

1. GİRİŞ

Organizma, yüksek rakımda yaşama (2000-2500 metre)¹ gibi fizyolojik nedenlerle ya da organ nakli (karaciğer, böbrek, kalp vb), kronik kardiyovasküler/pulmoner hastalıklar gibi patolojik nedenlerle iskemi/hipoksiye maruz kalabilir. Hipoksi sonucu, hücre membranında/organellerde yapısal ve metabolik değişiklikler görülür. Mitokondrilerde hacim artışı, krista parçalanması, bal peteği görünümü vb mikroskopik bulgular ortaya çıkar. Hücrede oksijenin azalmasına bağlı olarak mitokondride oksidatif fosforilasyon azalır ve hücrenin enerji ihtiyacı için anaerobik metabolizma (glikoliz) devreye girer²⁻³⁻⁴. Endoplazmik retikulumda kalsiyum homeostazında bozukluklar, glikozilasyonun azalması ve yanlış katlanmış proteinlerin artması gibi hipoksik strese bağlı değişiklikler görülür. Hipoksi sırasında reaktif oksijen türlerinin (ROS) yani süperoksit (O_2^-), peroksinitrit ($ONOO^-$), hidroksil (OH^-) radikallerinin ya da radikal olmayan, ancak OH^- oluşumuna yol açtığı için reaktif bir ürün sayılan hidrojen peroksitin üretiminde artış olur ve antioksidan savunma sisteminin aktivitesindeki azalmaya bağlı olarak hücrelerde oksidatif hasar görülebilir. Normal fizyolojik koşullar altında metabolizma sonucu açığa çıkan ROS, hücrelerdeki antioksidan savunma sistemleri aracılığı ile yok edilir⁵⁻⁶. Hipoksi sırasında ise mitokondriyal solunum zincirindeki sitokrom oksidaz (Kompleks IV) tarafından suya indirgenen oksijen miktarı azalır ve bu durum mitokondride strese neden olarak ROS oluşumunu artırır. Böylece hücrede oksidatif stres görülür⁷. Hipoksik stresle birlikte hücrenin antioksidan savunma sistemlerini oluşturan

glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz, süperoksit dismutaz gibi enzimatik; glutasyon (GSH) ve NADPH (Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat), ADP (Adenozin difosfat) gibi enzimatik olmayan hücresel savunma sistemleri de hasar görür ve aktiviteleri azalır⁶⁻⁸. Süperoksit radikallerinin süperoksit dismutaz ile hidrojen peroksite dönüşümü azalır. Bu durum, hücre membran hasarı ve DNA(Deoksiribonükleik asit) hasarı sonucu apoptozun başlamasına neden olur⁹.

İskemik/ hipoksik koşullar, birçok dokuda akut veya kronik olarak görülebilir. Kalp, iskelet kası, beyin, karaciğer gibi dokuların bu koşullara verdiği yanıtlar, hücrelerde birçok farklı süreçlerin başlamasına neden olur. Örneğin; iskemik/hipoksik koşullardan en önce etkilenen hücreler nöronlardır. Nöronlardaki akut olaylar; öncelikle nöron eksitabilitesini düzenleyen iyon kanallarında görülür. Hücre içerisinde ATP'nin (Adenozin tri fosfat) azalmasına bağlı olarak iyon homeostazında bozukluklar ortaya çıkar. Hücre içinde kalsiyumun birikmesi; hücrede sitotoksik yolların aktive olmasına ve nöronlarda eksitotoksik hasara neden olur. Oluşan ROS; inflamasyon ve apoptoz sürecini başlatır².

Önkoşullama kısa süreli travma ile indüklenen ve ölümcül düzeyde hasara karşı güçlü koruma sağlayan bir olaydır. Yapılan birçok hayvan çalışmasına göre, önkoşullama organizmada pek çok dokuya uygulanmaktadır. Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalık modellerinde iskemik inme, neonatal hipoksi/iskemi, travma, çeşitli maddeler ile beyinde akut hasara karşı önkoşullama yapılabildiği gösterilmiştir. Önkoşullama iskemik hipoksi, hiperbarik

oksijen, hipotermi, hipertermi, nörotoksin uygulanması gibi çok çeşitli uyaranlarla yapılabilmektedir¹⁰.

İskemik veya hipoksik önkoşullama, hücrelerin kısa süreli olarak hipoksiye veya iskemiye maruz bırakılmasıdır. Önkoşullama ile sağlanan koruyucu etki mekanizmaları, aklimatizasyon süreçlerine göre daha hızlı devreye girmektedir. Fakat bu koruyucu etki mekanizmasının nasıl geliştiğine dair veriler yeterli değildir. Son yıllarda iskemik veya hipoksik önkoşullamanın böbrek, akciğer, kalp ve beyin gibi çeşitli dokularda koruyucu etkisinin olduğu in vivo ve in vitro deneysel yöntemlerle gösterilmiştir¹¹⁻¹².

Günümüzde hipoksik kamara pek çok çalışmada çeşitli dokularda önkoşullamanın ya da ağır hipoksinin etkilerini araştırmak için kullanılmaktadır¹³.

Yapılan çalışmalarda kalp kasında hipoksik/iskemik önkoşullamanın kalbi, miyokardiyal infarktüs ve apoptoza karşı koruduğu bulunmuştur. Bunu artmış endoplazmik retikulum stresini önleyerek ve endotel hücrelerinde hipoksi/reoksijenasyon hasarını azaltarak yaptığı görülmüştür¹⁹. Yapılan başka çalışmalarda hipoksik önkoşullamanın, iskemi reperfüzyon hasarına karşı böbrek hücrelerini koruduğunu ve bu koruyucu etkinin HIF-1-alfa (Hipoksi ile indüklenen faktör-1-alfa) aracılı bcl-2 sinyal yolağı ile bağlantılı olduğunu göstermişlerdir¹¹.

Karaciğer, oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemlerinin normal şartlarda sürdürülmesinde çok önemli olduğu için hipoksik koşullardan öncelikle etkilenen organlar arasındadır¹⁴. Karaciğerde hipoksi sonucu oluşan

oksidan strese bağlı olarak ROS birikimi, hücre membran fonksiyon bozuklukları, protein ve DNA oksidasyonu ve sonunda hepatosit hasarı görülür. ROS hasara neden olmakla birlikte aynı zamanda hücredeki antioksidan savunma mekanizmalarını da ind klemektedir¹⁶. Böylece glutatyon ve süperoksit dismutaz, katalaz gibi antioksidan enzimlerin seviyeleri azalır ve oksidatif stres sonucu protein kinaz-C (PK-C) aktive olur¹⁵. Bununla birlikte hipoksik önkoşullamanın karaciğerdeki oksidan/antioksidan sistemler üzerindeki etkilerinin altında yatan mekanizmalar henüz açıklığa kavuşturulamamıştır.

Bu bilgiler ışığında planladığımız çalışma ile hipoksinin neden olduğu hasarlardan öncelikle etkilenen ve zarar gördüğü durumlarda da organizmanın tüm metabolizmasını etkileyen karacięerde¹⁷ hipoksik önkoşullamanın oksidan sistem üzerindeki olası olumlu etkilerini görmeyi hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hipoksi

Hipoksi, organizmada fizyolojik veya patolojik koşullar altında oksijen eksikliği sonucu tüm vücutta ya da tek bir dokuda görülebilir. Düşük oksijen düzeylerine karşı koruma sağlamak için artmış anjiogenez, eritropoez ve hücre içine glukoz girişi gibi birçok fizyolojik süreçler başlatılır²⁰.

Hipoksi, birçok dokuda akut (saniyeler-dakikalar) veya kronik (saatler-günler) olarak ortaya çıkabilir. Moleküler seviyede akut hipoksi, proteinlerin modifikasyonuna bağlı olarak hücrede hızlı ve kısa süreli yanıtlara neden olurken kronik hipoksi mRNA (Haberci Ribonükleik Asit) ve protein ekspresyonunda değişiklikler gibi geç ve uzun süreli yanıtlara neden olur.

Hipoksi sürekli veya aralıklı olabilir ve oksijen konsantrasyonları da düşük veya bazal seviyelerde uygulanabilir. Tekrarlayan hipoksi ve reoksijenasyon, aralıklı hipoksiyi sürekli hipoksi patofizyolojisinden ayırır. Örneğin; kronik sürekli hipoksi, pulmoner hipertansiyon ile sonuçlanırken kronik aralıklı hipoksi, sistemik hipertansiyon gelişimi ile sonuçlanmaktadır²¹.

Kalp, iskelet kası, beyin, karaciğer gibi dokuların hipoksik koşullara verdiği yanıtlar, hücrelerde birçok farklı süreçlerin başlamasına neden olur.

Örneğin; iskemik/hipoksik koşullardan en önce etkilenen hücreler nöronlardır. Nöronlardaki akut olaylar; öncelikle nöron eksitabilitesini düzenleyen iyon kanallarında görülür. Hücre içerisinde ATP'nin azalmasına bağlı olarak iyon homeostazında bozukluklar ortaya çıkar. Hücre içinde kalsiyumun birikmesi; hücrede sitotoksik yolların aktive olmasına ve nöronlarda eksitotoksik hasara neden olur. Oluşan ROS; inflamasyon ve apoptoz sürecini başlatır².

