerine baktığımızda; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olan farklılık görüldü ($p<0.001$). EGb761+hep ve FK506+hep grubu sham grubuna göre, FK506+hep grubunda, FK506+EGb761+hep grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olan yükseklik bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubu TK değerleri, FK506+hep, EGb761+hep ve EGb761+hep grubuna göre düşük bulunmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır ($p>0.05$) (Grafik V) (Tablo XI).



Grafik V. Timidin kinaz değerlerinin karşılaştırılması

Sham kontrol grubu rejenerasyon hızı değerlendirmesine alınmadı. Rejenerasyon hızı değerleri; EGb761+hep grubunda her üç gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olan yükseklik bulundu ($p<0.000$). EGb761+hep, EGb761+FK506+hep grubuna göre, EGb761+FK506+hep grubu da, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olan yükseklik gösterdi (Grafik VI) (Tablo X).

Mitotik indeks oranları; EGb761+hep ve FK506+hep grubunda hem kontrol hem de sham gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olan yükseklik görüldü ($p<0.000$) (Grafik VI) (Tablo X). Çalışma gruplarından elde edilen karaciğer histolojik kesit mikroskopileri Resim III, IV, V, VI'da gösterilmiştir.

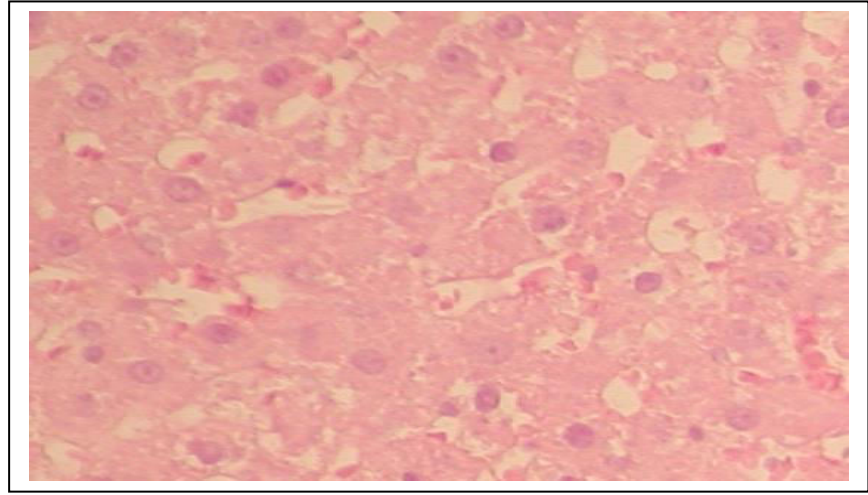


Grafik VI. Mitotik indeks ve regenerasyon oranlarının gruplar arası karşılaştırılması

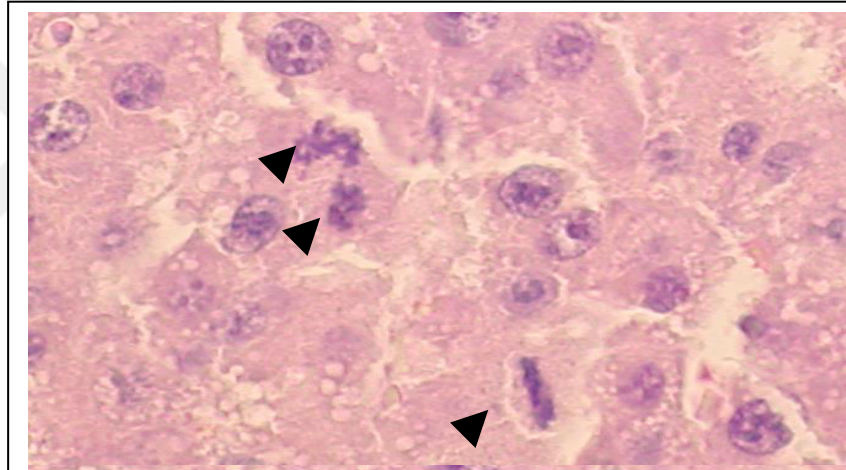
Tablo X. Regenerasyon Parametreleri

Parametreler	Sham (n: 10) X±SD	Kontrol (n: 11) X±SD	Egb+hep (n: 11) X±SD	FK+hep (n: 10) X±SD	Egb+FK+hep (n: 11) X±SD	P
Timidin Kinaz (U/L)	4,6± 1,0 ^{c,d}	6,2±3,3	9,5±4,08 ^a	9,8±2,9 ^{ae}	5,4±3,13 ^d	0,000*
Regenerasyon Hızı(%)	yok	2,9±0,1 ^{ce}	6,6 ±1,3 ^{bde}	4,4 ±1,7 ^c	4,6 ±1,6 ^{bc}	0,000*
Mitotik İndeks (%)	0,1±0,1 ^{cd}	0,4±0,8 ^{cd}	6,1±5,4 ^{ab}	5,2±4,0 ^{ab}	3,4±2,2	0,000*

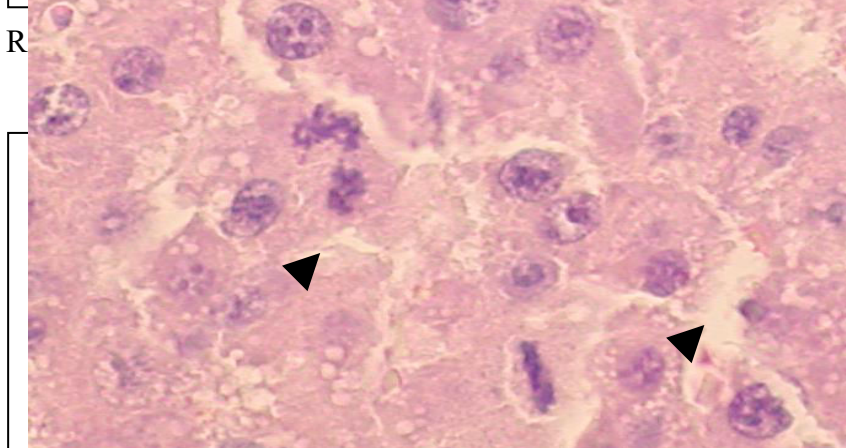
Scheffe prosedürüne göre; a. Sham grubuna göre farklı olan grubu gösterir b: Kontrol grubuna göre farklı olan grubu gösterir. c: Egb+hep grubuna göre farklı olan grupları gösterir.d: FK+hep grubuna göre farklı olan grubu gösterir. e: Egb+Fk+hep grubna göre farklı olan grubu gösterir.



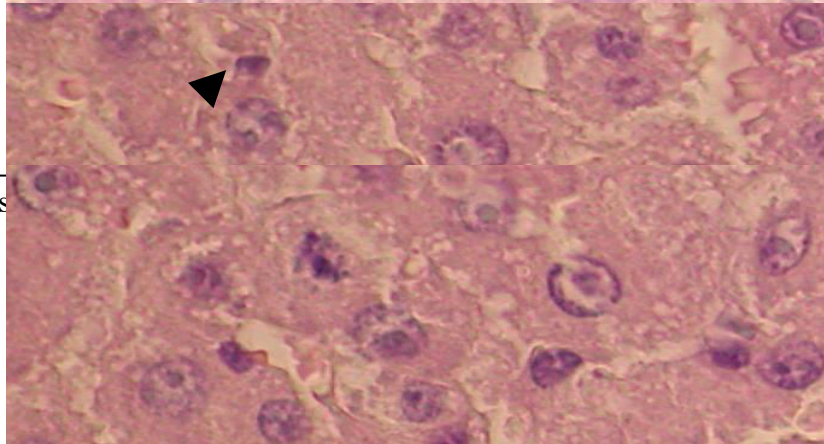
Resim III. Kontrol grubu karaciğer dokusu mikroskopik görünümü

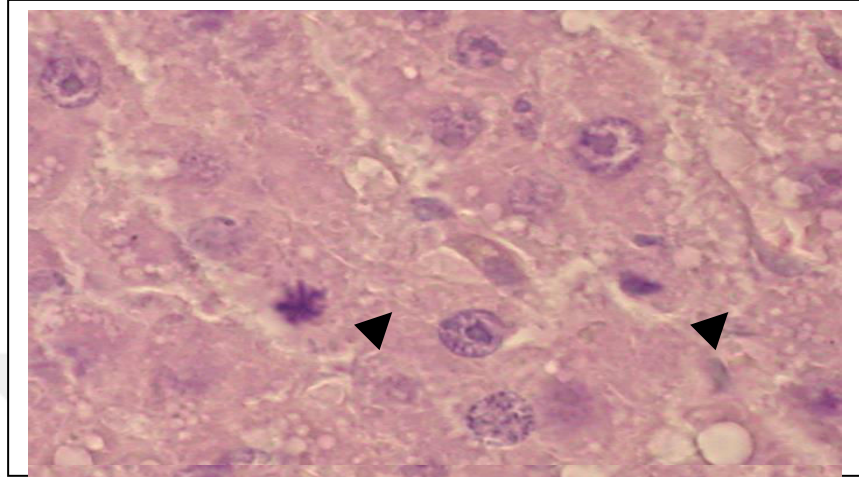


Resim IV. Kontrol grubu karaciğer dokusu mikroskopik görünümü



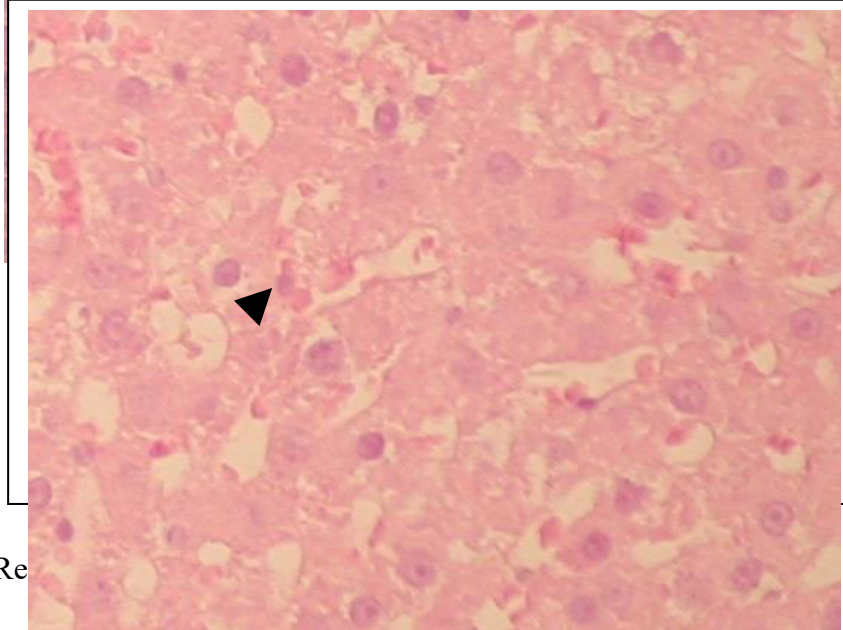
Resim V. Kontrol grubu karaciğer dokusu mikroskopik görünümü



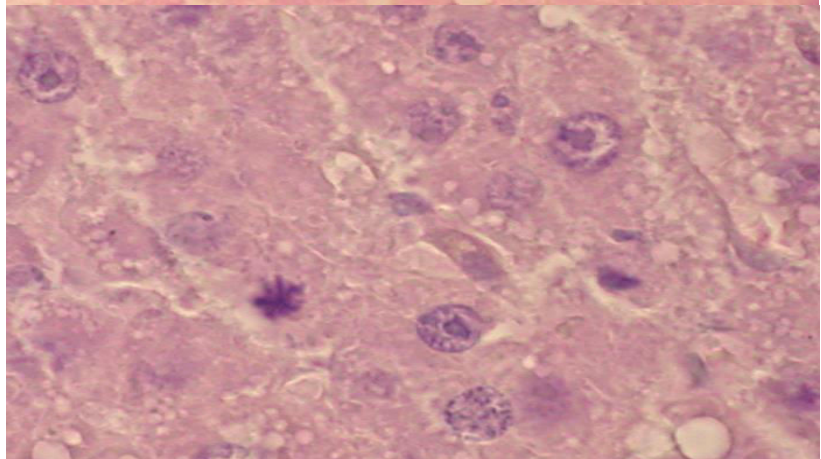


Re

ünümü



Re



Tablo XI. Rutin Biyokimya Parametreleri

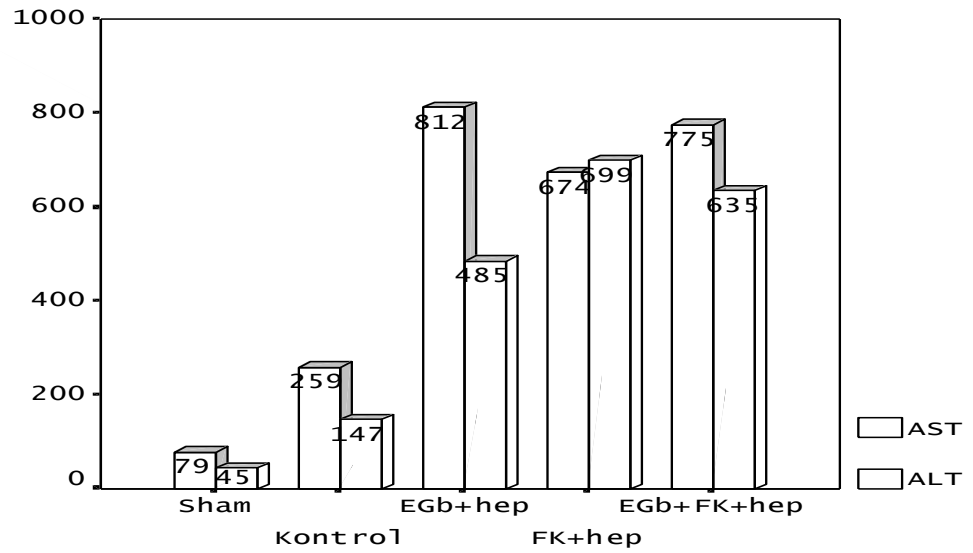
Parametreler	Sham (n:10) X±SD	Kontrol (n: 11) X±SD	Egb+hep (n: 11) X±SD	FK+hep (n: 10) X±SD	Egb+FK+hep (n: 11) X±SD	P
Total bilirubin (mg/dl)	0,4 ±0,1	0,5±0,1	1,3±1,9	1,7±2,5	1,8 ±1,8	0,169
Direkt bilirubin (mg/dl)	0,5 ± 0,1	0,6±0,5	1,1±1,6	1,5±2,3	1,6±1,6	0,198
ALT (U/L)	44,4 ± 0,6 ^{bcd}	417,3±319,4 ^a	484,5±489,5 ^a	666,2±626,6 ^a	654,9±535,8 ^a	0,004*
AST (U/L)	78,6 ±13,3 ^{bcd}	348,8±174,7 ^a	811,7±792,2 ^a	612,1±342,5 ^a	775,9±605,7 ^a	0,004*
GGT (U/L)	19,2±3,2	21,9±17,7	21,5±21,1	12,5±4,5	12,9±8,7	0,286
ALP (U/L)	154±27 ^b	292,1±138,3 ^{acde}	929,8±567,5 ^{ab}	966±627,5 ^{ab}	974,5±460,3 ^{ab}	0,001*
LDH (U/L)	815±74 ^{cde}	1472±495	1559±413 ^a	1880±696 ^a	1680±655 ^a	0,000*
Total protein (g/dl)	7,0±0,2 ^{bcd}	6,3±0,3 ^{acde}	5,3±0,3 ^{ab}	5,3±0,3 ^{ab}	5,4±0,3 ^{ab}	0,000*
Ürik asit (mg/dl)	1,6 ± 0,5 ^{de}	1,9±0,3 ^{cde}	1,2±0,2 ^b	0,7±0,3 ^{ab}	0,9±0,2 ^{ab}	0,000*
Trigliserid (mg/dl)	89±25 ^b	49,0±13,25 ^{ac}	78,1±12,0 ^b	66,1±15,7	70,4±22,3	0,001*
Kolesterol (mg/dl)	128±26 ^{bcd}	48,8±14,7 ^{ace}	85,0±18,5 ^{ab}	77,5±22,7 ^a	71,0±21,1 ^a	0,001*
HDL (mg/dl)	107,1±23,8 ^{bcd}	25,4±9,2 ^a	35,0±10,9 ^a	25,6±15,0 ^a	30,7±20,4 ^a	0,000*
LDL (mg/dl)	3,4±1,7 ^{cd}	13,8±10,5	34,1±23,6 ^a	38,5±32,6 ^a	25,8±28,7	0,005*

Scheffe prosedürüne göre; a. Sham grubuna göre farklı olan grubu gösterir b: Kontrol grubuna göre farklı olan grubu gösterir .c: EGb+hep grubuna göre farklı olan grupları gösterir.d: FK+hep grubuna göre farklı olan grubu gösterir. e: EGb+Fk+hep grubuna göre farklı olan grubu gösterir.