Doku hipoksisi, kronik inflamatuvar hastalıklarda görülen bir durumdur. Hipoksi, vasküler düz kas hücrelerinin fonksiyonlarında ve damar oluşumunda da önemli rol oynar²².

Oksijen yetersizliği, kalp krizi, iskemik inme ve travmatik zedelenme gibi birçok hastalıkta önemli rol oynar. Aerobik organizmalar, mitokondride hücresel enerji ihtiyaçları için oksijeni kullanırlar. Bu nedenle oksijen yetersizliği, az enerji üretimiyle sonuçlanır. Düşük oksijen, yüksek enerji ihtiyacı olan ve bunu glikolitik yollarla karşılayan sinir sistemi için yıkıcı olabilir. Buna karşılık kök hücre ve tümör hücreleri gibi diğer hücreler, düşük oksijen seviyelerine adapte olup gelişirler²³.

Akciğerler, organizmada yeterli oksijenasyonun sürdürülmesi için en önemli organlardan biridir. Hipoksi, yüksek rakımda yaşamak gibi fizyolojik olarak veya obstruktif uyku apnesi, akut akciğer hasarı, astım krizi, atelaktazi, kronik obstruktif akciğer hastalığı, idiyopatik pulmoner hipertansiyon gibi patolojik olarak akciğerlerde ortaya çıkabilir. Akut hipoksi; pulmoner arter basıncının artmasına, ödem ve akciğer inflamasyonuna neden olur. Kronik hipoksi

ise vasküler proliferasyonun artması, kronik pulmoner hipertansiyon ve sağ kalp yetmezliği ile sonuçlanır²⁴.

2.2. Oksidatif Stres

Oksidatif stresin, ROS oluşumuna neden olan süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil gibi serbest oksijen radikalleri ile organ hasarında önemli rol oynadığı bilinmektedir²⁵.

Reaktif oksijen türlerinin yüksek seviyelerinin yaşlanma ve kronik hastalıklarla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Aerobik organizmalar, mitokondrilerinde oksijen kullanarak kimyasal enerji üretirler. Mitokondri, hücre içinde ROS'un olduğu en önemli yerdir. Mitokondriyal ROS kaynakları, elektron transport zinciri ve NOS (Nitrik Oksit Sentaz) reaksiyonudur. ROS'un mitokondri dışı kaynakları ise çevresel kirleticiler, radyasyon veya organizmadaki metabolik reaksiyonların son ürünleri olarak ortaya çıkabilir. Süperoksit kaynakları; moleküler oksijenin tek elektronu indirgenme reaksiyonlarında rol oynayan NAD(P)H oksidaz, ksantin oksidaz ve NOS aktivitesi sonucu oluşur. Ayrıca peroksinitrit ve nitro-oksidatif stresin hücrel hasara neden olan ikincil tek elektronlu oksidanlar olduğu bilinmektedir. Hücreler, süperoksit dismutaz (Mn-SOD, Cu/Zn-SOD ve hücre dışı SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz, peroksiredoksinler gibi enzimler ile ve glutatyon, tioredoksin, askorbat, α - tokoferol, ürik asit gibi enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri ile ROS'a karşı koruma sağlarlar²⁶.

Yapılan çalışmalara göre; serbest toksik radikal oluşumu için ne kadar oksijenin reaksiyona girdiği tam bilinmemekle birlikte tüketilen toplam oksijenin yaklaşık %1,5–5’inin olduğu düşünülmektedir.

Reaktif oksijen türlerinin hücrelerde, örneğin; hücre içi sinyallerinin ve indirgenme reaksiyonlarının düzenlenmesi gibi çeşitli yerlerde kullanımının fizyolojik faydaları olduğu gösterilmiştir. Düşük ROS seviyeleri fizyolojik olarak proliferasyon, apoptoz ve NF-kappa-B (Nükleer faktör-kappa-B), HIF-1 α gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu indüklemektedir. ROS ayrıca tümör nekrozis faktör-alfa (TNF α), interlökin-1-beta (IL-1 β) ve interferon- γ (IFN- γ) gibi proinflamatuvar sitokinlerin aktivasyonuna da aracılık etmektedir. Bu sitokinlerin ROS üretimini aktifleyen ikincil haberciler olarak rol oynadığı düşünülmektedir. Artmış oksidatif stres; metallothioneinler ve ısı-şok proteinleri gibi antioksidan proteinlerin up-regülasyonu ile sonuçlanmaktadır.

Oksidatif stresin azaltılması  basamakta gerçekleşebilir: Oksidasyona neden olan çevresel zararlı maddeleri azaltarak; endojen ve eksojen antioksidanları arttırarak ve mitokondriyal enerji üretimini ve etkinliğini arttırarak, oksidatif stres oluşumunu azaltarak olabilir.

Endojen oksidatif stres iki yolla nlenebilir: ROS oluşumunu engelleyerek veya antioksidanlarla birlikte ROS’un etkisizleştirilmesi ile olabilir. Epidemiyolojik alışmalar, sentetik antioksidanlar ile tedavinin oksidatif stres ve yaşam süresi açısından koruyucu olmadığını göstermiştir. Oksidatif stres ile

indüklenen hasarın azaltılması, ancak çok iyi koordine olmuş antioksidan savunma sistemlerinin kesintisiz çalışması ile mümkündür²⁶.

2.2.1. Nitrik oksit

Nitrik oksit (NO) ilk defa endotel kaynaklı gevşetici faktör olarak tanımlanmıştır. Hücresel hasara aracılık etmekle birlikte hücre dışı ortamda nöromodülatör ve nörotransmitter olarak da görevler üstlenmektedir²⁷⁻²⁸.

Fizyolojik koşullar altında NO sitoprotektif bir ajan olarak rol oynar. Bununla birlikte NO; inflamasyon ve iskemi-reperfüzyon hasarı gibi patolojik koşullarda ortaya çıkan süperoksit radikallerinin varlığında peroksinitrite dönüşür²⁷.

Peroksinitrit; lipid, protein ve DNA ile direkt oksidatif reaksiyonlar/indirekt radikal aracılı mekanizmalar ile etkileşimde bulunur. Bu reaksiyonlar, oksidatif hasara neden olan hücresel yanıtı artırarak apoptoz/nekroz süreçlerini başlatır. Peroksinitrit oluşumu; inme, miyokard infarktüs, kronik kalp yetmezliği, diyabet, kanser, nörodejeneratif bozukluklar gibi hastalıklara neden olur²⁸.

Nitrik oksitin aynı zamanda direkt olarak etki gösteren vazodilatör ajandır. NO, L-Arjinin'den katalize edilerek sentezlenir. NO'nun elde edilmesinde rol oynayan üç farklı nitrik oksit sentaz enzim izoformu vardır⁴. Bu izoformlar Tip-1- nöronal NOS (nNOS), Tip-2- indüklenbilir NOS (iNOS), Tip-3-

endotelyal NOS (eNOS)'tur. nNOS ilk olarak serebellum, hipotalamus, striatum, serebral korteks ve hipokampusun değişik nöron tiplerinden ve çizgili kaslardan izole edilmiştir. iNOS ilk olarak aktive olmuş makrofaj, astroglia ve mikroglialardan izole edilmiştir. eNOS ise ilk olarak kapillerde tanımlanmıştır.

Endotelyal NOS ve nöronal NOS yapısal olarak kendileri ekspresyon gösterirler, fakat hücre içinde kalsiyumun artmasına bağlı olarak stimüle olurlar. İndüklenebilir NOS ise immün cevapta rol alır ve kalsiyumdan bağımsızdır²⁹.

Nitrik oksitin infeksiyon ve akut/kronik inflamasyon gibi hastalıkların patofizyolojisine katkısı birçok faktöre bağlı olmasına rağmen NOS aktivasyonu/indüksiyonu ve NO'nun aşırı üretimi, tüm bu hastalıklarda görülen bir özelliktir³⁰.

Nitrik oksitin radikal olarak reaktivitesi düşüktür, ancak metal içeren bileşikler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girerler. Özellikle lipid radikallerle tepkimeye girmesi NO'ya antioksidan bir etki kazandırır. Fizyolojik derişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksiti ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin indüksiyonu sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bu reaktif türler NO'nun dolaylı etkilerinden sorumludur ve hücrel moleküllerin nitrozilasyonuna, nitrasyonuna, nitrozasyonuna yol açarak, proteinlerin ve enzimlerin aktivitelerinin sonlanmasına neden olabilirler³¹.

2.2.2. Malondialdehit (MDA)

Lipid peroksidasyonu, hücre membranındaki polienoik yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan otokatalitik bir reaksiyon sürecidir³². Poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu, reaktif karbonil bileşiklerinin ürünü olan ROS ile sonuçlanır. Lipid peroksidasyonu, birçok ksenobiyotiğin toksisitesinde önemli rol oynamaktadır ve oksidatif hasarın göstergesi olarak lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA kullanılmaktadır³³⁻³⁴.