Rutin biyokimya parametreleri Tablo XI’de gösterildi.

Total ve direkt bilirubin değerleri arasında ilaç uygulanan gruplarda yüksek ancak bu istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p>0.05$).

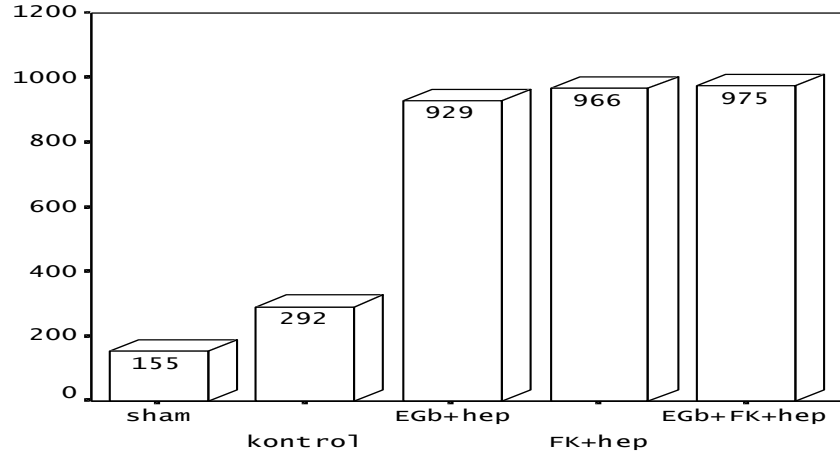
Aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz değerlerini incelediğimizde; sham grubuna göre, diğer çalışma gruplarının dördünde de istatistiki olarak anlamlı olan yükseklik görüldü ($p<0.05$) (Grafik VII).



Grafik VII. AST ve ALT değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

Gama-glutamil transferaz değerlerinde, FK506+hép ve EGb761+FK506+hép gruplarında diğer gruplara göre düşüklük vardı. Ancak bu istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p>0.05$).

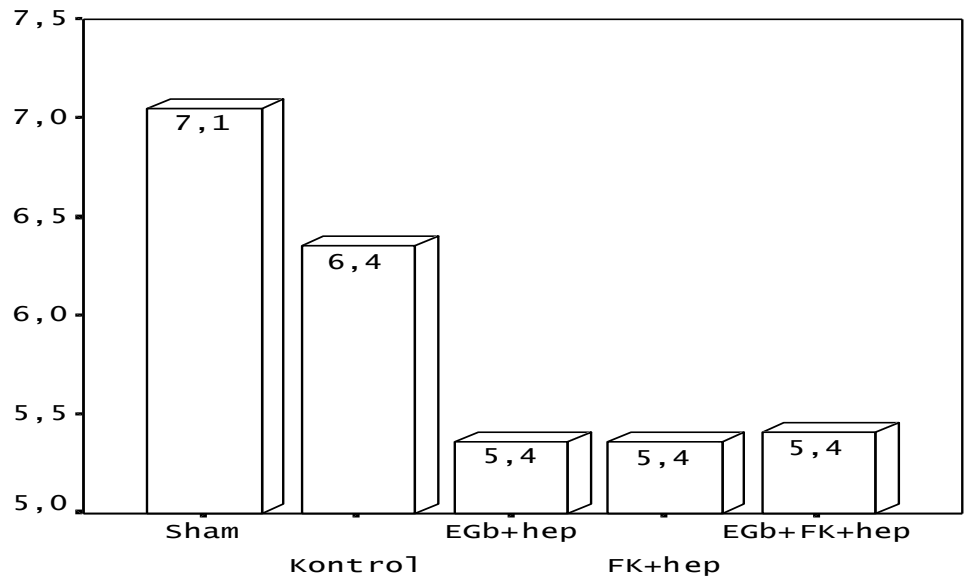
Alkalen fosfataz değerlerini incelediğimizde; ilaç verilen gruplarda kontrol ve sham gruplarının her ikisine göre, kontrol grubunda da sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yükseklik bulundu ($p<0.001$) (Grafik VIII).



Grafik VIII. Alkalen fosfataz değeri gruplar arası karşılaştırılması

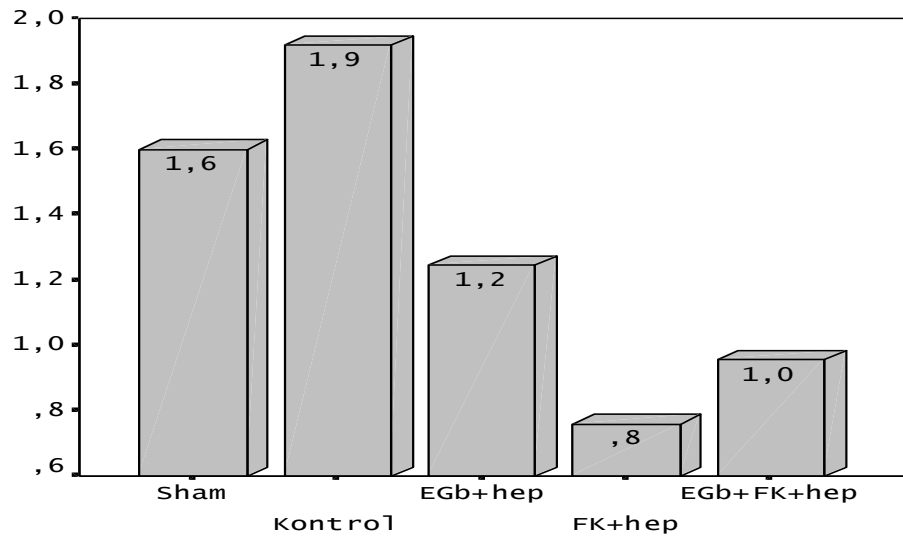
Laktik dehidrojenaz değeri, ilaç verilen 3 grupta da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), sham grubuna göre ise istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) olduğu görüldü.

Total protein değeri karşılaştırıldığında; ilaç verilen gruplarda kontrol ve sham gruplarına göre, kontrol grubunda da sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüklük görüldü ($p<0.000$) (Grafik IX).



Grafik IX. Total protein değeri gruplar arası karşılaştırılması

Ürik asit değerleri karşılaştırıldığında; ilaç verilen her üç grupta da kontrol grubuna göre, FK506+hep ve EGb761+FK506+hep gruplarında da sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olan düşüklük bulundu ($p<0.001$) (Grafik X).

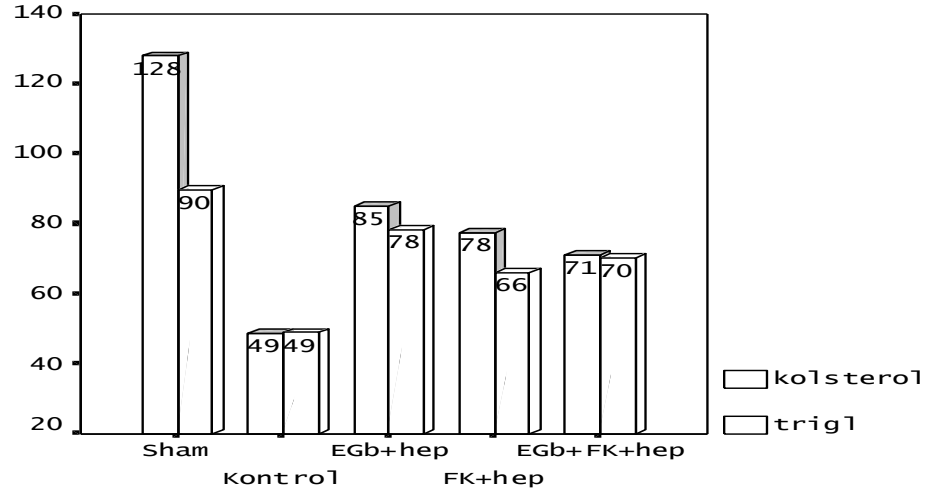


Grafik X. Ürik asit değerlerinin gruplar arası karşılaştırması

Elde ettiğimiz total kolesterol değerlerine baktığımızda; tüm gruplardaki total kolesterol değerleri, sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olan düşüklük, EGb761+hep grubunda da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olan yükseklik görülmüştür ($p<0.001$) (Grafik XI).

Trigliserid değerleri EGb761+hep ve sham grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yükseklik bulundu ($p>0.05$), FK506+hep ve EGb761+FK506+hep gruplarında da kontrol grubuna göre yüksekti ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$) (Grafik XI).

Diğer bir lipid parametremiz olan HDL değerlerini incelediğimizde; ilaç verilen gruplarda ve kontrol grubunda, sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüklük bulunurken ($p<0.001$), LDL değerlerinde ise; EGb761+hep ve FK506+hep gruplarında, sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yükseklik bulundu ($p<0.001$).

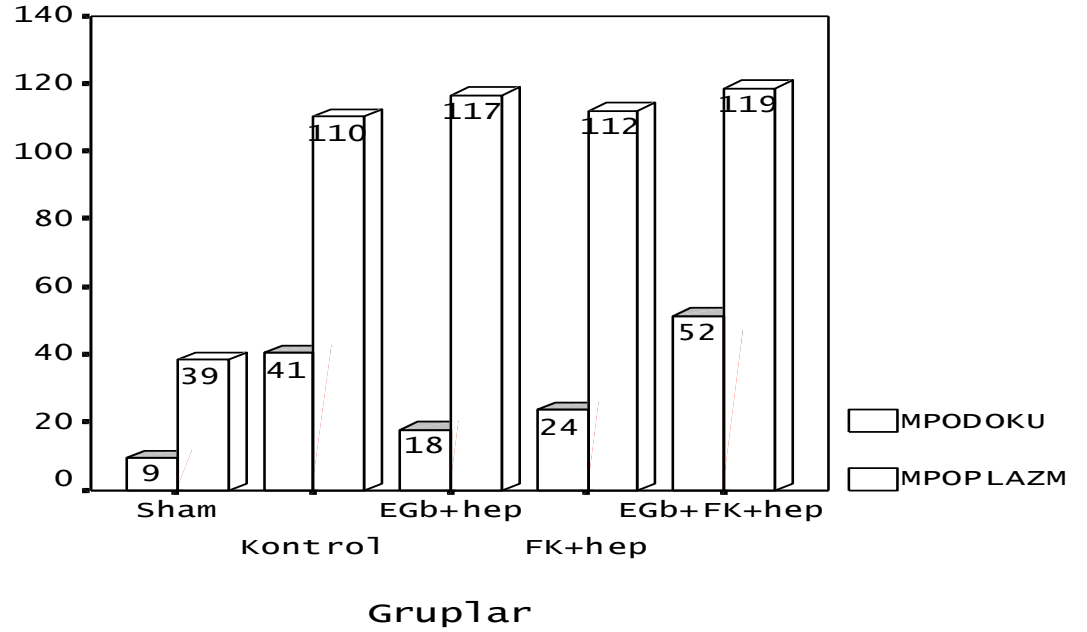


Grafik XI. Kolesterol ve trigliserid düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması

Antioksidan enzim parametrelerimizden SOD ve GPx’da, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olan farklılık görülmezken ($p>0.05$), GR; FK506+hép grubunda, sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olan yükseklik görüldü ($p<0.05$).

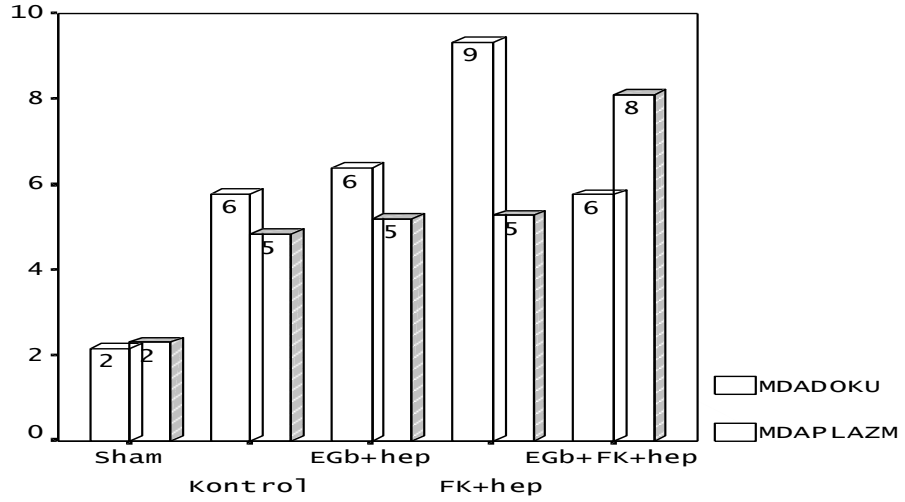
Miyeloperoksidaz doku değerleri karşılaştırıldığında; EGb761+hép grubunda, kontrol ve EGb761+FK506+hép grubuna göre, FK506+hép grubunda da, EGb761+FK506+hép grubuna göre istatistiksel olarak da anlamlı düşüklük bulundu. Sham grubunda da diğer dört gruba göre düşüklük olmakla birlikte sadece kontrol ve EGb761+FK506+hép gruplarından olan düşüklük istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$) (Grafik XII).

Miyeloperoksidaz plazma değerleri karşılaştırıldığında ise; ilaç verilen gruplarda, sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olan ($p<0.05$), kontrol grubuna göre ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan ($p>0.05$) yükseklik görüldü (GrafikXII).



Grafik XII. Miyeloperoksidaz doku ve plazma değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

TBARS doku değerleri; Egb761+hep grubunda, sham grubundan istatistiksel olarak anlamlı yüksek, FK506+hep grubundan ise düşük bulundu. FK506+hep grubunda doku TBARS değerlerinin diğer dört gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu görüldü. Egb761+FK506+hep grubunda, Egb761+hep ve FK506+hep gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düşüklük izlendi ($p<0.001$). TBARS plazma değerlerine baktığımızda; ilaç verilen üç grupta da plazma TBARS değerleri, kontrol ve sham gruplarına göre yüksekti. Bu yükseklik sham grubunda anlamlı iken ($p<0.05$), kontrol grubunda anlamsız bulundu ($p>0.05$). Egb761+FK506+hep grubundaki, diğer dört gruba göre izlenen TBARS yüksekliği, istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.001$) (Grafik XIII).



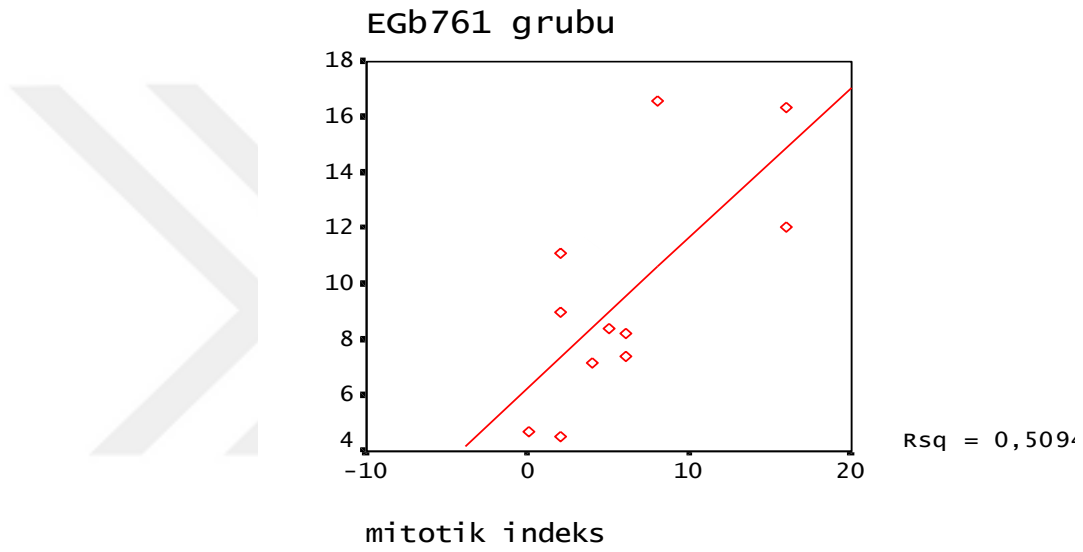
Grafik XIII. TBARS düzeylerinin karşılaştırılması

TabloXII. Antioksidan Enzim Parametreleri

Parametreler	Sham (n: 10) X±SD	Kontrol (n: 11) X±SD	Egb+hep (n: 11) X±SD	FK+hep (n: 10) X±SD	Egb+FK+hep (n: 11) X±SD	P
Süperoksit Dismutaz (U/gr Hb)	3002 ± 328	3450,1±901	3791±1242	3435±2068	3535±788	0,693
Glutasyon Redüktaz (µmol/L)	5,2±1,1 ^d	8,6±4,8	8,3±1,5	10,3±3,7 ^a	6,3±1,9	0,03*
Glutasyon Peroksidaz (U/L)	7,8 ± 0,8	9,7±2,3	9,2±5,7	11,13±3,6	11,13±3,1	0,194
Miyeloperoksidaz doku (U/L)	9,4±2,7 ^{bc}	40,6±13,8 ^{ac}	18,01±7,8 ^{bc}	23,43±14,0 ^e	51,59±17,4 ^{acd}	0,000*
Miyeloperoksidaz plazma (U/L)	43,57 ± 2,1 ^{cde}	110,4 ± 48,5	121,7 ± 60,5 ^a	124,6 ± ,2 ^a	117,0 ± 53,6 ^a	0,004*
MDA plazma (µmol/L)	2,3 ± 0,5 ^{cde}	4,8±1,8 ^e	5,2±1,9 ^{ac}	5,2±1,6 ^{ac}	8,1±2,4 ^{abcd}	0,001*
MDA doku (µmol/L)	2,1±0,6 ^{bcd}	5,7±1,4 ^{ad}	6,3±1,5 ^{ad}	9,3±3,8 ^{abce}	5,7±1,2 ^{ad}	0,000*

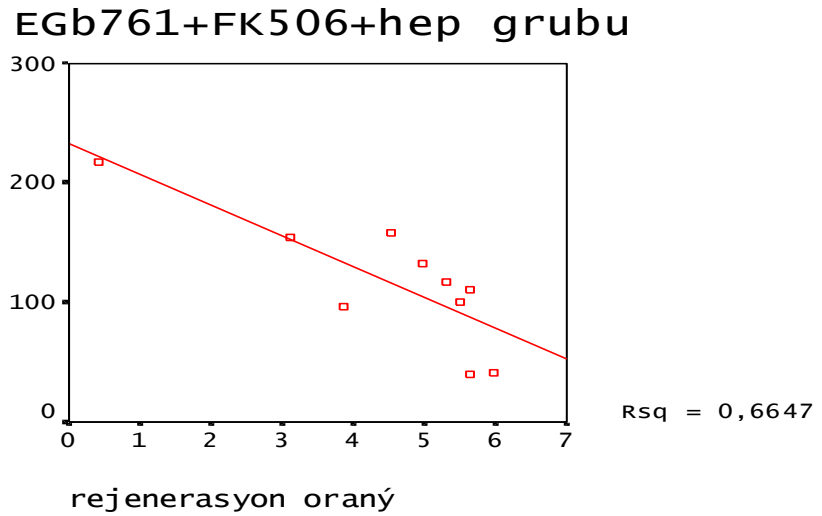
Scheffe prosedürüne göre; a. Sham grubuna göre farklı olan grubu gösterir. b: Kontrol grubuna göre farklı olan grubu gösterir. c: Egb+hep grubuna göre farklı olan grupları gösterir. d: FK+hep grubuna göre farklı olan grubu gösterir. e: Egb+FK+hep grubuna göre farklı olan grubu gösterir

Çalışmamızdaki korelasyonlar gruplarda ayrı ayrı çalışılmıştır. EGb761+hep grubunda; GGT ile LDH arasında pozitif ($r=0.65$ $p<0.05$), SOD ile mitotik indeks arasında pozitif korelasyon ($r=0.68$ $p<0.05$) bulundu. FK506+hep grubunda; TK ile trigliserid ($r=0.78$ $p<0.05$), rejenerasyon hızı ile ürik asit ($r=0.73$ $p<0.05$) arasında pozitif korelasyon bulundu. EGb761+FK506+hep grubunda ise, MPO plazma ile rejenerasyon hızı arasında negatif korelasyon bulunmuştur ($r=-0.81$ $p<0.05$).



EGb grubu MI ve TK korelasyon eğrisi

Grafik XIV. Mitotik indeks ve TK korelasyon Eğrisi



Grafik XV. Rejenerasyon oranı ve MPO korelasyon Eğrisi

5.TARTIŞMA

Karaciğerin bir kısmının rezeksiyonu, kc hücrelerinin istirahat fazından proliferasyon fazına geçişini uyarır. Karaciğer rejenerasyonu parsiyel hepatektomiden sonra farklı türlerde farklı hızlarda gerçekleşir. Bu alanda en çok çalışılan türlerden birisi rat olmuştur (74,75).

Karaciğer rejenerasyonunun takibinde ıslak kc ağırlığı kullanılan önemli bir parametredir. Deneysel çalışmamızda, ratların formüle göre ıslak kc ağırlığı ve rezeke edilen kc ağırlıklarının gruplar arasında anlamlı fark göstermemesi, ratlarda yapılan rezeksiyonun standardizasyonu ve rejenerasyonun morfolojik takibi açısından uygunluğunu göstermektedir. Sakrifiye edildikten sonra her üç grupta da ıslak kc ağırlığının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunması, EGb761 ile FK506'nın tek başlarına ve birlikte kullanımlarının rejenerasyona morfolojik olarak olumlu etkisini göstermektedir. FK506 için bu durum daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (206). Bizim çalışmamızda ise mevcut bu bilgiye ek olarak EGb761'in de tek başına ve FK506 ile paralel etki gösterdiği, hatta tek başına iken daha etkili olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Diğer bir ifadeyle EGb761'in tek kullanımı kc ıslak ağırlığını, FK506'nın tek kullanımı veya EGb761 ile kombine kullanımına göre daha çok artırmıştır.

Karaciğer proliferasyonunun en önemli biyokimyasal belirteçlerinden birisi olarak kabul edilen TK aktivitesi, hücrelerin proliferatif aktivitesi ile doğru orantılı

olduğu için, TK aktivitesinin ölçümü ile hücre bölünüm hızı hesaplanabilir. Timidin kinazın kc rejenerasyonu ve mitotik indeks ile direkt ilgili olduğu gösterilmiştir (78,147,148). Ayrıca PH'den sonra kc dokusunda oluşan rejeneratif cevabın değerlendirilmesi için TK'ın doku düzeyi yerine noninvaziv bir ölçüm şekli olan plazma seviyelerinin ölçümü ile de değerlendirilebileceği bildirilmiştir (73). Yapılan klinik çalışmalarda, majör kc rezeksiyonu sonrasında insanlarda TK aktivitesindeki artış 4. ve 5. günlerde görülmüş ve buna dayanarak bu günlerde kc rejenerasyonunun biyokimyasal olarak maksimum seviyede olduğu, kc kütlesinin 3 haftaya kadar tam olarak yenilenmediği bildirilmiştir (12,13,77). Ratlarda ise, rejenerasyonun 24. ve 48. saatlerde maksimum düzeye ulaştığı ve TK aktivitesinin de bu dönemde pik yaptığı gösterilmiştir (74,75). FK506 transplantasyonda organ reddini önlemek için kullanılmaktadır. İmmünsüpresyon etkisi olan FK506'nın hepatosit proliferasyonunu stimüle ettiği, çalışmalarda gösterilmiştir (22,23). Serbest radikal yakalayıcısı, Platelet Activated Factor (PAF) antagonisti olup, anti-iskemik etkisi gösterilmiş olan EGb761; bazı nörolojik hastalıklarda kullanılan bir ilaçtır (157). Antioksidan ve serbest radikal yakalayıcı etkileri bulunan bu ilacın tek başına veya immünsüpresan bir ajanla birlikte kullanımının PH sonrası kc rejenerasyonuna olumlu etkisi olabileceği düşünülebilir. Çalışmamızda EGb761 ve FK506 verilen gruplarda, TK değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı çıkmasa da, Egb761 grubunda hemen hemen FK506 grubundaki kadar yüksek bulunmuş olması EGb761'in rejenerasyona olumlu etkisini düşündürülebilir. Ayrıca FK506 grubundaki TK yüksekliği ise istatistiksel olarak anlamlı çıkmamış olsa da beklediğimiz şekilde FK506'nın kc rejenerasyonuna olumlu etkisini göstermiş olduğu söylenebilir ve bu bulgumuz literatür ile de uyumludur. Bundan dolayı plazma TK aktivitesi özellikle transplantasyon sonrası hepatik rejenerasyonun takibinde kullanılabilecek önemli bir belirteç olduğu söylenebilir.

FK506 ve EGb761'in, Child's formülü kullanılarak elde edilen rejenerasyon hız oranını nasıl etkilediğine dair bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızda PH sonrası kc rejenerasyon hızının kontrole göre üç grupta da artırdığını görmekteyiz. Başka bir ifadeyle; EGb761, FK506'nın tek başlarına veya ikisinin birlikte

kullanımı rejenerasyon hızını artırmaktadır. EGb761'in tek başına kullanımı, FK506'nın tek başına veya EGb761 ile birlikte kullanımına göre rejenerasyon hızını çok daha fazla artırdığı çarpıcı bir sonuç olarak ortaya çıkmıştır.

Mitotik indeks; kc dokusundaki rejenerasyonun kantitatif ölçümü için kullanılan bir metottur (137). Normal şartlarda kc'de mitoz görülmezken, toksik ya da non-toksik (parsiyel hepatektomi) olaylar karşısında mitotik aktivitede artış olur. Laconi ve arkadaşları %70 hepatik rezeksiyon yaptıkları ratlarda mitotik hücre sayısının hepatektomi sonrası 24 ve 48. saatlerde yüksek olduğunu göstermişlerdir. Selzner ve arkadaşları da hepatektomi sonrası mitotik indeksin 48. saatte en yüksek oranda olduğunu bildirmişlerdir (207,208). FK506'nın PH sonrası kc rejenerasyonunda mitotik indeksi artırdığı gösterilmiştir (209). EGb761'in ise mitotik indeks üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızda FK506'nın kc rejenerasyonunu stimule ettiği mitotik indeksi artırması ile de gösterilmiş olup, bu bulgu literatür ile uyumludur. Mitotik indeks oranının, EGb761'in tek başına ve FK506 ile birlikte kullanıldığında artmış olduğunu görmekteyiz. Yani FK506 ve EGb761 mitotik indeksi artırarak rejeneratif cevabı güçlendirici etki göstermiştir. Hatta EGb761'in tek başına kullanımındaki mitotik indeks oranı artışı, rejenerasyon hızında olduğu gibi, FK506'nın tek başına veya EGb761 ile birlikte kullanımına göre daha fazla olmuştur. Bu artış, EGb761'in kc hücre proliferasyonuna olumlu etkisinin olduğunu ortaya çıkarmıştır. Rejenerasyon hızı ve mitotik indeks oranlarına baktığımızda birbirlerine paralel sonuçlar görülmektedir. Literatürde EGb761'in kc üzerindeki bu etkilerinin birlikte araştırıldığı bir çalışmaya rastlamadığımızın yanı sıra, bu sonuçlar içinde çarpıcı olan; her iki parametrede de maksimum etkinin EGb761'de açığa çıkmasıdır.

Bilirubin; porfirin katabolizması sonucu oluşur. Esas kaynağı hemoglobin yapısındaki hem olup, albümine bağlanarak kc'e taşınır ve burada konjugasyona uğrayarak safraya salgılanır. Enzim defekti durumlarında başlıca indirekt bilirubin artarken, kolestaz durumlarında ise direkt bilirubin artar (213). Literatürü taradığımızda, %70 hepatektomiye kadar, bilirubininin seviyelerinin değişmediği bildirilmiş olup (210), çalışmamızda da literatürle uyumlu çıkmıştır. FK506'nın

çalışmamızda olduğu gibi, bilirubin seviyelerini etkilemediği bildirilmiştir (211). EGb761'in, invitro hemoksijenaz enzimini uyararak, hemin bilirubine yıkımını artırdığı bildirilmiştir (212). EGb761 verilen grupta, kontrol değerlere göre istatistiki olarak anlamlı olmasa da bulgularımız bu yöndedir.

Amino transferazlar, bir α -keto aside, bir amino asidin amin grubunun transportunu sağlayan enzimler sınıfıdır. Amino transferazlar, akut ve kronik ke hasarlanmasının tanınmasında, parankim hasarının düzeyini değerlendirmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Hasarlanma durumunda; sitozolik yerleşimli bir enzim olan ALT düzeylerindeki yükselme erken dönemde görülmesine karşın, mitokondriyal yerleşimli olan AST düzeylerindeki yükseklik ise harabiyetin daha ileri boyutta olduğunun işareti olarak kabul edilir. Alanin aminotransferaz düzeyinde artış, gerçekte hepatik bir sitoliz işaretidir. Akut viral ve toksik hepatitlerde gerek ALT ve gerek AST, normal üst sınırın 10-100 katına varan artışlar gösterir (213). FK506 ve EGb761'in tek tek veya birlikte kullanılmaları ile bu enzim düzeylerinde kontrol grubuna göre farklılık bulunmazken, sham grubuna göre yükseklik vardı. Literatürü incelediğimizde, FK506'nın iskemi oluşturulmuş ratlarda AST düzeylerini düşürdüğü bildirilirken, çalışmamıza benzer şekilde yapılmış parsiyel hepatektomi oluşturulmuş ratlarla yapılan başka bir çalışmada ise FK506'nın AST düzeylerini artırdığı bildirilmiştir (214,215). Hepatektomi ke hasarlanması yaptığı için, AST seviyelerini artırdığı bilinmektedir. Çalışmamızda FK506'nın AST düzeylerini kontrole göre etkilemediğini ve sham grubuna göre de yüksek bulmamızı; çalışmamızdaki kontrol grubunda hepatektomi uygulanmışken, sham grubunda hepatektomi uygulanmamasına bağlayabiliriz. Daha önce AST üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlamadığımız EGb761'in, AST düzeylerini etkilemediğini bulduk.

Bu deneysel çalışmada, FK506 ve EGb761'in birlikte kullanımının, ALT seviyelerini de etkilemediği bulundu. İskemi-reperfüzyon oluşturulmuş ratlarda yapılmış çalışmalarda FK506'nın ALT düzeylerini düşürdüğü bildirilmişken (6), çalışmamızdaki gibi PH uygulanmış rat modelinde FK506'nın ALT düzeylerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlamadık. Hem AST hem de ALT

düzeylerinin etkilenmemiş olması, FK506'nın immünsüpresan etkisine bağlı olarak doku inflamasyon ve nekrozu üzerine, EGb761'in ise serbest radikal yakalayıcı özelliğinden dolayı doku hasarlanmasını azaltıcı etkisine olumlu etki göstermemeleri olarak yorumlanabilir.

Gama glutamil transpeptidaz; kc, böbrek, pankreas ve prostat dokusunda bulunan bu enzim, glutamil radikalının hücre zarı boyunca taşınmasında görev alır. Transfer ve hidroliz reaksiyonlarında katalitik aktivite gösterir. Serum seviyesindeki artış bir çok durumda gözlenirken özellikle kronik alkol kullanımında ve hepatobiliyer hastalıkta artışı tipiktir (213). Gama glutamil transpeptidazın PH yapılan ratlarda 3-7. günlerde artış gösterdiği bildirilmiştir (216). Gruplar arasında GGT düzeyleri arasında fark görülmemesi, GGT çalışma zamanımızın PH'den sonraki 48. saatte olmasına bağlanabilir. Modelimizde olduğu şekliyle FK506 ve EGb761'in GGT üzerine etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmaya rastlayamadık. Antikoagülan, antiepileptikler, nöroleptikler ve bazı oral kontraseptifler gibi pek çok ilacın GGT düzeylerini artırdığı ve bu artışın hücre hasarına bağlı olmadığı, hücredeki enzim indüksiyonuna bağlı olduğu bilinmektedir (213). Bu noktadan hareketle, modelimizde kc hasarlanması söz konusu ise de, FK506 ve EGb761'in, GGT düzeylerini etkilemediği ortaya çıkmıştır. Diğer bir ifadeyle, ilaçlara bağlı olarak uyarılabilen bu enzimin, FK506 ve EGb761 tarafından indüklenmediği de söylenebilir.