Serbest oksijen radikallerinin; savunma sisteminin koruyucu etkisini aşacak şekilde fazla oluşmaları sonucu, metabolizmada zararlı etkiler oluşturur. SOR'dan en yüksek oranda etkilenen bileşik lipidlerdir. Membranlarda bulunan fosfolipidlerdeki doymamış bağlar ve kolesterol, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek, peroksidasyon ürünlerini meydana getirir. Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü MDA'dır³⁵⁻³⁶.

Oluşan MDA; hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek, membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açarak, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliğinden dolayı, DNA'nın nitrojen bazları ile de reaksiyona girebilir. Bundan dolayı da MDA mutajenik, kültür hücreleri için genotoksik ve karsinojeniktir³⁷⁻³⁸.

2.3. Karaciğerde Oksidatif Stres ve Glutasyon

Oksidatif stres; DNA ve protein gibi makromoleküllerin modifikasyonuna ve lipid peroksidasyonuna neden olur. Oksidatif stres sonucunda serbest radikallerin üretilmesi; kronik inflamasyon, kanser gibi pek çok hastalığın gelişimi ile ilişkilendirilmiştir³⁹.

Oksidatif stresin, ROS oluşumuna neden olan süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil gibi serbest oksijen radikalleri ile organ hasarında önemli rol oynadığı bilinmektedir. Karaciğerde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmaları ile oksidatif stres ortadan kaldırılır. Enzimatik antioksidan savunma mekanizmaları arasında SOD, katalaz, glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz bulunmaktadır. Bu antioksidanlar oksidatif stres ile ilişkili serbest oksijen radikallerinin yakalanması ve redoks dengesinin sürdürülmesinde vücudun önemli savunma sistemini oluşturmaktadırlar. Artmış ROS üretimi ve antioksidan enzimlerin aşırı tüketimi, oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasına neden olur³⁴.

Süperoksit dismutaz-1, sitosol ve mitokondri iç membran aralığına yerleşmişken SOD-2, mitokondride; SOD-3 hücre dışında bulunmaktadır. SOD'un üç formu da süperoksiti hidrojen peroksit ve suya dönüştürür.

Katalaz, peroksizomlarda bulunan, yapısında demir içeren bir enzimdir ve hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşümünü katalizler.

Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz, kofaktör olarak NADPH kullanırlar ve glutasyonun oksitlenmesi ve indirgenmesinde rol alırlar.

Antioksidan savunma sistemlerinin enzimatik olmayan mekanizmasını glutasyon oluşturmaktadır. Glutasyon, 1888 yılında Rey Pailhade tarafından keşfedilmiş ve 1930 yılında da glutasyonun L-glutamil-sisteinil-glisin yapısında bir tripeptit olduğu ortaya konulmuştur³²⁻⁴¹⁻⁴²⁻⁴³. GSH, sitosolde enerji gerektiren iki basamaklı reaksiyon ile glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden glutamat sistein ligaz (γ -glutamilsistein sentaz) enzimi ile sentezlenir³⁵. GSH, hücrede endoplazmik retikulum, sitosol ve mitokondri gibi farklı organellerde dağılım gösteren bir tripeptittir. Biyosentez, sitoplazmada yer alan glutamilsistein sentetaz ve glutasyon sentetaz enzimlerinin katalizi ile gerçekleşmektedir. Hücre içi yapılar ve diğer hücrelerin glutasyon ihtiyacı sentezlenen glutasyonun plazma ve hücreler arası membranlarda yer alan özgün taşıyıcı proteinlerle aktarılması ile karşılanmaktadır. Glutasyon hücre içi major olmayan bir protein olan tiyoldür. Hücrede serbest ya da çeşitli moleküllere (özellikle proteinlere) bağlı olarak bulunabilmektedir. Serbest glutasyon formu indirgenmiş (GSH) veya oksitlenmiş tiyol (GSSG) formlarında bulunur.

Glutasyon hücre içi antioksidan sisteminin bir üyesi olup, hücre redoks dengesinin sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. GSH; serbest radikalleri ve diğer reaktif oksijen türlerini (hidroksil radikali, lipid peroksil radikali, peroksinitrit ve hidrojen peroksit) direkt veya indirekt enzimatik reaksiyonlarla yakalar. Bu reaksiyonlarda GSH, GSSG formuna okside olur. Bu da NADPH bağımlı glutasyon redüktaz tarafından tekrar GSH'a indirgenir. GSH, çeşitli

fizyolojik metabolitler ile (örneğin; östrojen, melaninler, prostaglandinler, lökotrienler) ve ksenobiyotikler (örneğin; bromobenzen, asetoaminofen gibi) ile reaksiyona girerek merkaptüratları oluşturur. Bu reaksiyonlar glutatyon-S-transferaz tarafından başlatılır. GSH'ın NO ile konjugasyonu sonucunda S-nitroso-glutatyon oluşur. Son yapılan çalışmalarda endojen NO'nun, hücre içi glutatyonun hedefi olduğu düşünülmüştür. Ayrıca, hem NO hem de GSH'ın insülin duyarlı maddelerin hepatik aktivitesi için gerekli olması, onların lipid, glukoz, aminoasit regülasyonunda önemli olduğunu göstermektedir. GSH, formaldehit dehidrojenaz için bir substrat olarak görev yapar. Böylece formaldehit ve GSH, S-formil-glutatyona dönüşür. Formaldehitin ortadan kaldırılması, fizyolojik olarak çok önemlidir. Çünkü metionin, kolin, metanol, sarkozin ve ksenobiyotiklerin (endoplazmik retikulumdaki sitokrom p450 bağımlı monooksijenaz sistemi ile) metabolizması sonucu formaldehit üretilmektedir. GSH, prostaglandin H₂'nin prostaglandin D₂ ve E₂'ye endoperoksit izomeraz tarafından dönüştürülmesi için gereklidir. GSH, mikroorganizmalarda aktif bir yol olan metilglioksalalın D-laktata dönüştüğü gliooksalaz sistemi için de gereklidir. Ayrıca GSH, hücre fizyolojisinde önemli bir rol oynayan proteinlerin glutatyonilasyonu örneğin; tiyoredoksin, ubiquitin ile konjuge enzim, sitokrom c oksidaz için önemlidir. GSH'ın hayvanlarda önemli hayati fonksiyonları da bulunmaktadır. Yeterli GSH konsantrasyonları, intestinal epitelyal hücreler, lenfositler gibi hücrelerin proliferasyonu için gereklidir. GSH, spermatogenez ve sperm olgunlaşmasında da önemli rol oynar. Bunlara ilaveten, GSH, başarılı immün yanıtların oluşmasında sitokin üretimi, T lenfositlerin ve polimorfonükleer

lökositlerin aktivasyonunda konak savunması için gereklidir. İn vivo ve in vitro yapılan çalışmalar GSH'ın influenza virüsünün yaptığı enfeksiyonu önlediğini göstermiştir. GSH/GSSG redoks durumunun okside duruma kayması; protein kinaz B, protein fosfataz 1 ve 2A, kalsinörin, nükleer faktör kappa B, c-Jun N-terminal kinaz, apoptoz sinyal düzenleyici kinaz-1 ve mitojen ile aktive olan protein kinaz gibi pekçok sinyal yollarını aktive ederek hücre proliferasyonunu azaltmakta ve apoptozu arttırmaktadır. Bununla birlikte oksidatif stres; kanser, inflamasyon, kwashiorkor, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar, orak hücreli anemi, karaciğer hastalıkları, kistik fibrozis, AIDS, enfeksiyon, kalp krizi, inme, diyabet gibi pek çok hastalığın patogeneğinde rol oynamaktadır. GSH eksikliği oksidatif strese katkıda bulunmaktadır⁹².

Glutasyon bunların dışında,

- 1) DNA' nın deoksiribonükleotid öncüllerinin sentezinde görev alır.
- 2) Esansiyel-SH (Sülfidril) grupları içeren enzimlerin koruyucusu ve aktivatörü olarak görev yapar.
- 3) Glutasyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler için kofaktör olarak çalışır.
- 4) Hücre için toksik olan sisteini depo eder.
- 5) Hücre içi bakır taşınımı ve detoksifikasyonda görev yapar⁴³⁻⁴⁴.

Hücre içi GSH derişimi, GSH'ın hücrede kullanım-sentez hızına bağlıdır. Özellikle savunma sisteminde GSH kullanımı, hücre GSH/GSSG oranının

düşmesine sebep olmaktadır. Oksidatif stres hücrede GSSG'nin ve protein-karışık disülfid derişimlerinin artmasına neden olmaktadır.

Glutasyonun çeşitli moleküllerle konjugasyonu, hücre GSH derişiminin düşmesi nedenleri arasında yer almaktadır. GSH'ın küçük moleküllerle oluşturduğu bu konjugatlar hücreden atılır. Konjugasyon veya atılım nedeni ile olan GSH miktarındaki azalma, hepatositlerde biyosentez ile ya da eksojen GSH alınımı ile karşılanır. Hücre içi GSH'ın düşmesi erken dönemde hücrede adaptif yanıt oluşturarak GSH biyosentezini arttırmaktadır⁴⁵⁻⁴⁶⁻⁴⁷. Yüksek GSH derişimi hücre fonksiyon ve canlılığının bir göstergesi olarak kabul edilir⁴⁸. Bunun aksine GSH derişiminin düşmesi hücre içi savunma sisteminin zayıflamasının ve mitokondriyal hasarın belirteçlerinden olarak kabul edilir⁴⁹.