Alkalen fosfataz, çinko içeren metalloglikoprotein tipi dimer enzimdir. Fosfat esterlerinin hidrolizinin katalizinde görev alır. Karaciğer hepatobiliyer kanal hücrelerinde bulunan bu enzim hepatobiliyer sekresyonla salınır. Alkalen fosfataz aktivitesinin artışı intra veya ekstra hepatik kolestazın bir işaretidir. Ratlarda %70 parsiyel hepatektomiden sonra, hepatik rejenerasyon süresince kan ve kc doku ALP seviyesi artar. Bu artış bütün hepatik membranlarda, esas olarak safra kanal membranında olmaktadır. Hepatektomiden önceki karaciğerde ALP esas olarak kanaliküllerde bulunurken, hepatektomiye takiben intersellüler hepatosit membranındaki ödeme bağlı gerilim nedeniyle serum aktivitesinde artış izlenir. Bu enzim değişikliği serum ve doku ALP düzeylerinde de uyumlu şekilde görülür

(217). Çalışmamızda üç grupta da kontrol grubuna göre ALP değerleri bariz olarak yüksek bulunmuştur. Her ne kadar kc rejeneratif sürecinde ALP değerlerinin yükseldiği bilinse de (218,219), kontrol grubuna da hepatektomi prosedürü uygulandığı için elde ettiğimiz ALP yüksekliğini (tüm gruplarda ortalama %216'lık artış) sadece hepatektomiye bağlayamayız. Nitekim sham grubunda istatistik olarak anlamlı olmasa da ALP düzeylerinin düşüklüğü bu bulgumuzu desteklemektedir. Diğer bir ifadeyle; ALP seviyesindeki yüksekliğin, FK506 ve EGb761'e bağlı olarak ortaya çıktığı söylenebilir. FK506'nın proliferatif etki gösterdiği osteoblastlar üzerinde, ALP'ı artırdığı bildirilmiştir (229). Çalışmamızda da rejeneratif bir süreç olmasından dolayı ALP yükselmesi doğal bir sonuç olmakla birlikte, FK506'nın bu sürece pekiştirici etki gösterdiği söylenebilir. Deneysel modelimizde FK506'da olduğu gibi EGb761'de de bu etkiyi görmekteyiz. Yani EGb761'nin ALP düzeyini artırdığı ifade edilebilir. Akciğer toksisitesi oluşturulmuş bir çalışmada EGB761'in ALP seviyesini düşürdüğü iddia edilse de (220), bu çalışma bizim modelimizle uyuşmayan ve ALP'ın çok düşük miktarlarda bulunduğu bir organ patolojisi ile çalışılmıştır. Alkalen fosfataz bulgusu; FK506 ve EGb761'in, tek tek veya birlikte kullanımları ile rejeneratif süreçteki kc hücrelerine olumlu proliferatif etkisinin yansımaları olarak yorumlanabilir.

Laktat dehidrogenaz kalp ve iskelet kası, kc, böbrek ve beyin gibi bir çok organda bulunur. Pirüvatın laktata katalizlenmesini sağlar. Enzimin serum değerlerindeki yükselme hepatosellüler hasarın boyutlarını yansıtır (213). Literatürü incelediğimizde PH sonrası LDH düzeylerinin arttığı bildirilmiş olup (221,222), bu çalışmalarda bizim çalışmamızla istatistiksel olarak anlamlı olmasa da paralel bulgular elde edilmiş olup, sham grubunda en düşük seviyeler elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda FK506 ve EGb761'in enzim düzeylerine etkilerinin en doğru şekilde değerlendirilebilmesi için kontrol grubuna da hepatektomi uygulanmış ve FK506 ve EGb761'in LDH düzeylerini etkilemediği bulunmuştur. Farklı doku hasarlanmalarında (kalp ve beyin doku hasarlanması) FK506 ve EGb761'in LDH düzeylerini düşürdüğü bildirilirken (223,224), yükseldiğini bildiren çalışmalarda

vardır (8). Sonuçta LDH'nın, rat hepatektomi modelinde FK506 ve EGb761 tarafından etkilenmediği söylenebilir.

Total plazma proteini, başlıca albumin, α_1 , α_2 , β ve γ globulinlerden oluşur. Bunlar transportör, antikor, enzim, onkotik basınç ajanı, inflamasyon belirteci, tümör belirteci, koagülasyon ajanı, büyüme faktörü gibi kimlikleri ortaya koyarlar (213). Karaciğer proteinlerin sentezlendiği en önemli organ olup, bundan dolayı hepatektominin total plazma protein düzeyini düşürmesi daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (225,226). Çalışmamızda, sham grubu total protein değerlerinin, diğer gruplardaki total protein değerlerinden yüksekliğini sadece hepatektomiye bağlamamız yeterli olmayabilir. Diğer bir ifadeyle sham grubunda hepatektomi uygulanmamasından dolayı total protein yüksektir diyemeyebiliriz. Bu düşüklüğün, FK506 ve EGb761'den de kaynaklandığı düşünülebilir. FK506'nın hepatoproliferatif etkisi bilinmektedir. Bu etki ile FK506, rejenerasyon sürecinde yapıtaşı olarak plazma proteinlerini kullanmış ve seviyelerini düşürmüş olabilir. EGb761' in mitokondri membran proteinlerinin sentezini inhibe ettiği bildirilmiştir (227). Bu protein inhibisyonun deneysel modelimizde de gerçekleşerek, EGb761'in ilgili protein mRNA yazılımını baskılaması ile total plazma protein düzeylerinde düşüklüğüne yol açabileceği düşünülebilir.

Hepatik parankim hasarlanmayı takiben, ATP ve GTP gibi pürin nükleotidlerinin yıkımı ile hipoksantin, ksantin ve son olarak da ürik asit oluşur. Bu sebeple ürik asit, organ transplantasyonunda hücrel hasarlanmanın bir belirteci olarak kullanılmaktadır. Ayrıca oluşturulan total yada parsiyel hepatik iskemi modellerinde, iskeminin derecesine göre ürik asit düzeylerinde yükselmeler olduğu bildirilmiştir (211). Çalışmamızda hepatektomi yapılmış gruplardan elde ettiğimiz, ilaç verilen gruplarda kontrole göre belirgin düşük ürik asit seviyelerini; hepatektomi prosedürü sonucunda, FK506'ın immünsüpresan özelliğinden dolayı ke hasarlanmasını azaltıcı etkisine, EGb761'in ise serbest radikal yakalayıcı etkisinden kaynaklana antioksidan özelliği ile doku hasarlanmasını azaltmasına bağlayabiliriz. İlaç verilen gruplarda, parankim hasarlanmasının kontrole göre düşük oluşunu, FK506 ve EGb761'in indirekt sitoprotektif etki açığa çıkarmış olmasına

bağlanabilir. Diğer bir ifadeyle, söz konusu ilaçların, ke parankim hasarlanmasını azaltıcı etki gösterdiği ve bu şekilde rejeneratif sürece olumlu katkıda bulunduğunu söyleyebiliriz.

Trigliserid düzeylerinin rat hepatektomi modelinde araştırıldığı çalışmalarda, hepatektomiye takiben düzeylerin progresif olarak düştüğünün rapor edildiği çalışmaların yanısıra (228), hepatektomiye takiben ilk altı saatten itibaren belirgin olarak yükseldiğini ve bu yükselmenin postoperatif 72. saatte kadar devam edip daha sonra normal düzeylerine döndüğünün gösterildiği çalışmalar mevcuttur (229). Yoshida ve arkadaşları FK506'nın ratlarda trigliserid düzeylerini etkilemediğini bildirmişlerdir (230). EGb761'in modelimizde olduğu gibi lipid profili üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlayamadık. EGb761'in yüksek kolesterol diyeti alan ratlarda serum trigliserid düzeylerindeki yükselmeyi inhhibe ettiği bildirilmiş olup (231), EGb761'in farmakolojik özelliklerinden dolayı okidatif stres durumunda trigliserid düzeylerini hafifçe artırdığını gösteren çalışmalar da vardır (232). Çalışmamızda FK506'nin trigliseridi, kontrol grubuna göre artırıcı etki gösterirken, sham grubuna göre azaltıcı etki gösterdiğini görmekteyiz. Her ne kadar bu etkiler istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, FK506'nın trigliserdi hafifçe artırdığı söylenebilir. EGb761 verilen grupta, kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik, sham grubuna göre ise anlamlı olmayan düşüklük görülmektedir. EGb761'in hepatektomiden bağımsız bir etki ile, trigliseridi artırabileceği söylenebilir.

Rat hepatektomi modelinde, total kolesterol düzeylerinin yükseldiğini ve düştüğünü bildiren çalışmalar vardır (58,225,226). Fields ve arkadaşlarının rat hepatektomi modelinde kolesterol düzeylerinin sentezinde ani bir düşüş olduğunu ve kolesterol sentezi için DNA yazılımının 32. saatten sonra başladığını bu yüzden kolesterol düzeylerinin 48. saatten önce yükselmediğini öne sürmüşlerdir (226). FK506'nın ve EGb761'in modelimizde olduğu gibi kolesterol düzeylerine olan etkisinin incelendiği başka bir çalışmaya rastlayamadık Çalışmamızda total kolesterol değerleri hepatektomi gruplarında sham grubuna göre anlamlı olarak düşüklük göstermiştir. Bu durumun hepatektomiye bağlı olarak hepatik kolesterol

sentezindekinde azalmaya bağlı olduğu söylenebilir. Bunun yanı sıra EGb761 verilen grupta kolesterol düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olup, EGb761'in hepatektomide, total kolesterol düzeylerini artırdığı sonucu çıkarılabilir.

Diğer bir lipid parametremiz olan HDL düzeylerini incelediğimizde hepatektomi gruplarında sham grubuna göre anlamlı düşüklük görmekteyiz. Bulgumuz literatür ile de uyumlu olup (233), hepatektomi yapılan ratlarda ekstrahepatik HDL-apoprotein katabolizmasının artması yada geriye kalan kc lobunda HDL yıkılımının hepatektomiye bağlı olarak uyarılmasına bağlanabilir. İlaçların her ikisinin de HDL zerine etkisinin olmadığı da söylenebilir.

Çalışmamızda LDL düzeyleri bakımından hepatektomi grupları arasında istatistiksel fark görülmemiş olup, sham grubuna göre hepatektomi gruplarında yüksek LDL değerlerinin bulunması, rejenerasyona bağlı olarak lipid sentezinin direkt olarak uyarıldığı ve LDL düzeylerinin buna bağlı olarak yüksek olduğunun ne sürüldüğü çalışmalar ile uyumludur (234). LDL'nin hepatektomi gruplarındaki yüksekliği, prosedürden kaynaklanan sentez hızındaki artış olarak yorumlanabileceği gibi, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, EGb761 ve FK506'nın, LDL düzeylerini artırıcı etkisinden de bahsedilebilir.

Bu deneysel çalışmada; antioksidan enzimlerden SOD, GPx, GR, doku nötrofil infiltrasyon göstergesi olan MPO ve lipid peroksidasyon ürünü olan TBARS'ın rejenerasyon ile ilişkisi de araştırıldı. Süperoksid dismutaz, süperoksidin hidrojen perokside dismutasyonunu katalizleyen ve hücreyi serbest radikal hasarından koruyan bir metalloenzimdir (180,182,205). Antioksidan enzimlerden biri olan SOD'ın PH'den sonra düşük olduğunu gösteren çalışmalar bulunmakla birlikte, bu düzeylerin etkilenmediğini bildiren çalışmalar da vardır (235-237). FK506'nın rat hepatektomi modeli kc renerasyonunda, SOD ile direkt etkileşiminin araştırıldığı bir çalışmaya rastlayamadık. Ancak FK506'nın kc ilaç toksisitesinde SOD değerini artırdığı bildirilmiştir (238). Çalışmamızda FK506'nın SOD düzeylerini etkilemediğini gördük. EGb761 ile SOD ilişkisini araştırdığımızda, daha çok kc dışı organ patolojilerinde çalışıldığını görmekle birlikte, kc SOD düzeyini yükselttiğini bildiren çalışmalar vardır (239,240). Oluşturduğumuz rat hepatektomi modelinde

EGb761'in SOD düzeylerini etkilemediğini gördük. Aynı model kullanılarak EGb761-SOD ilişkisinin araştırıldığı başka bir çalışmaya rastlamadık. Ayrıca EGb761 ve FK506'nın birlikte kullanılmaları ile de SOD düzeyleri kontrollerden farklı çıkmamış olup, tek başlarına kullanılmalarında olduğu gibi SOD düzeyi etkilenmemiştir.

Diğer bir antioksidan enzim olan GPx; hidrojen peroksidin ve diğer serbest hidrojen peroksidlerin yıkılmalarını katalizler (175). Karaciğer doku hasarlaması ile oluşan oksidatif stresde, kc'in potent fizyolojik lipid peroksid yakalayıcısı olan GPx düzeylerinin çokca araştırıldığını görmekteyiz. Szymonik ve arkadaşları CCl₄'e bağlı akut kc hasarlanmasında GPx düzeylerinin değişmediğini, eş zamanlı oluşan beyin, böbrek ve kalp gibi organlardaki GPx değişimine göre kc'in bu GPx düzeylerindeki değişime karşı daha dirençli olduğunu öne sürmüşlerdir (241). Ben-Shaul ve arkadaşları, oluşturulan kc hasarlanmasında GPx enzim düzeylerini incelemişler ve rat kc koruyucu antioksidan sistemlerinin diğer hayvan türlerine göre relatif rezistansın olduğunu iddia etmişlerdir (242). Diğer bir rat kc oksidatif stres modelinde GPx aktivitesinde değişiklik izlenmediği rapor edilmiş olup, bunu kullanan ilacın kc toksisitesi oluşturmadığına bağlamışlardır (243). Ayrıca kc hasarlanmasına bağlı olarak GPx düzeylerinin düştüğünü bildiren çalışmalarda vardır (210,211). Sanchez-Campos ve arkadaşları yapmış oldukları kolestaza bağlı oluşturulan kc hasarlanması çalışmalarında FK506'nın GPx düzeyini artırdığını bildirmişlerdir (244). EGb761'in GPx düzeylerine etkilerine baktığımızda ise, kc dışı organ hasarlanmalarında çalışıldığını görmekteyiz (245,246). Çalışmamızda olduğu gibi hepatektomi oluşturulmuş ratlarda EGb761 ve FK506'nın GPx üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlamadık. Elde ettiğimiz bulgular göstermiştir ki, FK506 ve EGb761 tek başlarına veya birlikte rat PH modelinde GPx düzeylerini etkilememektedir. FK506'nın GPx düzeyini artırdığını bildiren çalışmadaki model kolestaz modeli olup, bizim çalışmamızda uygulanan model ise PH modelidir. Diğer bir ifadeyle Sanchez-Campos ve arkadaşlarının iddia ettiği FK506'nın GPx'i artırıcı etkisini çalışmamızda görmemiş olmamız oluşturulan modellerin farklılığından kaynaklanmış olabilir. EGb761'in farklı organ hasarlanmalarında GPx düzeylerini

artırdığı bildirilmekle birlikte, çalışmamızda bu düzeylerin değişmemiş olması; GPx düzeylerinin arttığını iddia eden çalışmaların farklı modeller olmasının yanında, farklı organlarda çalışılmış olmasına da bağlanabilir. Ayrıca bu duruma kc'in GPx düzeylerindeki değişime karşı daha dirençli olması da yol açmış olabilir (216).

Çalıştığımız bir başka antioksidan enzim olan GR'da, hepatektomi uygulanan gruplar arasında fark görülmemiş olup, FK506 verilen grupta, sham grubuna göre anlamlı yükseklik çıkmıştır. Diğer bir ifadeyle, FK506 ve EGb761, oluşturduğumuz modelde GR seviyelerini, hepatektomiden bağımsız bir şekilde direkt olarak, etkilememiştir. Çalışmamızla direkt birebir örtüşen bir model ile FK506 ve EGb761'in, GR'a etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlamamakla beraber, başka şekillerde oluşturulmuş karaciğer hasarlanmasında, GR düzeyleri için farklı bildirimler bulunmaktadır. Karaciğer hasarlanması oluşturulmuş bazı çalışmalar GR aktivitesinin çalışmamızda olduğu gibi değişmediğini, bazıları ise arttığını bildirmişlerdir (247,248). FK506'nın GR aktivitesini nefrotoksisite oluşturulmuş ratlarda artırdığını bildiren çalışma dışında (249), özellikle kc modellerinde yapılmış bir çalışmaya rastlamadık. FK506'nın GR düzeylerini, kontrol grubuna göre artırmamış olmasını; oluşturduğumuz modelin, FK506'nın GR'ı artırdığını bildiren araştırmalardaki modellerden farklılığına bağlayabiliriz. Yine EGb761'in nöroprotektif etkisinin araştırıldığı çalışmalarda GR seviyesini düşürdüğü bildirilmiş olup (250), bunun da bizim modelimizle farklı bir model olması bulgularımızı farklı kılmış olabilir.

Elde ettiğimiz antioksidan enzim (SOD, GPx ve GR) bulguları, FK506 ve EGb761'in adı geçen üç antioksidan enzim seviyelerini etkilemediğini göstermiştir. Başka bir deyişle, bu enzim düzeylerinin değişmemesi, oluşturduğumuz rat hepatektomi modelinde, adı geçen ilaçların doku oksidatif stresi ve redoks potansiyeli üzerine etkisinin olmadığını göstermektedir.