Parasetamol gibi toksik ajanlar ile zehirlenen sıçanlarda GSH ilk saatte azalmaktadır fakat 18. saatte artmaktadır. GSH azalması; serbest radikal aracılı oksidatif stres sürecinde lipid peroksidasyonu ile ilişkilidir. Lipid peroksidasyonu, hücre membranındaki polienoik yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan otokatalitik bir reaksiyon sürecidir. Lipid peroksidasyonunun derecesi; sadece GSH'a bağlı değildir. Ayrıca lipid/protein oranı, membranın lipid içeriği, membrandaki kolesterol miktarı ve vitamin E'nin indirgeme yeteneği gibi birçok faktöre bağlı olarak değişir³².

Normal koşullarda hücresel GSH seviyeleri iki major mekanizma ile kontrol edilir. Bunlar, GSH'ın sentez ve hücre dışına çıkma oranı ile ilgilidir. Bununla birlikte GSH seviyeleri, glutasyon-S-konjugatları/kompleksi oluşturan tiyol redoks durumundan ve GSH'ın çeşitli organellerdeki dağılımının

bozulmasından da etkilenebilir. Ayrıca beslenme, hormon/ stres seviyeleri, gebelik, egzersiz gibi fizyolojik durumlar da GSH seviyelerini değiştirir⁵⁰.

Glutasyon hücrede endoplazmik retikulum, mitokondri, çekirdek, plazma gibi pek çok organelde bulunmaktadır. GSH, vücutta bütün dokularda bulunmaktadır. GSH normalde oküler lens, kornea, aköz humor, retina gibi dokularda da yüksek miktarda bulunmaktadır ve bu dokuların hidrasyonuna ve oksidatif hasara karşı koruyucu etkiler yapmaktadır. Fakat yaşlanma ile birlikte GSH seviyeleri giderek azalmaktadır³⁶. Vücut sıvılarındaki GSH içeriği, dokulardakinden belirgin bir şekilde düşük olmasına rağmen tüm hücreler, hücre fonksiyonları ve savunması için GSH sentezler. Vücuttaki total GSH miktarı 15 g olup bunun 5 g'ı sisteindir. GSH, akciğerler de dahil vücutta bütün organlarda bulunmaktadır. Bununla birlikte karaciğer GSH konsantrasyonu, günün belli zamanlarında besinlerin içeriğine ve vücudun ihtiyacına bağlı olarak dalgalanmalar göstermesine rağmen karaciğer en yüksek GSH içeriğine sahiptir (%20 veya 4 g) ⁵¹.

İnsülin ve büyüme faktörleri, hücrelerden sistein alınımını artırarak hücre içi GSH konsantrasyonlarını artırır. Bununla birlikte, sistein desteğinin veya onun prekürsörlerinin (örneğin; N-asetilsistein, sistin gibi) oral veya intravenöz uygulama ile artırılması, GSH sentezini arttırmaktadır. Çünkü sistein, metionin katabolizmasında transsülfirasyon yolu ile başlıca hepatositlerde meydana gelmektedir. Ayrıca oksidan stres, nitrozatif stres, inflamatuvar sitokinler, kanser, kanser kemoterapisi, iyonize radyasyon, ısı şoku, gama glutamil-sistein sentazın

(GCS) inhibisyonu, GSH'ın azalması, GSH konjugasyonu, prostaglandin A₂, ağır metaller, antioksidanlar ve insülin; hücrelerdeki GCS transkripsiyonunu ve aktivitesini arttırmaktadır. Buna karşılık; proteinden fakir beslenme, deksametazon, eritropoetin, tümör büyüme faktörü-beta, hiperglisemi ve GCS fosforilasyonu GCS'nin transkripsiyonunu ve aktivasyonunu azaltmaktadır. Nükleer faktör kappa-B; inflamatuvar sitokinler ve oksidatif strese yanıt olarak GCS ekspresyonunu upregüle etmektedir. NO donörleri tarafından GCS proteinin S-nitrozasyonu (örneğin, S-nitroso-L-sistein ve S-nitroso-L-sisteinilglisin) enzim aktivitesini azaltmaktadır. Bu durumun NO ve GSH metabolizması arasında bir bağlantı olduğunu düşündürmektedir. iNOS tarafından NO üretiminin artması, sitokinle aktive olan makrofajlarda ve nöronlarda GCS inhibisyonuna ve GSH'ın azalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, NO üretimi ve iNOS'un ekspresyonunu inhibe eden glukozamin, taurin, fitoöstrojenler, polifenoller, karotenoidler ve çinko; hücrelerde GSH'ın azalmasını önleyebilir. Buna karşılık, yüksek yağlı diyet, doymuş uzun zincirli yağ asitleri, düşük dansiteli lipoproteinler, linoleik asit ve demir NO üretimini ve iNOS'un ekspresyonunu arttırmaktadır⁹².

Glutasyon, glutasyon redüktaz tarafından okside glutatyondan redükte forma dönüştürülür ve hücrelerde çoğunlukla indirgenmiş şekliyle bulunur. Glutasyon redüktaz, oksidatif stres ile indüklenir ve aktif hale gelir. Hücrelerde GSH/GSSG oranı, hücrel toksisitenin bir göstergesi olarak sık kullanılmaktadır. GSH, mitokondriyal elektron transport zincirinde üretilen ROS'u detoksifiye eder.

Mitokondriyal GSH'ın azalması, hücre ölümüne yol açan oksidanların indüklediği toksisiteye neden olmaktadır³².

Organizmadaki bu detoksifikasyon mekanizmalarına rağmen yüksek ROS seviyeleri, oksidatif stres ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Oksidatif stres koşulları altında, hücre ölümü (apoptoz/ nekroz) başlıca ROS'un ve hücrenin türüne bağlı olarak değişir³².

2.4. Karaciğerde Alanin Aminotransferaz (ALT) ve Aspartat Aminotransferaz (AST) Enzimleri

Karaciğer sentez, depo, metabolik ve detoksifikasyon gibi pek çok fonksiyonu gerçekleştirdiği için plazma glukozu, plazma lipidi, plazma proteinleri ve bazı hematolojik parametrelerin incelenmesinde de önemli bir organ haline gelmektedir⁵².

Karaciğer hastalıkları, dünyadaki en önemli sağlık problemlerinden biridir. Çünkü karaciğer, vücutta endojen ve ekzojen zararlı birçok maddenin biyotransformasyonu ve detoksifikasyonu, plazma protein sentezi ve glikojenin depolanması gibi birçok fonksiyonun gerçekleştirilmesi için hayati bir organdır. Birçok çalışma karaciğerde antioksidan sistem ile oksidatif stres sonucu oluşan hasarın önlenilebileceğini göstermektedir⁵².

Karaciğer enzimleri başlıca mikrozom, süperzom ve sitosolden kaynaklanmaktadır. Karaciğer sitosolünde major olarak üç enzim bulunmaktadır:

N-asetil transferaz, glutatyon *S*-transferaz, sulfotransferaz. Bu enzimler, yabancı maddelerin detoksifikasyonunda rol oynarlar. Ayrıca toksisite sonucu oluşan hücre hasarında da aktif hale gelirler⁵³.

Karaciğer fonksiyonlarını göstermede kullanılan başlıca plazma enzimleri ise AST ve ALT'dir⁵⁴. AST ve ALT serumda ve çeşitli dokularda bulunmakla birlikte major olarak karaciğer parenkimal hücrelerinde bulunmaktadır⁵⁵. ALT, başlıca hepatosit sitoplazmasında bulunurken AST, mitokondri ve sitoplazmada bulunmaktadır. Bu nedenle ALT, başlıca sitoplazmik membran geçirgenliğindeki artışı gösterirken; artmış AST seviyeleri hem sitoplazmik membran geçirgenliğindeki artışı hem de mitokondriyal hasarı gösterir⁵².

Artmış AST ve ALT seviyeleri, akut karaciğer hasarı, intrahepatik kolestaz, karaciğerin infiltratif hastalıklarında da görülmektedir. Büyük miktarda enzimlerin dolaşıma sızması, sentrilobüler karaciğer nekrozu ile ilişkilendirilmiştir⁵⁵.

Aspartat aminotransferaz ve Alanin aminotransferaz karaciğer hasarını saptamada rutinde sık kullanılan belirleyicilerdir. AST karaciğerde olduğu kadar kalp, kas, beyin, pankreas, böbrek, akciğer, beyaz küre ve kırmızı kürelerde de yoğun olarak bulunmaktadır. Buna karşılık ALT yoğun olarak yalnızca karaciğerde bulunur. Yaklaşık olarak hepatositte bulunan AST'nin %80'i mitokondridedir. Oysa ALT'nin predominant formu sitosolik olanıdır. Bu nedenle hafif hepatosellüler hasarda, hepatosit membranı hasara uğramış ancak mitokondriyal membranı sağlam ise sitoplazmik AST ve ALT seruma salınır⁵⁶⁻⁵⁷.