Doku nötrofil infiltrasyon göstergesi olan MPO çalıştığımız diğer bir parametredir. FK506'nın, hepatektomide MPO düzeyini azalttığı bildirilmiştir (203). Elde ettiğimiz bulgular, literatürde bildirildiği şekilde FK506'nın, MPO düzeyini azalttığı yönünde olup, FK506'nın kc rejenerasyonuna olumlu etkisi olduğunu

desteklemiştir. Hepatektomide, Egb761'in ise MPO düzeylerini azaltarak rejenerasyona etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlayamamakla birlikte, elde ettiğimiz sonuç göstermektedir ki bir antioksidan ajan olan EGb761'in tek başına kullanıldığı zaman MPO'yu düşürerek rejenerasyonu hızlandırdığı, FK506 ile kullanıldığında ise MPO'yu artırarak rejenerasyonu olumsuz etkilemektedir. EGb761 ile birlikte FK506 verilen grupta ise MPO doku düzeylerinin, yalnızca FK506 verilen gruba göre yüksek bulunması bu antioksidan ajanın verilmesinin sanıldığı aksine inflamasyonu artırıcı etki gösterdiğini düşündürmektedir. Aynı çalışmada miyeloperoksidaz düzeylerinin FK506'ya bağlı düşük bildirilmesi de bulgularımız ile uyumlu olup FK506'nın doku inflamatuvar cevabını azaltması ile açıklanabilir.

Çalışmamızda lipid peroksidasyon göstergesi olarak doku ve plazma TBARS düzeyleri incelendi. Chesseman ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmalarında, rejenerasyonunun erken fazındaki kc homojenatlarında lipid peroksidasyon bulguları varlığını göstermiş olup, karaciğer rejenerasyonunun erken fazında serbest radikal hasarlanması olduğunu bildirmişlerdir (140). Lipid peroksidasyonu oksaditif stresin önemli indikatörüdür. Oksijen serbest radikallerinin hücreli lipidlere atağı sonucu malondialdehit gibi aldehid lipid hidroperoksid oluşmaktadır. Ratların kc mikrozomlarında, maksimum TK aktivitesinin, lipid peroksidasyon hızı ile ters orantılı olduğu, başka bir ifadeyle TK aktivitesi yüksek iken lipid peroksidasyon hızının düştüğü bildirilmiştir (139). Bir başka çalışma da ise rat kc iskemi modelinde FK506'nın kc'deki lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA'yı azalttığı rapor edilmiştir (251). Parsiyel hepatektomiden sonraki hepatik rejenerasyon döneminde geriye kalan kc'in daha fazla hasarlanmasına karşı cevap olarak lipoperoksid düzeylerinde yükselme ve enerji metabolizmasında düşme olduğu öne sürülmüştür (148). Kim ve arkadaşlarının yaptığı benzer hepatektomi çalışmasında TBARS, rezeksiyon grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. FK506 tedavisinin PH yapılan rat kc'inde MDA üretiminde artışa sebep olduğunu iddia edilmiştir (252). Çalışmamızda yalnızca FK506 verilen grupta diğer dört gruba göre doku lipid peroksidasyon ürünlerinde istatistiksel olarak

anlamalı olan yükseklik, FK506 ile birlikte EGb761 verilen grupta, yalnızca FK506 verilen gruba göre doku lipid peroksidasyon düzeyinde ise istatistiksel olarak anlamalı olan düşüklük izlenmiştir. FK506 verilen grupta, kontrol grubuna göre lipid peroksidasyon ürünlerinde bulunan yükseklik, FK506'nın tek başına doku oksidatif stresini azaltmada yeterli olmadığını, ancak EGb761 ile verildiğinde yeterli olduğunu hipotezini desteklemektedir. Elde ettiğimiz bu bulgu istatistiksel olarak anlamalı olup, FK506'nın bir antioksidan ajanla birlikte kullanılmasının doku oksidatif stresini azaltacağı fikrini verebilir. FK506 ile birlikte kullandığımız antioksidan ajanın değiştirilmesi ile yapılacak bir çalışmanın, lipid peroksidasyonuna etkisinin izlenmesi, pre veya post transplant rejenerasyon sürecini hızlandıracak medikasyonlar açısından ışık tutucu olabilir. FK506'nın tek başına kullanımında hepatotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (253). FK506+hep grubunda MDA doku seviyelerinin yüksek olması, FK506'nın hem hepatotoksik hem de hepatoproliferatif etkisinin olmasına ve bu etkilerden hepatotoksik etkinin daha baskın olmuş olabileceğine bağlanabilir. Diğer bir ifadeyle hepatosit stimülasyonu etkisinin, hepatotoksik etkidenden daha zayıf kalmasında bu duruma yol açmış olabilir. MDA plazma değerleri ile MDA doku değerleri bakımından, FK506+hep ve FK506+EGb761+hep grupları arasında paralellik gözlenmemiştir. Doku ve plazma değerleri arasındaki bu paralelliğin olmaması, FK506+hep grubunda, membran hasarlanmanın yüksek olmasına bağlı olarak plazmaya MDA geçişini geciktirmiş olmasına bağlanabilir. Ayrıca MDA ölçümü için spesifik bir indeks olmayan tiyobarbütirik asit metodunun, plazmada hatalı pozitif reaksiyon verebilecek yapıların çokca olabileceği ve bundan dolayı kullandığımız her iki ilacın plazmada oluşturmaları muhtemel doğası bilinmeyen bir kompleksin benzer şekilde hatalı pozitif sonuç verdirebileceği düşündürülebilir.

Çalışmamızdaki korelasyon bulgularına baktığımızda, en önemli olanlardan, EGb761+hep grubunda; GGT ile LDH arasında pozitif korelasyon bulundu. Gruplar arasında fark göstermeseler de her iki enzim kendi aralarında ilişkili çıkmış olup, rejeneratif süreçte aktif oldukları söylenebilir. SOD ile mitotik indeks arasında da pozitif korelasyon bulundu. Süperoksit dismutaz gruplar arasında fark göstermemiş

olsa da, mitotik indeksin artması ile artış göstermiştir diyebiliriz (216,221,222). FK506+hep grubunda; TK ile trigliserid arasında pozitif korelasyon bulundu. Trigliserid gruplarda artan bir parametremiz idi. Rejenerasyon göstergesi olan TK, artması ile trigliseridin artması beklenen bir korelasyon olmuştur (147,148). EGb761+FK506+hep grubunda ise, plazma MPO ile rejenerasyon hızı arasında negatif korelasyon bulundu. Hasarlanma ile arttığını bildiğimiz ve buna paralel olarak bulduğumuz MPO, rejenerasyon ile birlikte azalmıştır sonucunu çıkarabiliriz (203).

Çalışmamızın sonucu olarak; kc rejenerasyonu sürecinde, takrolimus ve birlikte verilmesi düşünülen antioksidan ilaç dozunun azaltılması yanında, kortikosteroid gibi destekleyici ilaç gereksiniminde de azalma olacağı; EGb761'in kc rejenerasyonunda kullanımının rejenerasyon üzerine olumlu etkileri olduğu sonucu çıkarılabilir.

SONUÇLAR

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya, Nükleer Tıp, Patoloji Anabilim Dalı ve Hakan Çetinsaya DEKAM gerçekleştirilen, bir immünsüpresan olan KF506 ve bir serbest radikal yakalayıcısı olan EGb761'in kullanımı ile deneysel hepatik rezeksiyon modelinde karaciğer rejenerasyonu üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmamızın sonuçları şu şekildedir;

EGb761'in tek kullanımı kc ıslak ağırlığını, FK506'nın tek kullanımı veya EGb761 ile kombine kullanımına göre daha çok artırmıştır.

EGb761'in tek başına kullanımı, FK506'nın tek başına veya EGb761 ile birlikte kullanımına göre rejenerasyon hızını çok daha fazla artırmaktadır.

EGb761'in tek başına kullanımındaki mitotik indeks oranı artışı, rejenerasyon hızında olduğu gibi, FK506'nın tek başına veya EGb761 ile birlikte kullanımına göre daha fazla olmuştur.

EGb761'in rejeneratif sürece olan olumlu etkisinin, en azından rejeneratif etkisi bilinen FK506 kadar olduğu sonucunu çıkarılabilir.

FK506 ve EGb761, hepatektomide AST ve ALT seviyelerini etkilememiştir.

FK506 ve EGb761'in, GGT düzeylerini etkilemediği, diğer bir ifadeyle, ilaçlara bağlı olarak uyarılabilen bu enzimin, FK506 ve EGb761 tarafından indüklenmediği görülmüştür.

FK506 ve EGb761 kullanımı ile SOD, GPx ve GR antioksidan enzimleri etkilememiştir.

FK506, MPO düzeyini azaltmıştır. EGb761 tek başına kullanıldığı zaman MPO'yu düşürmüştür. EGb761 ve FK506 birlikte kullanıldığında ise MPO'yu artırmışlardır.

KAYNAKLAR

1. Kaibori M, Inoue T, Wei Tu, Oda M et all. FK506, but not cyclosporin A, prevents mitochondrial dysfunction during hypoxia in rat hepatocytes. *Life Sci.* 2001; 69: 17–26.
2. Krentz AJ, Dousset B, Mayer D, McMaster P, Buckels J, Cramb R, Smith JM, Nattrass M. Metabolic effects of cyclosporin A and FK506 in liver transplant recipients. *Diabetes* 1993;43:1753–1759.
3. European FK506 Multicentre Liver Study Group. Randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in prevention of liver allograft rejection. *Lancet* 1994; 344: 423–428.
4. The U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 1110–1115.
5. Assman T, Ruzicha T. New Immunosopresive Drugs in Dermatology (Mycophenolate Mofetil, Tacrolimus): Unapproved Uses, Doses or Indications. *Clin. Derm.* 2002; 20:505-517.
6. Sakr MF, Zetti GM, Hassanein TI et all. FK 506 ameliorates the hepatic injury associated with ischemia and reperfusion in rats. *Hepatology* 1991;13:947–951.
7. Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by cyclosporin A of ischemic/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1993;25:1461–1469.
8. Zhang R, Brennan ML, Shen Z et all. Myeloperoxidase Functions As A Major Enzymatic Catalyst For Initiation Of Lipid Peroxidation At Sites Of Inflammation. *J.Biol.Chem* 2002; 29: 46116–46122.
9. Takada Y, Taniguchi H, Fukunaga K. et all. Prolonged hepatic warm ischemia in non-heart-beating donors: protective effects of FK506 and a platelet activating factor antagonist in porcine liver transplantation. *Surgery* 1998;123:692–698.
10. Guerrieri F, Vendemiale G, Grattagliano I, Cocco T, Pellicchia G, ve Altomare E. Mitochondrial oxidative alterations following partial hepatectomy. *Free Rad Biol. Med.* 1999; 26:34-41.

11. Handerson DJ, Naya I, Bundick RV et al. Comparison of the effect of FK506, cyclosporin A and rapamycin on IL-2 productions. *Immunology* 1991;316-21.
12. Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, et al. FK506, A novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*-J. *Antibiot* 1987; 40:1249.
13. Jiang H, Kobayashi M. Differences between cyclosporin A and tacrolimus in organ transplantation. *Transplant Proc.* 1999; 31 : 1978-80.
14. Neuhaus P, Langrehr JM, Williams R et al. Tacrolimus based immunosuppression after liver transplantation: A randomized study comparing dual versus triple low doses oral regimens. *Transpl Int* 1997; 10:253-261.
15. Jain AB, Fung JJ, Hamad I et al. Adult primary liver transplantation: Prospective randomized trial of tacrolimus and steroid vs tacrolimus, steroid and mycophenolate mofetil Transplantation 1998; 27; 66.
16. Klupp J, Bechstein WO, Pratschke J et al. Risk and benefit antibody induction therapy in combination with tacrolimus immunosuppression after liver transplantation. *Transplant Proc.* 1998; 30: 1417-1418.
17. Sharkey J, Jones PA, Jennifer F, McCarter, John Kelly. Calcineurin Inhibitors as Neuroprotectants. *CNS Drug* 2000; 13(1)1-13.
18. Bierer BE, Samelson LE, editors. Lymphocyte activation. Cyclosporin A, FK506, and rapamycin: Binding to immunophilins and biological action. Basel: Karger, 1994: 128-55.
19. Kunz J, Hall MN. Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppressants. *Trends Biochem Sci* 1993; 18 (9): 334-8.
20. Liu J. FK506 and cyclosporin: molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14 (5): 182-8.
21. Nishiyama M, Izumi S, Okuhara M. Discovery and development of FK506 (Tacrolimus), a potent immunosuppressant of microbial origin. Merluzzi VJ, Adams J, editors. *The search for anti-inflammatory drugs.* Boston (MA): Birkhauser, 1995: 65-104.

22. Francavilla A, Polimeno L, Barone M, Azzarone A, Starzl TE. Hepatic Regeneration And Growth Factors. *Journal of Surgical Oncology Supplement* 1993;3:1-7.
23. Starzl TE, Schreiber SL, Albers MW. Hepatotrophic properties in dogs of human FKBP, the binding protein for FK 506 and rapamycin. *Transplantation* 1991; 52: 751-753.
24. Sharkey J, Jones PA., Jennifer F. McCarter, Kelly JS. Calcineurin Inhibitors as Neuroprotectants Focus of Tacrolimus and Cyclosporin *CNS Drugs* 2000; 13; (1): 1-2.
25. Harding MW, Galat A, Uehling DE, et al. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* 1989; 341 (6244): 758-60.
26. Siekierka JJ, Hung SHY, Poe M, et al. A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* 1989; 341; (6244): 755-7.
27. Li PA, Uchino H, Elmer E, et al. Amelioration by cyclosporin A of brain damage following 5 or 10 min of ischemia in rats subjected to preischemic hyperglycemia. *Brain Res* 1997; 753: 133-40.
28. Uchino H, Elmer E, Uchino K, et al. Cyclosporin A dramatically ameliorates CA1 hippocampal damage following transient forebrain ischaemia in the rat. *Acta Physiol Scand* 1995; 155: 469-71.
29. Wakita H, Tomimoto H, Akiguchi I et al. Dose-dependent, protective effect of FK506 against white matter changes in the rat brain after chronic cerebral ischemia. *Brain Res* 1998; 792: 105-13.
30. Ide T, Morikawa E, Kirino T. An immunosuppressant, FK506, protects hippocampal neurons from forebrain ischemia in the Mongolian gerbil. *Neurosci Lett* 1996; 204: 157-60.
31. Wakabayashi H, Karasawa Y, Tanaka S et al. The effect of FK506 on warm ischemia and reperfusion injury in the rat liver. *Surg Today* 1994; 24: 994-1002.

32. Kucukcelebi A, Ozcan M. The beneficial effect of cyclosporinA on the no-reflow phenomenon in rat skin island flaps. *Br J Plastic Surg* 1992; 45: 512-4.
33. Arras M, Strasser R, Mohri M, et all. Tumor necrosis factor-alpha is expressed by monocytes/macrophages following cardiac microembolization and is antagonized by cyclosporine. *Basic Res Cardiol* 1998; 93: 97-107.
34. Garcia-Criado FJ, Palma-Vargas JM, Valdunciel-Garcia JJ et all. Tacrolimus (FK506) down-regulates free radical tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia. *Transplantation* 1997; 64: 594-8.
35. Cetinkale O, Bilgic L, Ayan F et all. Neutrophil-mediated injury in ischemic skin flaps: Amelioration of ischemic injury by cyclosporine in the rat. *Ann Plastic Surg* 1996; 37: 66-74.
36. Lockhart BP, Cressey , Lepagnol JM. Suppression of nitric oxide formation by tyrosine kinase inhibitors in murine N9 microglia. *Br J Pharmacol* 1998; 123: 879-89.
37. Garcia JEL, Rodriguez FM, Lopez AJ, et al. Action of cyclosporin A on mononuclear phagocytes. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1996; 6: 222-31.
38. Hortelano S, Lopez-Collazo E, Bosca L. Protective effect of cyclosporin A and FK506 from nitric oxide-dependent apoptosis in activated macrophages. *Br. J. Pharmacol.* 1999; 126: 1139-46.
39. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T. Clinical Pharmacokinetics of tacrolimus T. *Pharmacokinet* 1995; 29:404-430.
40. Varghese Z, Fernando RL, Turakhia G et al. Oxidability of low density lipoproteins from normal and tacrolimus treated renal transplant patients. *Transplant Proc.* 1998; 30: 2043-2046.
41. Spencer CM, Goa KL, Gillis JC. Tacrolimus: an update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation. *Drugs* 1997; 54: 925-975.

42. Peters DH, Fitton A, Plosker GL ve ark. Tacrolimus : a review of its pharmacology and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. *Drugs* 1993; 46: 746-794.
43. Lang P, Baron C. Molecular mechanisms of immunosuppressive chemical agents recently introduced in clinical transplantation protocols. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 2050-54.
44. Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A. Mode of action tacrolimus : Molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit* 1995; 17:584-91.
45. Plosker G.L, Foster R.H. Tacrolimus:a review. *Drugs* 2000; 59(2): 325-375.
46. Lang B, Baron C. Molecular mechanisms of immunosuppressive chemical agent recently introduced in clinical transplantation protocols. *Nephrol Dial Transplant*. 1997; 12: 2050-54.
47. Jiang H, Kobayashi M. Differences between cyclosporin A and tacrolimus in organ transplantation. *Transplant Proc* 1999;31:1978-80.
48. Weimer A, Melk A, Daniel V. et al. switch from cyclosporine to tacrolimus in renal transplant recipients: Impact on the TH1, TH2 and monokine responses. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 257.
49. Zipperle S, Weimer R, Gollig M. Et al. Impaired T cell IL-10 secretion and CD4 helper function in liver transplant patient treated with tacrolimus. *Transplant Proc*. 1997; 29: 1079-80.
50. Rayes N, Bechstein WO, Volk HP et al. Distribution of Lymphocyte subtypes in liver transplant recipients. *Transplant Proc*. 1997; 29: 501-2.
51. Bilzer M, Gerbes AL. Prevention of oxidative liver injury by the immunosuppressant tacrolimus. *Hepatology* 1998; 13: 327.
52. Kaibori M, Sakitani K, Oda M et al. Immunosuppressant FK506 inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression at a step of NF- κ -B activation in rat hepatocyte. *Hepatology*. 1999; 30:1138-45.
53. Trimarchi HM, Truong LD, Brennan S et al. FK506 associated thrombotic microangiopathy. *Transplantation* 1999; 67: 549-44

54. Della Strologo L, Ardissino G, Ghio L. Renal hemodynamic after tacrolimus in renal transplanted children: no evidence of a vasoconstriction effect J. Am. Soc. Nephrol 1998; 9: 671-674.
55. Mor E, Yussim A, Chodoff L et al. New immunosuppressive agents for maintenance therapy in organ transplantation: focus on adverse effects. BioDrugs. 1997;8: 469-88.
56. Jindal RM, Sidner RA, Milgrom ML. Post transplant diabetes mellitus: the role of immunosuppression. Drug. Saf. 1997; 16 (4)242-257.
57. Fernandez LA, Lehmann R, Luzi L et al. The effect of maintenance doses of FK506 versus cyclosporin A on glucose and lipid metabolism after orthotopic liver transplantation. Transplantation 1998; 68 (10): 1532-41.
58. Varghese Z, Fernando RL, Turakhia G et al. Oxidizability of low density lipoproteins from Neural and tacrolimus treated renal transplant patients. Transplant Proc. 1998;30:2043-2046.
59. Weis M, Wildhirt SM, Schulze C et al. Impact of immunosuppression on coronary endothelial function after cardiac transplantation. Transplant Proc.1998;30: 2043-2046.
60. Jurcevic S, Dunn MJ, Cripps S et al. A new enzyme-linked immunosorbent assay to measure anti-endothelial antibodies after cardiac transplantation demonstrates greater inhibition of antibody formation by tacrolimus compared with cyclosporin. Transplantation 1998; 65: 1197-1202.
61. Tacrolimus Hydrate FK506 modulates expression of tissue factor in human monocyte macrophage cell line implication for cardiac transplant atherosclerosis. Circulation 1997; 96: 559.
62. Weis M, Wildhirt SM, Schulze C et al. Expression of vasoactive enzymes and cytokine patterns in the cardiac allograft: Impact of modulation by different immunosuppressive regimes. Eur Heart J. 1998; 19 : 306A.
63. Atkison PR, Joubert GI, Guiraudon C et al. Arteritis and increased intracellular calcium as a possible mechanism for tacrolimus related cardiac toxicity in a pediatric transplant recipient. Transplantation 1997; 64; 773-775.

64. Studies On Mecanisms Of Augmentation Of Liver Regenerationby Cylosporin And FK506. Francavilla A, Starzl T.E, Barone M et al. Hepatology 1991; 14:140-143.
65. Kim I, Lynch S, Savanas G et al. Evidence that host size determines liver size: studies in dogs receiving orthotopic liver transplants. Hepatology 1987; 7; 362-366.
66. Higgins GM, Anderson RM. Restoration of liver of the white rat following partial surgical removal. Arch Pathol. 1931; 12: 186-202.
67. Bucher N.L. R. Thirt years of liver regeneration: a distillate. Cold Spring Harb. Conferance on Cell Proliferation 1982; 9: 15-26.
68. Steer C.J. Liver regeneration. FASEB 1995; 9: 1396-1400.
69. Michalopoulos G.K. Liver regeneration: molecoulaer mecanisms of growth control. FASEB J. 1990; 4: 176-187.
70. Mitochondrial oxidative alterations following partial hepatectomy Guarrieri F, Vendemiale G, Grattagliano I, Cocco T, Pellechia G and Altomare E. Fre. Rad. Biol. Med. 1999; 26: 34-41.
71. Fausto N, Mead JE: regulation of liver growth: protooncogenes and transforming growth factors. Lab. Invest 1989; 60: 4-13.
72. Powis G, Kozikowski A. Growth factor and oncogene signalling pathway as targets for rational anticancer drug development. Clin Biochem 1991;24:385-397.
73. Francavilla A, Panella C, Polimeno L et all. Hormonal And Enzymatic Parameters Of Hepatic Regeneration In Patients Undergoing Major Liver Resections.. Hepatology 1990; 12:1134-1138.
74. Weinbren K. Regeneration of the liver. Gastroenterology. 1959; 37: 657-668.
75. Boucher NLR, Malt RA.Morphological and biological aspects. In Boucher NLR Malt RA, eds. Regeneration of liver and kidney. Boston: Little , Brown & Co 1971:23.
76. Yoshimura S, Kamada N.Effect of cyclosporin A on liver regeneration following partial hepatectomy in the mause. Transplant Proc. 1989; 21: 911-912.

77. Francavilla A, Porter KA, Benichou J, Jones AF, Starzl TE. Liver regenerations in dogs: Morfological and chemical changes. *J. Surg Res* 1978 25: 409-419.
78. Morley GCD, Kuku S, Rubenstein HN, Boyer SL. Serum hormon levels following partial hepatectomy in rat. *Biochem Biphys Res Commun* 1975; 67: 663-668.
79. Francavilla A, Dileo A, Eagon PK et al. Regeneration rat liver: Correlation between estrogen receptor localization and deoxiribonucleic acid synthesis. *Gastroenterology* 1984; 86: 552-557.
80. Francavilla A, Gavalier JS, Makowka L et al. Estradiol and testosterone levels in patients undergoing partial hepatectomy: A possible signal for hepatic regeneration? *Dig. Dis. Sci.* 1989; 6: 818-822.
81. Pezzino V, Vigneri R, Cohen D, Goldfine ID. Regenerating rat liver , insulün and glucagon serum levels and receptor binding. *Endocrinology* 1981; 108: 2163-2169.
82. Leffert HL, Koch KS, Moran T, Rubalcava B. Hormonal control of rat liver regeneration. *Gastroenterology* 1979; 76: 1470-1482.
83. Francavilla A, Eagon PK, Di Leo M et al. Sex hormon related functions in regenerating male rat liver. *Gastroenterology* 1986; 91:1263-1270.
84. Selden, A. C., and Hodgson, H. J. F. Growth factors and the liver. *Gut* 1991;32: 601-602.
85. Ethier, C., Kestekian, R., Beaulieu, C., Dube, C., Havrankova J., and Gacon-Barre', M. Vitamin D depletion retards the normal regeneration process after partial hepatectomy in the rat. *Endocrinology* 126: 2947, 1990.
86. Tsuji, H., Okamoto, Y., Kikuchi, E., Matsumoto, M., and Nakano, H. Prostaglandin E2 and rat liver regeneration. *Gastroenterology* 105: 495, 1993.
87. Rasmussen, T. N., Jorgensen, P. E., Almdal, T., Poulsen, S. S., and Olsen, P. S. Effect of gastrin on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Gut* 1990; 31: 92-95.
88. Martinez-Fernandez A and Amenta P.S. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J.* 1995; 9: 1401-1410.

89. Hepatic Regeneration and Growth Factors. Farnavilla A, Polimeno L, Barone M, Azzarone A, Starzl E. *Journal of Surgical Oncology Supplements* 1993; 3: 1-7.
90. Bucher NLR. Regeneration of the mammalian liver. *Int. Rev. Cytol.* 1963; 15: 245.
91. Mead JE, Braun L, Martin DA, Fausto N. In vivo response of hepatocyte to growth factor requires an initial priming stimulus. *Hepatology* 1994; 19: 489-497.
92. Gaub, J., and Iversen, J. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. *Hepatology* 1984; 4: 902-908
93. Andıran F, Ayhan A, Tanyel FC, Abbasoglu O, Sayek İ. Regenerative Capacities of Normal and Cirrhotic Livers Following 70% Hepatectomy in Rats and the Effect of alfa-Tocopherol on Cirrhotic Regeneration. *Journal of Surgical Research* 2000; 89: 184–188.
94. Uchida K, Sakaida I, Hironaka K, Kayana K, Okita K. Preventive Effect Of FK (Tacrolimus Hydrat) On Experimentally Induced Acut Liver Injury İn Rats. *Dig. Dis. Sci.* 2000; 45: 1996-2001.
95. Arthur MJP; Kovalski P, Millward-Sadler GH, Wright R. Oxygen derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology* 1985; 91: 1114-1112.
96. Nagakawa J, Hishinuma I, Hirota K et al. Involvement of tumor necrosis factor- α in the pathogenesis of activated macrophage-mediated hepatitis in mice. *Gastroenterology* 1990; 99: 758-765.
97. Arthur MJP, Kowalski-Saunders P, Wright R: *Corynebacterium parvum* elicited hepatic macrophages demonstrate enhanced respiratory burst activity compared with resident Kupffer cells in the rat. *Gastroenterology* 91:174 –181, 1986.
98. Stachura J, Tarnawski A, Ivey KJ, Mach T, Bogdal J, Szczudrawa J, Klimczyk B: Prostaglandin protection of carbon tetrachloride induce liver cell necrosis in the rat. *Gastroenterology* 81:211–217, 1981.

99. Coleman wb, Grisham Jw,. Epitelhial stem cells of the rodent liver. İn; Strain AJ, Diehl Am editors. Liver Growth and Perair. London Chapman &Hill 1998; pp.50-99.
100. Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, Van Der Kooy D. A fult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells have neural stem cells characteristics.
101. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. İnterleukin-6-type cytokine signalling trough the gp 130/Jak/ STAT pathway. Biochem J. 1998; 334:297-314.
102. Albert JH, Hansen LK. Cyclin D1 promotes mitogen –independent cell cycle progression in hepatocytes. Cell Hrowth Differ 1999;10: 397-404.
103. Loyer P, Cariou S, Glaise D, Bilodeau M, Baffet G, Guguen-Guillouzo C. Growth factor dependence of progression through G1 and S phases of adult rat hepatocyte in vitro. J Biol Chem. 1996; 271: 11484-92.
104. Fausto N.Liver regeneration. Journal of Hepatology 2000; 32: 19-31.
105. Francavilla A, Starzl T.E, Barone M . Study om mecanisms of augmentation of liver regeneration by cyclosporin and FK506 hepatology 1991; 14(1): 140-143.
106. Michalopoulos G, Zarnegar R. Hepatocyte growth factor. Hepatology 1992;15: 149.
107. Nagaike M, Hirao S, Tajima H. Renotropic functions of hepatocyte growth factor in renal regeneration after unilateral nephrectomy. J. Biol chem. 1991; 226: 22781-89.
108. Gohda E, Tsubouchi H, Nakayama H et al. Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. J. Clin İnvst. 1988;81: 414.
109. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor :moleculer structure reples in liver regeneration and other biological functions. Crit Rev Oncogenesis 1992; 3: 149.
110. Strain AJ.Hepatocyte growth factor. Another ubiquitous cytokine. J. Endocrinol 1993; 137:1.

111. Matsumoto K, Tajima H, Hamanoue M et al. Identification and characterization of 'injurin' an inducer of expression of the gene for hepatocyte growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992; 89: 3800.
112. Lui K-X, Kato Y, Narukawa .Importance of the liver in plasma clearance of hepatocyte growth factor in rats. Am. J.Physiol 1992; 263:G642.
113. Scahauedes RP, Savage CR. Isolation of rat epidermal growth factor: chemical, biological and immunological comparisons with mouse and human EGF. Comp. Biochem. Biophys.1986; 84B; 497.
114. Johansson S, Andersson G. Similar induction of the hepatic EGF receptor in vivo by EGF and partial hepatectomy. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990; 166; 661-665 .
115. Malhaupt B, Feren A, Fodor E. Liver expression of epidermal growth factor RNA. Rapid increase in immediate- early phase of liver regeneration. J. Biol. Chem. 1994; 269: 19667-69.
116. Noguchi S; Ohba Y, Oka T. J. Endocrinol 1991; 128: 425-426.
117. Lee- G-G, merlino G, Fausto N. Development of liver tumors in transforming growth factor α transgenic mice.Cancer Res. 1992; 52: 5162-5166.
118. Wong ST, Winchell LF, McCune BK. The TGF precursor expressed on the cell surface binds to EGF receptor on adjacent cells, leading to signal production. Cell 1989; 56: 495- 500.
119. Fausto N, Laird AD, Webber EM. Role of cytokines in hepatic regenerations. FASEB 1995; 9: 1527-1535.
120. Fausto N. Multifunctional roles for TGF β Lab. Invest. 1991; 65: 497-500.
121. Braun L, Mead JE, Panzica M et al. Elevation growth factor beta mRNA during liver regeneration a possible paracrine mechanism of growth regulation. Proc. Natl Acad Sci USA 1988;85:1988-2000.
122. McMahon JB, richards WL, del Campo AA, et. Al. Differential effect on transforming growth factor beta on proliferation of normal and malignant rat epithelial cells in culture. Cancer Res. 1986; 46: 4665-4670.

123. Wollenberg G, Semple E, Quinn B et al. Inhibition of proliferation of normal, paraneoplastic and neoplastic rat hepatocyte by transforming growth factor β Cancer Res. 1987; 47: 6595.
124. Schachert HK, Fan D, Fidler IJ. Transient inhibition of liver regeneration in mice by transforming growth factor β 1 encapsulated in liposomes. Cancer Commun 1988; 2: 165.
125. Braun L, Mead JE, Panzica M et al. Transforming growth factor β mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1988; 85: 1539-43.
126. Fujita J, Marino WM, Wada H, Jungbluth A, Mackrell PJ. Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice.
127. Pandey P, Avraham S, Place AE et al. Bcl-xL blocks activation of related adhesion focal tyrosine kinase/proline-rich tyrosine kinase 2 and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal protein kinase in the cellular response to methylmethane sulfonate. J Biol Chem 1999; 274: 8618-23.
128. Baker SJ, Reddy EP. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. Oncogene 1996; 12: 1-9.
129. Yamada Y, Krilova I, Peschon JJ, Fausto N. Analysis of liver regeneration in mice lacking type 1 or type 2 tumor necrosis factor receptor. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1997; 94:1441-46.
130. Webber EM, Bruix J, Pierce RH, Fausto N. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. Hepatology. 1998 Nov;28(5):1226-34.
131. Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Germann PG, Tiegs G, Wendel A. Murine hepatocyte induced in vitro and in vivo by TNF α requires transcriptional arrest. J. Immunol. 1994; 153: 1778-1788.
132. Goossens V, Grooten J, De vos K, Fiers W. Direct evidence for tumor necrosis factor induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995; 92: 8115-19.