Her ne kadar bu enzimler karaciğer hücre harabiyeti için duyarlı belirteçler ise de, tek başlarına ideal marker özelliği taşımazlar (sensitivitesi yüksek ancak spesifitesi düşüktür). Alkolik olmayan karaciğer hastalıklarında AST ve ALT seviyeleri sağlıklı bireylere göre birçok kat artış gösterir. Orta şiddette ve ağır alkolik karaciğer harabiyetinde de bu enzim miktarlarında artış olur ancak bu artış nonalkolik hastalıklara nisbeten oldukça azdır. Serum aminotransferazları kronik hepatitlerde ve akut viral hepatitlerinin hafif vakalarında ve ilaca bağlı hepatitlerde orta derecede artar. Sirozda, nonalkolik hepatosteatozda kolestatik karaciğer hastalıklarında karaciğer yağlanmasında ve karaciğer tümörlerinde serum aminotransferazları hafifçe artar. Daha ciddi hepatosellüler hasarlarda mitokondri membranında da hasar olur ve mitokondriyal AST salınımı ile sonuçlanır. Böylece AST/ALT oranı yükselir⁵⁶⁻⁵⁷.

2.4.1. Hipokside AST ve ALT

Akut hipoksi şiddetli karaciğer hasarına neden olabilirken konjestif kalp yetmezliğindeki kronik devamlı hipoksi çeşitli derecelerde sentrilöbüler hücre nekrozuyla karakterizedir. Kronik aralıklı hipokside serum AST ve ALT seviyelerinin arttığı bilinmektedir. Fakat hipoksik önkoşullamanın karaciğerde AST ve ALT seviyeleri üzerindeki etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır¹⁷.

2.5. Hipoksik Önkoşullama

Önkoşullama, kısa süreli travma ile indüklenen ve ölümcül düzeyde hasara karşı güçlü koruma sağlayan bir olaydır. Yapılan birçok hayvan çalışmalarına göre, önkoşullama organizmada pek çok dokuya uygulanmaktadır. Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalık modellerinde iskemik inme, neonatal hipoksi/iskemi, travma, çeşitli maddeler ile beyinde akut hasara karşı önkoşullama yapılabildiği gösterilmiştir. Önkoşullama iskemik hipoksi, hiperbarik oksijen, hipotermi, hipertermi, nörotoksin uygulanması gibi çok çeşitli uyarılarla yapılabilmektedir¹⁸.

2.5.1. Hipoksik önkoşullamanın çeşitli dokular üzerindeki etkileri

İskemik veya hipoksik önkoşullama, hücrelerin kısa süreli olarak iskemiye veya hipoksiye maruz bırakılmasıdır. Önkoşullama ile sağlanan koruyucu etki mekanizmaları, aklimatizasyon süreçlerine göre daha hızlı devreye girmektedir. Fakat bu koruyucu etki mekanizmasının nasıl geliştiğine dair veriler yeterli değildir. Son yıllarda iskemik veya hipoksik önkoşullamanın, böbrek, akciğer, kalp ve beyin gibi çeşitli dokularda koruyucu etkisinin olduğu in vivo ve in vitro deneysel yöntemlerle gösterilmiştir⁶⁰⁻⁶¹.

Önkoşullamada uyaran tarafından sağlanan iki tip koruma görülür: Akut ve gecikmiş önkoşullama. Her ikisi de aynı sinyal yollarını paylaşmalarına rağmen yeni protein sentezine gerek duyulması yönünden farklı davranırlar. Akut önkoşullamanın koruyucu etkileri, protein sentezinden bağımsızdır. Buna posttranslasyonel protein modifikasyonları aracılık eder ve kısa sürelidir. Geç önkoşullamanın etkileri, yeni protein sentezi gerektirir ve etkileri haftalar-günler boyunca sürer⁹⁵.

Hipoksik önkoşullama tarafından indüklenen kompleks koruma mekanizmasında; adenosin-1 reseptörü, ATP duyarlı K⁺ kanalları, HIF, NMDA reseptörleri gibi pek çok molekül ve hücrel mekanizmalar rol oynamaktadır. Bu hücre içi moleküller, önkoşullamanın erken ve geç fazında aynı sinyal transdüksiyon yollarını paylaşabilirler. Bir hücre içi sinyal molekülü olan protein kinaz-C'nin hipoksik önkoşullamanın başlangıç fazında ve gelişiminde aktive olduğu bilinmektedir⁹³.

Hipoksik önkoşullamanın geç fazındaki koruyucu mekanizmaların altında yatan nedenler bilinmemektedir. Yapılan çalışmalara göre, önkoşullama ile indüklenen kardiyoprotektif etkiler, hücre dışı sinyallerin hücre içine aktarılmasında rol oynayan protein kinaz, c-jun N-terminal kinaz ve p38 MAPK gibi sinyal moleküllerinin aktivasyonundaki değişiklikler ile olmaktadır. Hipoksik önkoşullamanın sarkoplazmik retikulum şaperonu olan kalretikülini upregüle ederek miyokardı iskemik hasara karşı korumaktadır⁹⁴.

Yapılan son çalışmalara göre hipoksik önkoşullamanın kök hücrelerde proliferasyonu ve başka hücre tiplerine farklılaşmasını stimüle ettiği görülmüştür. Hipoksik önkoşullama mezenkimal kök hücrelerde koloni oluşumunu stimüle ederek vasküler endotelial büyüme faktörü sekresyonunu ve proliferasyonunu arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca osteogenezis ile ilgili genler ve alkalın fosfataz enzim aktivitesinin de yükseldiği bulunmuřtur⁶².

Yapılan başka çalışmalarda araştırmacılar, hipoksik önkoşullamanın miyokardiyal infarktüs sonrası miyokarddaki kardiyojenik progenitor hücreleri stimüle ettiğini saptadılar. Bunu apoptoz ve hücre fosforilasyonunu düzenleyen proto-onkojenik bir proteinin ekspresyonunu arttırarak yaptığını dřnmektedirler⁶³.

Tekrarlayan hipoksik önkoşullama uygulandıktan sonra aylarca inme ile indüklenen hasara karşı koruyucu anti-inflamatuar etki yapmaktadır. Uzun süreli toleransın altında yatan mekanizmalar bilinmemesine rağmen periferel B hücreleri artmaktadır⁶⁴.

2.5.2. Karaciğerde hipoksik önkoşullama ve oksidatif stres

Karaciğerde, kan akımının tek yönlü olması nedeniyle fizyolojik olarak bir oksijen gradienti yaratılır. Fizyolojik/patolojik koşullarda, karaciğerin metabolik fonksiyonları için oksijen kaynakları yeterli olmayabilir. Oksijen seviyeleri kritik düzeye düştüğünde, hücreler geri dönüşümsüz hasarlanacaktır.

Bununla birlikte, düşük fakat fizyolojik olarak uygun oksijen düzeylerinde (hipoksi) hücreler adapte olup yaşamaya devam ederler.

Hipokside hücrelerde görülen adaptif yanıtlardan biri de, oksijene duyarlı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonudur⁶⁵.

İskemik önkoşullama, hipoksiye karşı karaciğer direncini artırır. Bununla birlikte karaciğerde hipoksik önkoşullamanın koruyucu etkilerine aracılık eden hücre içi sinyal yolları bilinmemektedir⁹¹.

Yapılan çalışmalar, karaciğer önkoşullamasının hepatoprotektif etkilerinin in vivo gözlenebileceği gibi in vitro olarak da elde edilebileceğini göstermiştir. İn vivo çalışmalarda hepatosit önkoşullamasının 5 dakikadan fazla fakat 10 dakikayı geçmeyen hipoksi uygulaması ile ortaya çıktığı görülmüştür. Bununla birlikte, hipoksi sırasında artan sitosolik sodyumun ve hücre içi asidozun önkoşullama yapılan hepatositlerde önlendiği gözlenmiştir. Bu etkiler, vakuoler proton-ATPaz (V-ATPaz) ile hidrojenin dışarı atılmasının artmasına; Na^+/H^+ zıt değişiricisi ve $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ kotransporter ile Na^+ 'un hücre içine girişinin sınırlandırılmasına bağlı ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, önkoşullama uygulanan hepatositlerde P38 MAPK'nın (Mitogen- activated protein kinaz) direkt aktivasyonunun hipoksik hasara karşı koruma sağladığı görülmüştür. Ayrıca adenosin-2A reseptörü ve protein kinaz C'nin sigma ve epsilon alt birimlerinin de bu aktivasyonda rol oynadığı düşünülmüştür. Karaciğer önkoşullamasında adenosin-2A reseptörlerinin stimülasyon nedenleri bilinmemekle birlikte karaciğer hücrelerinde hem adenosin-1 hem de adenosin-2A reseptörlerinin eksprese olduğuna dair pek çok çalışma vardır. Adenosin-1 reseptörleri, heterodimerik G_i proteini ve

fosfolipaz C ile eşleşmiştir ve diaçilgliserolün salınarak protein kinaz C'nin aktivasyonuna neden olur. Adenozin-2A reseptörleri ise G_s proteinleri ile adenilat siklazı aktive ederek sinyallerin iletilmesinde rol oynarlar⁹¹.

Yadav ve arkadaşları, önkoşullamanın hepatositlerde ve endotelial hücrelerde kaspas-3 aktivasyonunun inhibe edilmesi ile apoptozun önlendiğini göstermişlerdir. Ayrıca kupfer hücreleri tarafından hepatik TNF-alfa üretiminin azalmasının da karaciğer önkoşullamasında rol oynayabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır⁹¹.

Hipoksik önkoşullama hepatositleri hipoksik hasara karşı koruyabilir fakat bu mekanizmalar henüz aydınlatılamamıştır. Hepatositlere 10 dakikalık hipoksiyi takiben 10 dakikalık reoksijenasyon ile önkoşullama uygulandığında hepatositlerin hipoksik hasara karşı dirençli olduğu görülmüştür. Yapılan başka çalışmalara göre hipoksik önkoşullama, reseptör aracılı sinyal transdüksiyon yollarını aktive ederek koruyucu etki yapmaktadır. Hipoksi G proteini ile eşleşmiş fosfolipaz C'yi aktive ederek protein kinazı aktive etmektedir⁶⁶.

Hipoksi sırasında oluşan ROS, hücre membranındaki doymamış yağ asitlerini aktive ederek, serbest radikal üretimine neden olan bir zincir reaksiyonu başlatabilir. ROS seviyelerinin azaltılması, karaciğerdeki antioksidanların artırılması ile mümkün olabilir. (SOD veya GSH)²⁷

Plazma GSH'nın yaklaşık % 90'ı karaciğerde sentezlenmektedir. Yapılan çalışmalara göre safra yolları obstrüksiyonunda karaciğerde glutatyonun oksidasyonu sonucu okside glutatyon (GSSG) konsantrasyonu belirgin olarak

artmaktadır. Bununla birlikte karaciğerde redükte glutatyon seviyeleri azalmaktadır. Karaciğer GSH'ının oksidasyonuna ve böbrek gibi diğer organların da GSH tüketimine bağlı olarak plazma GSH seviyeleri azalmaktadır²⁷.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun G.Ü.E.T-13.039 kod numarası ve 29.05.2013 tarihli onayı ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilimdalı Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.1. Kullanılan Gereçler

3.1.1. Hipoksik kamara

Sistem deney kabini ve kontrol ünitesi olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Deney düzeneği açık hava basıncı altında çalışmaktadır. Deney kabini 90 cm x 55 cm x 50 cm boyutlarındadır ve en az 5 standart sıçan kafesini alabilen bir ünedir. Kamara üzerindeki kontrol ünitesi deney kabini içerisindeki oksijen miktarını ölçmektedir. CO₂ (Karbondioksit) sensörü sayesinde, kamara içerisindeki CO₂ düzeyi %0, 2 ppm üzerine çıktığı zaman içeriye istenen orandaki taze gaz karışımının alınmasını sağlar. Gaz alımı sırasında kamara içerisinde basınç artışı olmaması için gaz giriş ünitesi ile kullanılmış gaz tahliye ünitesi eş zamanlı olarak çalışır. Kabin içerisinde herhangi bir nedenle iç basınç yükselmesini önlemek amacıyla ikinci bir güvenlik tedbiri olarak olası bir iç basınç artışında gaz çıkışını sağlayacak bir düzenek bulunmaktadır.

3.1.2. Deney hayvanları

Çalışmada, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen ortalama ağırlıkları 220-300 g arasında değişen, 24 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Bütün hayvanlar, uygun sıcaklık ($25\pm1^{\circ}\text{C}$), nem ($50 \pm \%10$), 12 saat aydınlık/karanlık koşullarında paslanmaz çelik kafeslerde yaşatıldı. Deney prosedürü süresince, ilk bir hafta hayvanların aklimatizasyonu için uygun gıda ve su koşulları sağlandı. Aklimatizasyondan sonraki hafta, hayvanlar her grupta 6 hayvan olacak şekilde 4 gruba bölündü.

3.1.3. Kimyasallar

%10'luk TCA (Triklorasetik asit)

%1'lik BHT (Butilated hidroksitoluen)

TBA (Tiobarbitürik asit)

DTNB (Dithiobis 2-Nitrobenzoik asit)

Na_2HPO_4 (Disodyum hidrojen fosfat)

PBS (pH=7.4) (Phosphate Buffer Saline)

%97'lik Etil alkol

0.3N NaOH (Sodyum Hidroksit)

%10 'luk ZnSO_4 (Çinko Sülfat)

VaCl_3 (Vanadiyum Klorür)

NEDD (N etilen diamid)

SA (Sülfanilamid)

3.1.3.1. Histolojik ölçümler için kimyasallar

Harris Hematoksilen Solüsyonu

Hematoksilen 1g

Alkol 10 ml

Potasyum alum (Alüminyum Potasyum Sülfat) 20 g

Distile su 200 ml

Civa oksit 0,5 g

Glasiyal asetik asit 8ml

Eozin Solüsyonu

Eozin 1g

Distile su 100ml

1 küçük timol kristali

3. 2. Hipoksi Uygulamaları

1. Grup: Kontrol (K)

2. Grup: Önkoşullama (ÖK)

3. Grup: Ağır Hipoksi (AH)

4. Grup: Önkoşullama+ Ağır Hipoksi (ÖK+AH)

1. Kontrol Grubu: Bu gruptaki hayvanlar 3 gün süre ile normal atmosfer koşullarında yaşatıldıktan sonra 4. günde feda edildiler.

2. ÖK Grubu: Sıçanlar 3 gün süre ile günde 2 saat %10 O₂ (Oksijen) verilen hipoksik kamaraya yerleştirildikten sonra 4.günde feda edildiler.

3. AH Grubu: Sıçanlar 3 gün süre ile normal atmosfer koşullarında yaşatılıp, 4. günde 3 saat süre ile %7 O₂ verilen (ağır hipoksi) hipoksik kamaraya yerleştirildi. Bu sürenin sonunda feda edildiler.

4. ÖK+AH Grubu: Sıçanlar 3 gün süre ile günde 2 saat %10 O₂ verilen hipoksik kamaraya yerleştirildikten sonra, 4. günde 3 saat süre ile %7 O₂ verilen kamara ortamında ağır hipoksiye maruz bırakıldılar, bu sürenin sonunda feda edildiler.

Sıçanlar Alfazin (10mg/kg) ve Ketamin (90mg/kg) kokteyli ile anestezileri yapıldıktan sonra kalplerinden kan alınarak feda edildiler. Ardından karaciğerleri hızla çıkarılarak bir kısmı sıvı azotta dondurulup, çalışılncaya kadar -80°C’de saklandı. Diğer kısmı histolojik takibe alındı. Karaciğer dokularında, glutatyon, nitrik oksit metabolizmasının yan ürünü olan nitrat ve lipid

peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit gibi oksidatif stres ve antioksidan savunma mekanizmaları ile ilişkili parametreler incelendi.

3.3. Biyokimyasal Parametreler

3.3.1. Serum AST-ALT tayini

Karaciğer hasarını göstermek için kalpten alınan kan örneklerinde aynı gün içerisinde hücre içi enzimler olan AST ve ALT düzeyleri Medica Easy RA otomatik klinik biyokimya analizöründe ölçüldü.

3.4. Karaciğerde MDA ve GSH Tayini

Her grup için doku örneklerinden 0,2 g tartıldı. %10'luk TCA ile 9 kat sulandırılıp homojenizasyonları yapıldı. 3000g ve 20°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alınarak 3000 g ve 20°C'de 8 dakika daha santrifüj edildi. Bundan sonraki aşamalar MDA ve GSH için ayrı olarak devam etti.

3.4.1. Malondialdehit tayini

Lipid peroksidasyon belirteci olarak doku MDA derişimi Casini ve arkadaşları⁹⁶ tarafından tanımlanan yöntemle göre analiz edildi. Yöntem, MDA'nın tiyobarbitürik asit ile yaptığı kompleksin kalorimetrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır. Bu yöntemle göre 750 µl örnek üzerine 10 µl %1'lik BHT konuldu. Üzerine 750 µl TBA eklenip 20 sn karıştırıldıktan sonra tüpler 120°C'de 15 dakika su banyosunda kaynatıldı. Soğutulup 3000g ve 20°C'de 8 dakika santrifüj edildi. Spektrofotometrede 535nm'de okutuldu. Hesaplanan sonuçlar nmol MDA/gram doku olarak ifade edildi.

Sonuç: (Absorbansx 128)/doku ağırlığı= MDA nmol/gr doku

3.4.2. Redükte glutatyon tayini

Doku homojenatlarında GSH düzeyleri Aykac ve arkadaşları⁹⁷ tarafından tanımlanan sülfidril grup analizi prensibine göre tayin edildi. 250 µl örnek üzerine 1000µl 0,3M Na₂HPO₄ konuldu. 125µl DTNB eklenip karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilip, spektrofotometrede 412 nm’de okutuldu. Sonuçlar µmol/g GSH olarak ifade edildi.