133. Selzner M, Camargo CA, Clavien P-A. Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: Protective effect of IL-6 . *hepatology*. 1999; 30: 469-75.
134. Arner E.S, Erisksson S. Mammalian deoxyribonuclease kinases. *Pharmacol. Ther.* 1995; 67: 155-186.
135. Transplantation 1994 15;57:655-8. *Dig Dis .Sci.*1991 36:289-92. Assy N, Minuk G.Y. Liver regeneration methods for monitoring and their applications. *Journal of hepatology* 1997; 26: 945-952
138. Kit S. Thymidine kinase. DNA syntesis and cancer. *Mol. Cell. Biochem.* 1976; 11; 161-182.
139. Tsukamoto I, Wakabayashi M, Takebayashi K, Nomura S. Control of thymidine kinase during liver regneration after partial hepatectomy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; 1290: 267-272.
140. Chesseman K.H, Collins M, Maddix S, Milia A, Proudfoot K, Slater T.F et all. Lipid peroxidation in regenerating rat liver. *FEBS* 1986; 209: 191-196.
141. McGowan JA, Fausto Ornithine Decarboxylase activity and and the onset of deoxyribonukeic acid syntesis in regenerating liver. *Biochem J.*1978; 170: 1223-127.
142. Minuk GY, Gauthier T, Benarroch A. Chance in serum and hepatic polyamin concentrastions after 30%, %70 and %70 partial hepatectomy in rats. *Hepatology* 1990; 12: 542-546.
143. Alison M.R. *Physiol REW.* 1986; 66: 49541.
144. Martinez-Hernandez A, Chung A.E. The ultrastructural localization of two basement membran components: entactin and laminin in rat tissues. *J. Histochem Cytochem.* 1984; 32: 289-298.
145. Marinez-Hernandez A, Amenta P.S. The extracelluler matrix in the hepatic regeneration. *FASEB J.* 1995: 9; 1401-1410.
146. Krebs HA, Cornell NW, Lund P. Some aspects of hepatic energy metabolism. In: Lundquist F; Tygstrup N editors. *Regulation of hepatic metabolism*. New York: Academic Press, 1974. pp. 726–750.

147. Atkinson D.E. The energy charge of adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemist* 1968; 7: 4030.
148. Fukuhara K, Suzuki M, Unno M et al.. The degree of hepatic regeneration after partial hepatectomy in rats with peritonitis and the role of lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine* 1999; 26:881-886.
149. Marshansky V.N, Novgorodov S.A, Yaguzhinsky L.S. The role of lipid peroxidation in the induction of cation transport in rat liver mitochondria. *FEBS*. 1983;158: 27-30.
150. Emond J, Capron Laundereau M, Meriggi F, Bernuau F, reynes M, Houssin D. *Eur Surg. Res.* 1989; 21: 251-259.
151. Child CD, Barr D, Halswarde GK. Liver regeneration following portal-caval transposition in dogs. *Ann Surg* 1953;136: 600-608.
152. Alan R. G. Ginkgo Biloba Extract: A Review *Alt Med Rev* 1996;1: 236-242).
153. Chatterjee SS. Studies on the mechanisms of action of an extract of ginkgo biloba , a drug used for treatment of ischemic vascular disease. *Arch Pharmacol* 1982; 320: 52.
154. Pincemail J. Anti-radical properties of Ginkgo biloba extract. *Presse Med.* 1986; 15. 1475-1479.
155. Dumont E. Protection of polyunsaturated fatty acids against iron- dependent lipid peroxidation by a Ginkgo biloba extract. *Meth Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 1995; 17(2): 83-88.
156. Shen J.G, Zhou D.y. Efficiency of ginkgo biloba extract in a antioxidant protection against myocardial ischemia and reperfusion injury. *Biochem Mol. Biol. Int.* 1995; 35: 125- 134.
157. Janssens, D., C. Michiels, et al. (1995). Protection of hypoxia-induced ATP decrease in endothelial cells by Ginkgo biloba extract and bilobalide. *Biochemical Pharmacology* 50(7): 991-999.
158. Janssens, D., J. Remacle, et al. (1999). Protection of mitochondrial respiration activity by bilobalide. *Biochemical Pharmacology*. Jul 58(1): 109-119.

159. Boveris, A. D. and S. Puntarulo (1998). Free-radical scavenging actions of natural antioxidants. *Nutrition Research* 18(9): 1545-1557.
160. Xin W, Wei T, Chen C, Ni Y, Zhao B, Hou J. Mechanisms of apoptosis in rat cerebellar granule cells induced by hydroxyl radicals and the effects of EGb761 and its constituents *Toxicology* 2000;148 :103–110.
161. Chen C., Wei T.T., Gao Z.H., et al. Different effects of the constituents of EGb761 on apoptosis in rat cerebellar granule cells induced by hydroxyl radicals. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1999; 47; 397–405.
162. Nordberg J. And. Arn Er E. S. J. Reactive Oxygen Species, Antioxidants, And The Mammalian Thioredoxin System. *Free Rad. Biol. Med* 2001; 31(11):1287 1312.
163. Betteridge, D. J. What is oxidative stress? *Metabolism* 49:3–8; 2000.
164. Steer C.J. Liver regeneration. *FASEB J.* 1995; 9:1396-1400.
165. Kuppusamy, P.; Zweier, J. L. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J. Biol. Chem.* 264:9880–9884; 1989.
166. Zimmerman, B. J.; Granger, D. N. Mechanisms of reperfusion injury. *Am. J. Med. Sci.* 307:284–292; 1994.
167. Kontos, H.A., Wei, E. P. Ellis, E. F. Jenkins, L. W, Povlishock J. T, Rowe, G. T, Hess M. L. Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ. Res.* 1985; 57:142–151.
168. Thannickal V. J, Fanburg B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000; 279:1005– 1028.
169. Rhee, S. G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp. Mol. Med.* 1999; (31):53–59.
170. Fridovich, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999; 893:13–18.
171. Thomas E. L, Lehrer R. I., Rest R. F. Human neutrophil antimicrobial activity. *Rev. Infect. Dis.* 1988 ; 10 : S450–S456.

172. Rosen H, Orman J, Rakita R. M, Michel B. R, VanDevanter D. R. Loss of DNA-membrane interactions and cessation of DNA synthesis in myeloperoxidase-treated *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990; 87:10048–10052.
173. Dalton, T. P.; Shertzer, H. G.; Puga, A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 1999; 39:67–101.
174. Mates J. M, Perez-Gomez, C.; Nunez de Castro, I. Antioxidantenzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 1999; 32: 595–603.
175. Frei, B. On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1999; 222:196–204.
176. Finkel, T, Holbrook N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408: 239–247.
177. Bogdan, C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.* 2001; 11:66-75.
178. Thannickal, V. J.; Fanburg, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000; 279:1005– 1028.
179. Vandemile G, Grattagliano I, Altomare E, Turturro N, Guerrieri F. Effect of acetaminophen administration on hepatic glutathione compartmentation and mitochondrial energy metabolism in the rat. *Biochem Pharmacol.* 1996; 52: 1147-1154.
180. Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, Melov S et al. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 18:159–163; 1998.
181. Pfeifer H, Conrad M., Roethlein D, Kyriakopoulos A, Brielmeier M, Bornkamm at all. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J. Express Article* 2001;10:1096-0655.
182. Huber W.O. Bovine Cu-Zn superoxide dismutase an anti-inflammatory protein drug: discovery, toxicology and pharmacology. *Eur J. Rheumatol. Inflamm.* 1981; 4: 173-177.

183. Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aumann K. D, Roveri A, Schomburg D, et al. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 1995; 252:38–53.
184. Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J et al. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 1999;285:1393–1396.
185. Jones D. P, Eklow L, Thor H, Orrenius S. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. *Arch. Biochem. Biophys.* 1981; 210: 505–516.
186. Orrenius S, Jones D.P. Functions of glutathione drug metabolism. ED:Sies H, Wendel A. *Functions of glutathion in liver and kidney*. Berlin: Springer-Verlag. 1978; 164-175.
187. Kaplowitz N. The importance and regulation of hepatic glutathion. *Yale J. Biol. Med.* 1981; 54: 497-502.
188. Vendemiale G, Guerrieri F, Grattagliano I, Didonna D, Muolo L, Altomare E. Mitochondrial oxidative phosphorylation and intracellular glutathione compartmentation during rat liver regeneration. *Hepatology.* 1995; 21: 1450-1454.
189. Richie J.P. The roll of glutathion in aging and cancer. *Exper Gerontol.* 1992;27;615-626.
190. Williams C.H. *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes*. Boca raton, FL: Crc Inc. 1992; 121-211.
191. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation *Microbes and Infection* 5 (2003) 1317–1327.
192. Kirkman, H. N, Gaetani G. F. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*1984; 81:4343–4347.
193. Kirkman H. N, Rolfo M, Ferraris A. M, Gaetani G. F. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 13908–13914.

194. Onat T, Emerk K, Sözmen E. İnsan Biyokimyası. s. 673. Palme yayıncılık 2002 Ankara.
195. Emond J, Capron-Leadeureau M, Merrigi F, Bernuau J, Reynes M, Houssin D. Extend of hepatectomy in rats. Eur Surg Res 1989; 21: 251-59.
196. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of liver. Arc. Pathol. 1931; 12; 186-202.
197. Fishback FC. A morphologic study of regeneration of the liver after partial removal. Arch Pathol 1929; 7: 956-977.
198. Kagure K, Zhang YQ, Shibata H, Kojima I. Immediate onset of DNA synthesis in remnant rat liver after %90 hepatectomy by an administration of follistatin. J Hepatol 1998; 28: 977-984.
199. Zhao L, Hashimoto T, Suzuki Tand T. Manabe. Liver regeneration following partial hepatectomy in the subtotal pancreataic duct ligation rat model. NMJ.2001; 44: 193-200.
200. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrilamide gels. Anal Biochem 1971;44; 276-287.
201. Paglia D.E. and Valentine W.N.J.Lab: Clin .Med. 1967;70; 158.
202. Goldenberg D.M., Spooner RJ in Methods of Enzmatic Analises (Bergmeyer. H.H.Ed.) 3 rd edn. Vol3, pp 358-265 , Verlog Chemie, Deerfield Beach, Fl.
203. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflamation. Estimation of nuetrophil content with an enzyme marker. J. Invest Dermatol 1982; 78: 206-209.
204. Okhawa H, Ohishi N ve Yagi. Assay for lipid peroxides in animal tissue by Thiobarbituric acid reaction . Analytical Biochemistry 1979;95:351-358.
205. Stocks J, Dormandy TL. The autooxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. British Journal of hematology. 1971; 20: 95-111.
206. Xu H, Rosenlof L, Jones S. Bile secretion and liver regeneration in partially hepatectomized rats. Ann Surg 1993; 218: 176-182.

207. Selzner M, Clavien PA. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: Disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology* 2000; 31: 35-42.
208. Laconi S, Curreli F, Diana S, et al. Liver regeneration in response to partial hepatectomy in rats treated with retrorsine: a kinetic study. *J Hepatol* 1999; 31: 1069-74.
209. Tanaka N, Yamamoto H, Tatemoto A, Urabe T, Orita K. Regulation of liver regeneration by interleukin-2 and its inhibitors: cyclosporine A and FK 506. *Int J Immunopharmacol.* 1993 ;15(2):211-8.
210. Moser MJ, Gong Y, Zhang MN, Johnston J, Lipschitz J, Minuk GY. Immediate-early protooncogene expression and liver function following various extents of partial hepatectomy in the rat. *Dig Dis Sci.* 2001 ;46(4):907-14.
211. Stephen M, Woo J, Hasan NU, Whiting PH, Thomson AW. Immunosuppressive activity, lymphocyte subset analysis, and acute toxicity of FK-506 in the rat. A comparative and combination study with cyclosporine. *Transplantation.* 1989 ;47(1):60-5.
212. Zhuang H, Pin S, Christen Y, Dore S. Induction of heme oxygenase 1 by Ginkgo biloba in neuronal cultures and potential implications in ischemia. *Cell Mol Biol.* 2002; 48(6):647-53.
213. Üstdal K Muzaffer, Karaca Levent, Türköz Yusuf. *Biokimya. Enzimler, Koenzimler ve Enzimiyoloji.* Medipres yayıncılık 2003; 236-295.
214. Bendahan J, Tyler M, Lotz Z, McLeod H, Engelbrecht GH, Kahn D, Hickman R. The effect of administration of FK506 on delayed regeneration in flushed partially hepatectomized livers. *Transplantation.* 1994 15;57(5):655-8.
215. Kawano K, Kim YI, Kai T, Ishii T, Tatsuma T, Morimoto A, Tamura Y, Kobayashi M. Evidence that FK506 alleviates ischemia/reperfusion injury to the rat liver: in vivo demonstration for suppression of TNF- α production in response to endotoxemia. *Eur Surg Res.* 1994;26(2):108-15.

216. Manson MM, Neal GE. The influence of partial hepatectomy on the biphasic response of gamma glutamyl transpeptidase to aflatoxin B1. *Cancer Lett.* 1984; 25(1):81-7.
217. Yasui C, Yamanaka N , Oriyama T, Furukawa K, Okamoto E. Dynamics of serum and tissue alkaline phosphatase activity after hepatectomy in normal and cirrhotic rat liver. *Hep Res* 2000;16:112–123.
218. O'Brien PJ, Slaughter MR, Polley SR, Kramer K. Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats. *Lab Anim.* 2002;36(3):313-21.
219. Xu CS, Xia M, Lu AL et al. Changes in the content and activity of HSC70/HSP68, proteinases and phosphatases during liver regeneration Sheng Li Xue Bao. 1999;51(5):548-56.
220. El-Khatib AS, Moustafa AM, Abdel-Aziz AA, Al-Shabanah OA, El-Kashef HA. Ginkgo biloba extract (EGb 761) modulates bleomycin-induced acute lung injury in rats. *Tumori.* 2001;87(6):417-22.
221. Suleiman SA, Jones GL, Singh H, Labrecque DR. Changes in lysosomal cathepsins during liver regeneration. *Biochim Biophys Acta.* 1980 ;627(1):17-22.
222. Youngner T, Bengtsson G, Carlberg E, Engelbrecht C, Wieslander A. Possible significance of changes in the energy metabolism for the release of liver lactate dehydrogenase and for the uptake and incorporation of [14C]-orotic acid into liver ribonucleic acid after partial hepatectomy. *Exp Cell Biol.* 1980;48(6):393-403.
223. Haramaki N, Aggarwal S, Kawabata T, Droy-Lefaix MT, Packer L. Effects of natural antioxidant ginkgo biloba extract (EGB 761) on myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med.* 1994 ;16(6):789-94.
224. Al-Nasser IA. In vivo prevention of adriamycin cardiotoxicity by cyclosporin A or FK506. *Toxicology.* 1998 Nov 16;131(2-3):175-81.).
225. Sekas G, Cook RT. The evaluation of liver function after partial hepatectomy in the rat: serum changes. *Br J Exp Pathol.* 1979 ;60(5):447-52.

226. Masunaga H, Fujise N, Shiota A, Yamashita Y, Yasuda H, Higashio K. Amelioration of disordered hepatic protein synthesis by the deleted form of hepatocyte growth factor in models of liver failure in rats. *J Pharm Pharmacol.* 1996 ;48(8):876-9.
227. Kristian Strømgaard, Koji Nakanishi. Chemistry and Biology of Terpene Trilactones from Ginkgo Biloba. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004: 43; 1640–1658.
228. Argiles J, Herrera E. Changes in lipid composition of plasma lipoproteins after total hepatectomy in the rat. *Arch Int Physiol Biochim.* 1981; 89(5):461-5.
229. Field FJ, Mathur SN, LaBrecque DR. Cholesterol metabolism in regenerating liver of the rat. Cholesterol metabolism in regenerating liver of the rat. *Am J Physiol.* 1985 ;249(6 Pt 1):G679-84.
230. Yoshida A, Yamamoto A, Satoh K, Ichihara K, Hoshi K. Studies of repeated administration of FK-506 on myocardial metabolism in rats. *J Toxicol Sci.* 1998;23(5):403-9.
231. Kobayashi N, Suzuki R, Koide C, Suzuki T, Matsuda H, Kubo M. Effect of leaves of Ginkgo biloba on hair regrowth in C3H strain mice *Yakugaku Zasshi.* 1993; 113(10):718-24.
232. Drieu K, Vranckx R, Benassayad C, Haourigi M, Hassid J, Yoa RG, Rapin JR, Nunez EA. Effect of the extract of Ginkgo biloba .1992;2;26-29.
233. Van Tol A, Van Gent T, Vant Hooft FM, Vlasplolder F. High density lipoprotein catabolism before and after partial Atherosclerosis. 1978; 29(4): 439-48.
234. Kaibori M, Kwon AH, Oda M, Kamiyama Y, Kitamura N, Okumura T. Hepatocyte growth factor stimulates synthesis of lipids and secretion of lipoproteins in rat hepatocytes. *Hepatology.* 1998 ;27(5):1354-61.
235. Ozaras R, Tahan V, Aydin S, Uzun H, Kaya S, Senturk H. N-acetylcysteine attenuates alcohol-induced oxidative stress in rats. *World J Gastroenterol.* 2003; 9(4): 791-794.
236. Shaban NZ, Helmy MH, El-Kersh MA, Mahmoud BF. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin on hepatic lipid peroxidation and free-radical scavengers in

- rats given alpha-tocopherol or acetylsalicylate. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2003;135(4): 405-414.
237. Szymonik-Lesiuk S, Czechowska G, Stryjecka-Zimmer M, et al. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2003;10(4):309-315.
 238. Singh A, Kumar G, Naidu PS, Kulkarni SK. Protective effect of FK506 (tacrolimus) in pentylenetetrazol-induced kindling in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003 75(4):853-60.
 239. Lin SY, Chang HP. Induction of superoxide dismutase and catalase activity in different rat tissues and protection from UVB irradiation after topical application of Ginkgo biloba extracts. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1997;19(6):367-371.
 240. Seif-El-Nasr M, El-Fattah AA. Lipid peroxide, phospholipids, glutathione levels and superoxide dismutase activity in rat brain after ischaemia: effect of ginkgo biloba extract. *Pharmacol Res*. 1995 ;32(5):273-8.).
 241. Szymonik-Lesiuk S, Czechowska G, Stryjecka-Zimmer M, Slomka M, Madro A, Celinski K, Wielosz M. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2003;10(4):309-15.
 242. Ben-Shaul V, Sofer Y, Bergman M, Zurovsky Y, Grossman S. Lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the liver: comparison between rat and rabbit. *Shock*. 1999;12(4):288-93.
 243. Kucukgergin C, Uysal M. Effect of acute and chronic administration of sodium valproate on lipid peroxidation and antioxidant system in rat liver. *Pharmacol Toxicol*. 1999; 85(6):294-298.
 244. Sanchez-Campos S, Lopez-Acebo R, Gonzalez P, Culebras JM, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J. Cholestasis and alterations of glutathione metabolism induced by tacrolimus (FK506) in the rat. *Transplantation*. 1998 Jul 15;66(1):84-8.

245. El-Khatib AS, Moustafa AM, Abdel-Aziz AA, Al-Shabanah OA, El-Kashef HA. Ginkgo biloba extract (EGb 761) modulates bleomycin-induced acute lung injury in rats. *Tumori*. 2001; 87(6):417-22.
246. Wang H, Wang Y, Zhao X, Zhang Z, Miao Y. Protective effects of folium Ginkgo extract on experimental cerebral ischemia of mice *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 1998 ;23(3):169-71.
247. Principato GB, Locci P, Rosi G, Talesa V, Giovannini E. Activity changes of glyoxalases I-II and glutathione reductase in regenerating rat liver. *Biochem Int*. 1983; 6(2):249-55.
248. Srivastava RC, Dwivedi RS, Kaur G, Srivastava R. Haem and drug-metabolizing enzymes in regenerating rat liver. *Br J Exp Pathol*. 1982 ;63(1):1-5.
249. Tada H, Nakashima A, Awaya A, Fujisaki A, Inoue K, Kawamura K, Itoh K, Masuda H, Suzuki T. Effects of thymic hormone on reactive oxygen species-scavengers and renal function in tacrolimus-induced nephrotoxicity. *Life Sci*. 2002; 70(10):1213-23.
250. Soulie C, Nicole A, Christen Y, Ceballos-Picot I. The Ginkgo biloba extract EGb 761 increases viability of hnt human neurons in culture and affectsthe expression of genes implicated in the stress response. *Cell Mol Biol*. 2002; 48 (6):641-6.
251. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, et al. Transplantation 1993 ; 55 (6) : 1265-1272.
252. Y.I. Kim, M. Kobayashi, T Egashira. Augmentation of hepatocyte proliferation by immunosuppressants pretherapy is associated with up regulation of malondialdehyde production. *Res. Exp. Med*. 1993; 193: 337- 345.
253. S.Emre, Y. Genyk, L. K. Schluger et all. Treatment of tacrolimus-related adverse effects by conversion to cyclosporine in liver transplant recipients. *Transplant Int*. 2000; 13 (1): 73-78.

EK TABLOLAR

Ek Tablo 1: Sham Grubu Verileri

No	Ağırlık	Rezağ	Totkc	MI	TK	GPx	GR	SOD	ÜA	TB	DB	AST
1	352,0	-	8,00	0	5,12	6,20	4,53	3250	,90	,30	,20	85
2	367,0	-	8,96	0	5,40	7,30	6,33	3100	1,00	,30	,20	80
3	333,0	-	5,69	0	5,12	7,70	6,66	3220	1,10	,50	,40	65
4	384,0	-	6,65	1	5,00	8,60	6,65	3100	1,20	,60	,50	90
5	282,0	-	6,65	0	2,70	7,90	3,90	2220	2,10	,70	,50	92
6	306,0	-	5,97	0	4,25	8,50	3,17	2703	2,50	,50	,40	83
7	331,0	-	5,79	0	4,18	6,80	5,94	2948	1,60	,50	,30	57
8	303,0	-	5,61	0	6,40	8,50	5,43	3356	1,70	,30	,10	60
9	275,0	-	6,15	0	5,00	8,00	4,50	3125	2,40	,50	,30	80
10	294,0	-	5,20	0	3,50	8,70	5,20	3002	1,50	,50	,30	94

No	ALP	ALT	Koles	HDL	TRG	LDL	Tprot	GGT	LDH	MDA _d	MDA _p	MPO _p	MPO _d
1	140	58	128	109	98	1	7,1	20	865	2,00	1,0	57,3	13,1
2	180	45	158	95	125	6	7,4	21	825	1,25	2,5	15,3	7,6
3	156	42	133	107	96	3	6,9	18	902	3,25	2,2	18,6	11,9
4	125	45	113	100	83	4	6,6	16	851	1,10	2,6	89,0	9,8
5	189	42	121	104	67	1	7	14	796	2,20	2,5	29,7	11,3
6	129	40	105	91	72	4	7,2	19	750	2,40	3,0	50,5	12
7	148	56	126	110	56	5	6,8	21	798	2,10	2,2	39,0	7,2
8	201	41	183	167	135	5	7,3	22	801	2,56	2,2	55,3	9,8
9	156	40	88	75	93	2	7,3	16	659	2,96	2,5	52,0	5,3
10	125	40	125	113	72	3	6,9	25	911	1,90	2,4	29,0	7,2

Ek Tablo 2: Kontrol Grubu Verileri

No	Ağırlık	Rezağ	Totkc	MI	Child	TK	GPx	GR	SOD	ÜA	TB	DB	AST
1	316	7,41	10,7	0	3	11,4	10,75	7,15	4957	2,0	0,6	0,5	745
2	356	7,26	12,1	0	2,1	4,3	8,60	5,76	3434	1,6	0,5	2,2	759
3	380	8,38	12,9	0	3,3	7,9	7,80	11,5	3370	1,8	0,5	0,4	104
4	396	7,75	13,6	2	3,3	10,2	11,70	3,26	2311	1,5	0,5	0,4	174
5	425	7,36	14,4	0	4,6	11,4	11,02	6,50	3674	1,4	0,7	0,5	109
6	400	8,37	13,6	0	3,1	5,8	9,90	7,50	4043	2,0	0,5	0,4	90
7	388	6,04	13,2	0	1,4	3,8	13,42	3,47	1716	2,2	0,5	0,4	184
8	330	7,68	11,2	1	3,3	2,3	8,18	11,8	3412	2,3	0,4	0,3	125
9	287	6,01	9,76	2	4,0	4,3	11,30	10,3	3582	2,4	0,8	0,7	135
10	386	6,70	13,1	0	1,0	3,1	4,60	19,5	4002	1,9	0,6	0,5	211
11	350	6,70	11,9	0	2,0	4,2	10,30	5,75	3370	2,0	0,5	0,4	211

No	ALP	ALT	Koles	HDL	TRG	LDL	Tprot	GGT	LDH	MDA _d	MDA _p	MPO _p	MPO _d
1	214	745	48	26	49	15	6,7	3	650	4,4	4,8	183,2	39,6
2	369	69	55	16	39	30	5,7	26	1301	9,0	4,5	94,1	28,7
3	286	56	41	25	43	7	6,4	7	992	7,6	1,4	107	26,7
4	269	61	59	31	66	15	6,0	1	1122	6,1	6,5	84,2	72,3
5	162	110	79	31	76	33	6,4	27	1515	6,3	6	222,8	53,5
6	221	85	41	14	37	20	6,3	53	1671	5,3	4,8	84,2	42,6
7	214	99	40	29	53	1	6,3	23	1332	5,1	5,4	95	40,6
8	299	98	56	36	38	13	6,5	38	1737	5,8	8,4	57,4	41,2
9	222	112	33	13	44	11	6,8	21	1897	4,5	3,8	105,9	42,7
10	284	91	26	18	35	1	6,9	37	2516	5,5	3,5	82,2	38,5
11	674	91	59	41	59	6	5,9	4	1462	3,9	4,2	98	20,8

Ek Tablo 3: EGb761+hep Grubu Verileri

No	Ağırlık	Rezağ	Totkc	MI	Child	TK	GPx	GR	SOD	ÜA	TB	DB	AST
1	383	9,87	13,1	8,8	8,5	12,04	6,20	8,03	5397	1,2	1,5	1,4	617
2	350	8,75	11,9	8,8	8,4	7,40	7,10	10,00	3932	1,0	0,6	0,5	428
3	320	7,49	10,9	7,3	6,8	11,12	12,23	6,26	2935	1,1	0,7	0,5	336
4	353	6,43	12	7,1	6,2	9,02	9,60	8,00	3890	1,3	0,5	0,4	354
5	366	8,45	12,4	6,5	6	4,70	25,40	9,96	1030	1,3	6,9	6,1	578
6	380	9,45	12,9	8,8	8,4	8,25	6,60	6,94	4677	1,4	0,4	0,3	427
7	379	9,86	12,9	7,3	7	7,18	5,50	7,47	3895	1,3	0,5	0,4	356
8	321	7,75	10,9	7,1	6,7	8,40	5,10	8,46	2937	0,8	0,3	0,2	329
9	354	8,43	12,1	7	6	16,33	6,90	6,98	4761	1,4	0,6	0,5	1140
10	274	6,07	9,3	4,9	4,3	4,50	8,60	11,01	4465	1,2	1,6	1,2	2940
11	307	6,57	10,4	5,7	5,1	16,60	8,00	8,3	3791	1,7	0,7	0,6	1424

No	ALP	ALT	Koles	HDL	TRG	LDL	Tprot	GGT	LDH	MDA _d	MDA _p	MPO _p	MPO _d
1	1187	289	111	30	97	62	5,8	64	2168	4,39	7,13	97,02	24,8
2	886	322	67	42	61	13	5,3	5	1205	9,02	3,45	163,35	13,9
3	1072	253	97	36	96	42	5,6	11	997	7,64	8,03	133,65	11,9
4	654	137	68	42	82	9	5,2	5	2178	6,12	5,27	171,27	18
5	2481	382	116	14	87	85	5,7	13	1175	6,28	4,2	0,99	23,8
6	577	192	75	48	64	14	5,9	7	1884	7,4	18,03	50,49	24,8
7	686	168	88	27	65	48	5,4	8	1256	5,09	7,48	106,92	22,8
8	745	146	91	52	75	24	5,3	7	1655	5,79	3,45	85,14	15,8
9	901	767	55	24	78	15	5,3	38	1397	4,49	2,46	155,43	13,9
10	304	1733	85	35	76	32	4,5	25	1367	5,4	6	205,92	2,1
11	729	941	83	36	79	32	5	54	1875	8,94	3,35	169,29	26,7

EK Tablo 4: FK506 +hep Grubu Verileri

No	Ağırlık	Rezağ	Totke	sakrkc	MI	chlds	TK	GPx	GR	SOD	ÜA	TB	DB	AST
1	347	6,82	11,8	6	4	5,5	11,2	5,9	16,6	1601	0,9	0,4	0,3	515
2	320	6,40	10,88	6,2	4	5,3	5,5	13,2	9,6	2042	1,0	0,3	0,2	675
3	321	5,92	10,91	6,3	2	5,9	11,4	6,2	9,9	9026	1,0	0,3	0,2	563
4	347	6,16	11,8	6,5	12	4,7	6,3	12,4	7,3	3360	0,5	0,3	0,2	383
5	324	6,20	11,02	6	4	3,4	14,1	11,9	8,6	3785	0,7	1,3	1,2	1260
6	322	8,24	10,95	4,9	12	3,7	6,3	6,6	13,2	3212	0,6	1,2	1	449
7	404	8,68	13,74	6,4	0	5,8	12,1	11,2	13,3	2585	0,6	6,9	6	922
8	349	6,79	11,87	5,6	1	4,8	11,7	15	13,8	3250	0,9	6,3	6,1	902
9	299	6,74	10,17	5,7	6	5,2	11,5	15,8	6,6	2582	1,3	0,4	0,3	387
10	301	8,09	10,23	6,3	6	5,1	8,4	13,2	4,5	2912	0,1	0,3	0,2	684

No	ALP	ALT	Koles	HDL	TRG	LDL	Tprot	GGT	LDH	MDA _d	MDA _p	MPO _p	MPO _d
1	616	223	86	36	76	33	5,3	8	1438	8,5	3,9	140,6	15,8
2	489	370	59	33	58	14	5,4	6	1106	4,3	5,8	138,6	26,7
3	545	309	50	30	61	8	5,7	10	2434	14,4	5,2	142,6	27,7
4	490	179	57	41	42	7	4,7	8	1465	11,2	1,6	76,2	4,9
5	816	1151	90	22	76	53	5,4	15	1845	5,3	5,6	54,5	17,8
6	637	2224	119	30	61	45	5,5	17	1596	8,8	6,2	174,2	31,7
7	2525	668	88	4	87	98	5,8	16	3554	15,9	5,1	224,7	23,4
8	1257	795	71	2	79	70	5,3	18	1847	11,2	5,3	28,7	53,5
9	1345	244	78	36	78	20	5,3	17	1460	5,9	6,5	141,6	11,8
10	940	499	75	37	50	25	5,3	10	2062	7,6	7,7	125	20,8

EK Tablo 5: EGb761+ FK506 +Hep Grubu Verileri

No	Ağırlık	Rezağ	Totkc	Sacrf	MI	Child	TK	GPx	GR	SOD	ÜA	TB	DB	AST
1	412	7,95	14,01	6,9	4	6,14	2,2	17,6	7,3	3600	1,1	0,4	0,3	349
2	312	7,88	10,61	3,5	0	3,11	1,5	14,7	6,7	2552	1	2,1	2	690
3	379	8,2	12,89	5,1	4	4,53	1,3	10,3	6,5	2874	0,6	3,2	3	750
4	342	6,91	11,63	5,6	2	3,87	4,1	14,5	3,9	2420	0,9	2,1	2	690
5	357	7,93	12,14	6,9	0	5,32	3,2	10,7	8,2	3494	0,9	0,4	0,3	305
6	352	8,36	11,97	6,1	4	5,63	4,6	8,58	3,2	4558	1,1	5	4,4	599
7	364	7,42	12,38	6,2	6	5,51	8,1	9,5	5,9	3458	1,3	0,6	0,5	680
8	300	7,73	10,2	6,3	2	5,98	8,7	7,6	9,4	4610	0,7	5	4,4	737
9	284	7,05	9,66	6,3	6	3,41	9,1	10,95	5,4	3056	1,5	0,7	0,6	402
10	303	7,76	10,3	6,2	6	5,63	8,3	10,2	5,2	3690	0,7	0,6	0,5	627
11	309	7,1	10,51	6,3	4	4,97	8,4	7,9	8,6	4583	0,7	0,4	0,3	723

No	ALP	ALT	Koles	HDL	TRG	LDL	Tprot	GGT	LDH	MDA _d	MDA _p	MPO _p	MPO _d
1	824	216	87	51	78	20	5,3	6	1201	5,3	6,2	117	50,6
2	751	1140	75	32	69	25	5,4	20	1563	3,3	6,2	154,4	48,1
3	1283	1540	69	20	113	26	5,5	13	1452	7	8,2	158,4	51,5
4	1161	1370	73	44	82	12	5,8	19	3245	6,2	8,2	97	82,2
5	817	155	74	58	48	6	5	11	1460	5,4	6,5	116,8	76,2
6	1588	1196	66	5	69	47	5	13	1049	7,4	10,2	39,6	28,7
7	424	347	32	13	36	12	5,8	4	1366	5,9	8,3	100,9	51,6
8	1904	385	111	5	69	93	5,6	14	1288	5,9	12	41,6	46,5
9	603	157	69	47	82	5	5,7	33	3277	3,84	12,3	217,8	48,5
10	824	311	58	34	57	12	5	4	2293	7,10	4,7	110,9	48,5
11	541	387	71	30	71	25	5,5	5	1887	6,10	6,5	132,7	33,7