Sonuç: (4,23xabsorbans)/doku ağırlığı= µmol/g doku

3.4.3. Karaciğerde nitrik oksit (Nitrat) tayini

Nitrat tayini Miranda ve arkadaşları⁹⁸ tarafından tanımlanan Griess yöntemine göre yapıldı. 0,2 g doku tartıldı. 5 katı hacimde PBS ile sulandırılıp homojenize edildi. 2000 g ve 4 °C’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra 500 µl süpernatant alındı. Üzerine 250 µl 0,3N NaOH konarak oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. 250µl %10’luk ZnSO₄ konuldu. 3000 g ve 4 °C’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra 500 µl supernatant alınarak 3000 g ve 4 °C’de tekrar 5 dakika santrifüj edildi. Her örnek için 200 µl supernatant, 200 µl VaCl₂ , 100 µl SA, 100 µl NEDD karışımı 37 °C’de yarım saat bekletildi. Spektrofotometrede 540 nm’de okutuldu. Sonuçlar nmol/g olarak ifade edildi.

3.5. Histolojik İnceleme

Karaciğer dokusuna ait örnekler ışık mikroskobunda inceleme için % 10' luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Tespit işleminden sonra doku örnekleri kasetlere konularak akar su altında 24 saat yıkandı. Suyun uzaklaştırılması için dokular artan derecelerde alkol serilerinden (%70, %80, %90, %100) geçirildi. Sonra parlatılmaları amacıyla ksilolden alındı ve ardından erimiş parafine gömüldüler. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 4-5 mikron kalınlığındaki kesitlere tüm gruplar için Hematoksilen- Eozin boyası uygulandı. Kesitler Leica DCM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programında değerlendirildi ve resimlendirildi.

Hematoksilen – Eozin Boyama Yöntemi

Deney gruplarından alınan kesitler 60°C etüvde 30 dakika bekletildikten sonra, 2x15 dakika ksilole alınarak parafinden arındırılmaları sağlandı. Daha sonra lamalar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (%100, %96, %80, %70, %50) havada kurutuldu. 10 dakika akar suda yıkandıktan sonra, Harris Hematoksilen'de 10-15 dakika boyandı ve 10 dakika akar suda yıkandı. % 70 alkol + 2 – 3 damla glasiyel asetik asit karışımına batırılıp tekrar 10 dakika akar suda yıkandı. Lamlar 5-10 dakika Eozin de bekletilip 10 dakika daha akar suda yıkandıktan sonra artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (%50, %70, %80, %96, %100), 2x15 dakika ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.

3.6. İstatistik Analizler

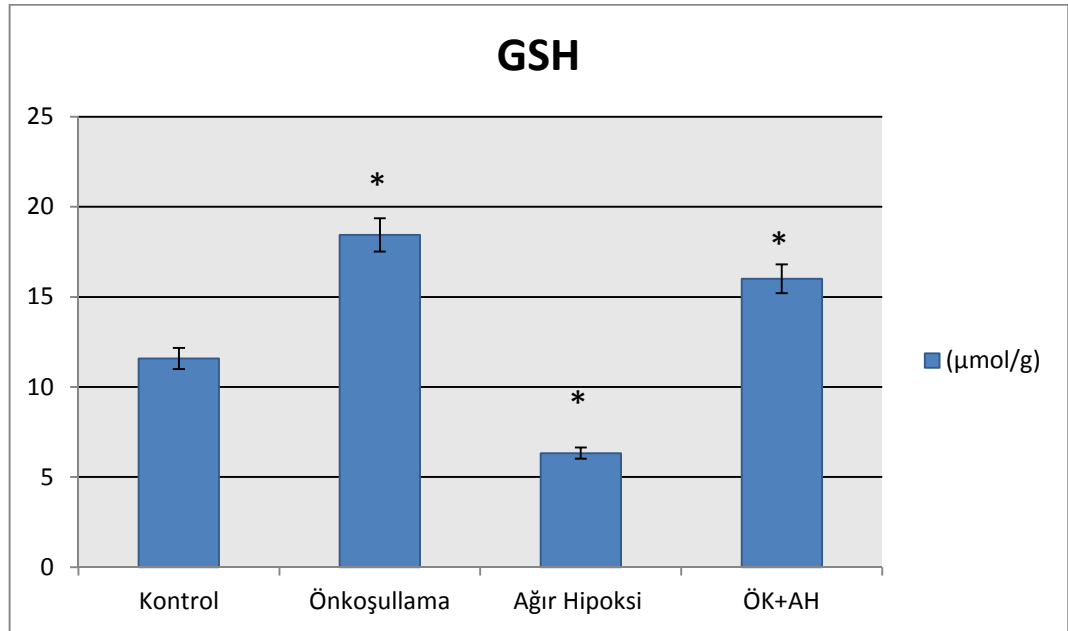
Ölçümlerden elde edilen veriler sıra ortalaması $\pm$ SH (Standart hata) olarak verildi. Gruplar Kruskal-Wallis H Testi ile analiz edilerek kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Gruplar arasında farklılık oluşturanları belirlemek için yapılan Bonferroni düzeltmeleri Mann-Whitney U Testi sonuçlarına göre analiz edilerek karşılaştırıldı. Bütün uygulanan testlerde güven aralığı %95 olup, $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bütün testler, bilgisayar ortamında SPSS programının 15,0 versiyonu ile yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Karaciğer Glutasyon Değerleri

Gruplar arasında GSH değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$). Yapılan Mann-Whitney U testi sonuçlarına göre önkoşullama grubu ile ağır hipoksi grubu arasında ve ağır hipoksi grubu ile önkoşullama+ağır hipoksi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ağır hipoksi grubunda GSH değerleri en düşük (%45,33 azalma) iken önkoşullama grubundakilerin değerleri en yüksektir (%59,24 artma). Önkoşullama+ağır hipoksi grubunda ise GSH değerleri % 38,16 artma göstermektedir (Grafik 1) . Karaciğer dokusunda GSH için sıra ortalama değerleri ve standart hata değerleri Tablo 1’de gösterilmiştir.



Grafik 1. Karaciğer dokusunda GSH düzeylerinin sıra ortalama ve standart sapma değerleri.

* $p<0,05$

Tablo 1. Karaciğer dokusunda GSH düzeyi için sıra ortalama değerleri ve standart hata değerleri.

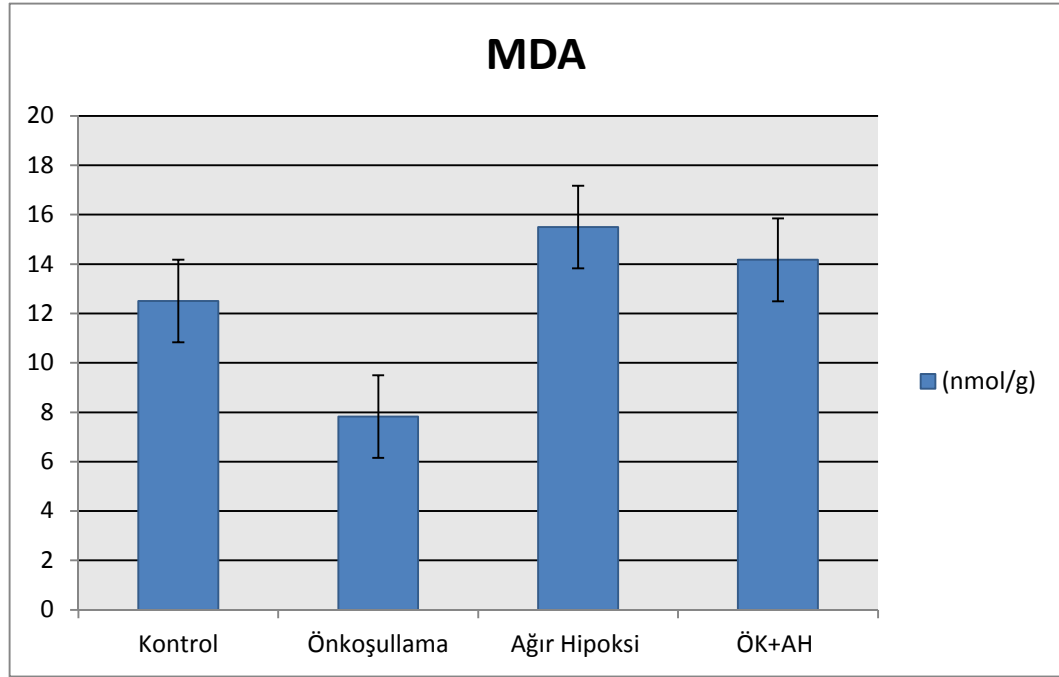
	GRUPLAR	Sıra Ort $\pm$ SH	p
GSH (μ mol/g)	Kontrol	11,58 $\pm$ 7,40	0,022
	Önkoşullama	18,44 $\pm$ 12,38*	
	Ağır Hipoksi	6,33 $\pm$ 10,71*	
	Önkoşullama+Ağır Hipoksi	16,00 $\pm$ 6,94*	

*p< 0,05

4.2. Malondialdehit

Gruplar arasında MDA değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır (p>0,05). Fakat MDA değerleri, kontrol grubuna göre önkoşullama grubunda % 37,36 azalma; ağır hipoksi grubunda ise % 24 artma gösterdi. Önkoşullama+ağır hipoksi grubunda ise % 13,36'lık artma gözlemlendi.

(Grafik 2). Karaciğer dokusunda MDA için sıra ortalama değerleri ve standart hata değerleri Tablo 2’de gösterilmiştir.



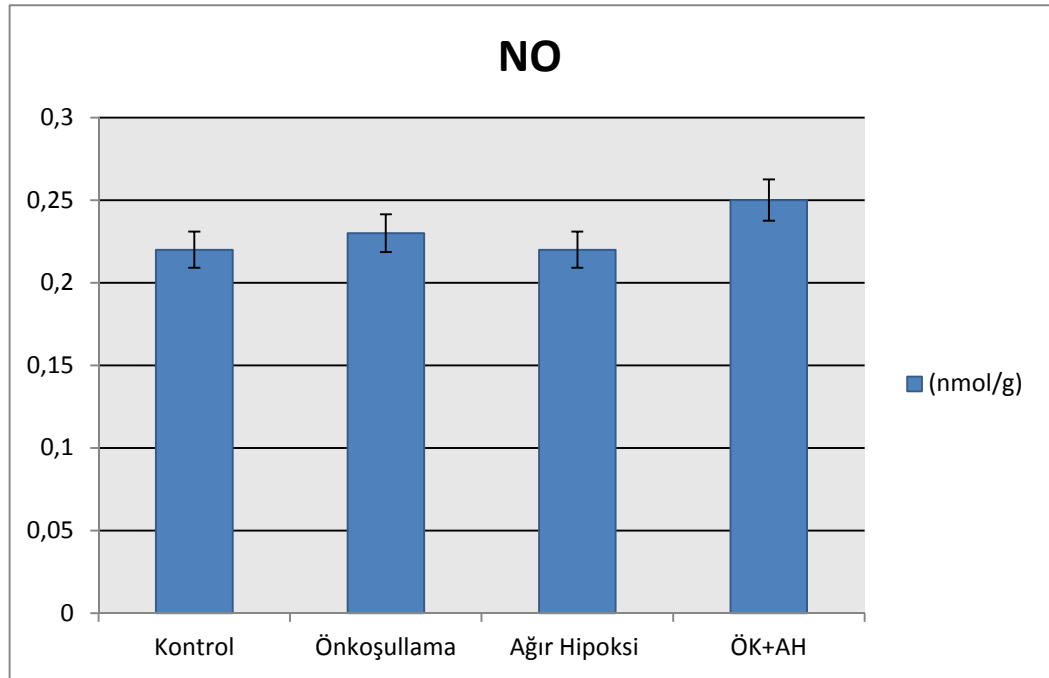
Grafik 2. Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri için sıra ortalama değerleri ve standart sapma değerleri ($p>0,05$).

Tablo 2. Karaciğer dokusunda MDA düzeyi için sıra ortalama değerler ve standart hata değerleri.

	GRUPLAR	Sıra Ort±SH
MDA (nmol/g)	Kontrol	12,50± 0,11
	Önkoşullama	7,83± 0,08
	Ağır Hipoksi	15,50± 0,04
	Önkoşullama+Ağır Hipoksi	14,17± 0,08

4.3. Nitrik Oksit

Gruplar arasında NO değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). Fakat NO değerleri, kontrol grubuna göre, önkoşullama grubunda % 4,5 artış; önkoşullama+ ağır hipoksi gruplarında % 13,6 artış gösterdi. Ağır hipoksi grubunda herhangi bir değişiklik olmadı (Grafik 3). Karaciğer dokusunda NO için ortalama değerler ve standart hata değerleri Tablo 3'te gösterilmiştir.



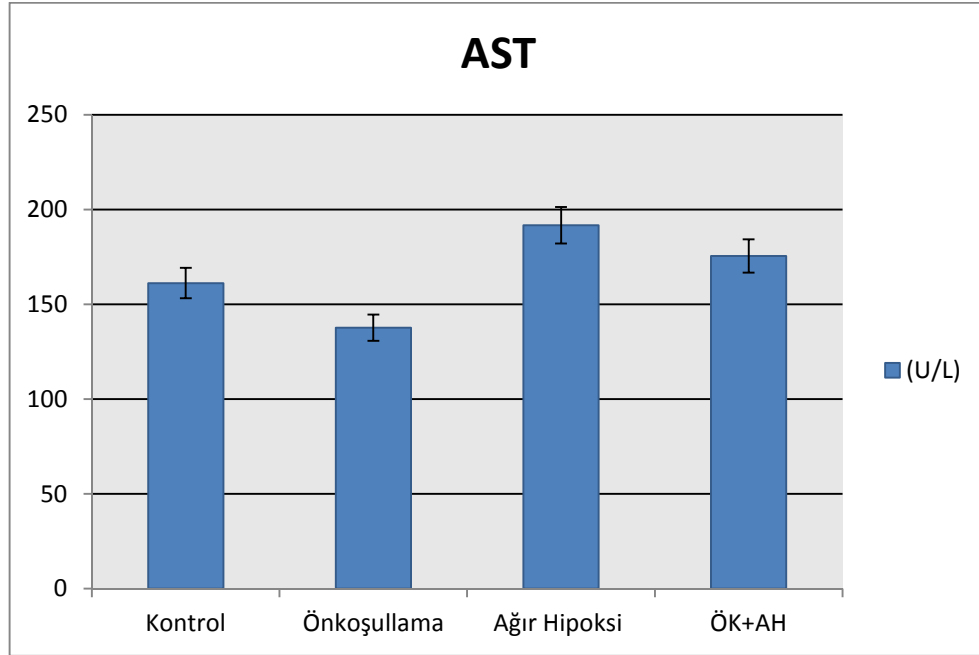
Grafik 3. Karaciğer dokusunda NO düzeylerinin ortalama değerler ve standart sapma değerleri. ($p>0,05$)

Tablo 3. Karaciğer dokusunda NO düzeyi için ortalama değerler ve standart hata değerleri.

NO (nmol/g)	GRUPLAR	Ortalama±SH
	Kontrol	0,22± 0,02
	Önkoşullama	0,23± 0,01
	Ağır Hipoksi	0,22± 0,00
	Önkoşullama+Ağır Hipoksi	0,25± 0,04

4. 4. AST ve ALT Ölçümleri

Çalışmada AST ve ALT seviyeleri ölçülen tüm gruplarda herhangi bir anlamlı değişiklik gözlemlenmemekle beraber AST değerleri, önkoşullama grubunda azalırken (%14,6 azalma), en fazla artma ağır hipoksi grubunda görüldü (%18,9artma). Önkoşullama+ ağır hipoksi gruplarında da artış gözlemlendi (%8,9 artma) (Grafik 4). Karaciğer dokusunda AST için ortalama değerler ve standart hata değerleri sırayla Tablo 4’te gösterilmiştir.



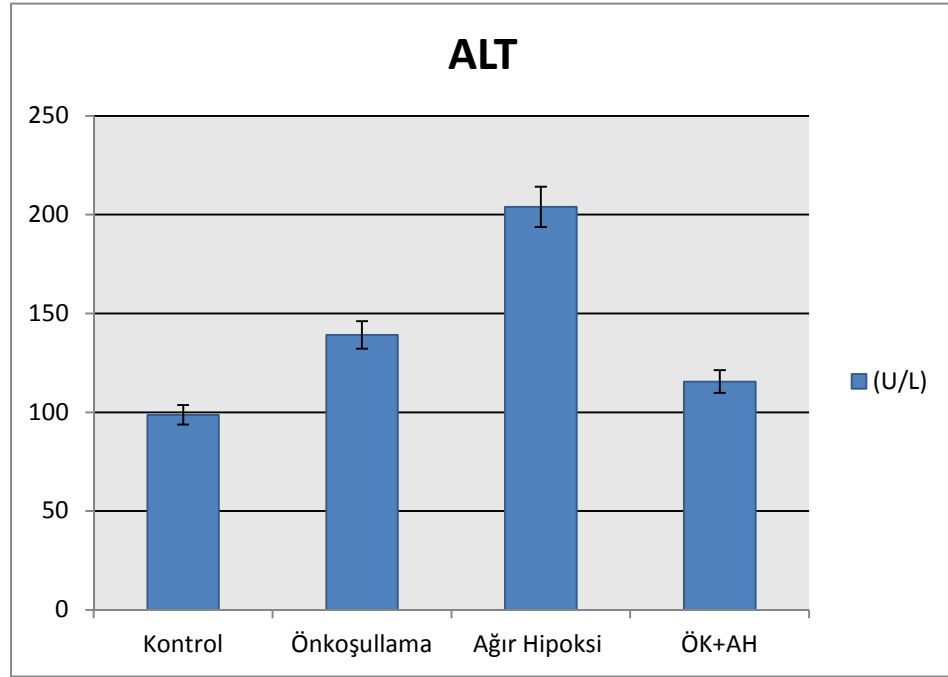
Grafik 4. Serumda AST düzeyleri ortalama değerler ve standart sapma değerleri. ($p > 0,05$)

Tablo 4. Serumda AST düzeyi için ortalama değerler ve standart hata değerleri.

	GRUPLAR	Ortalama $\pm$ SH
AST(U/L)	Kontrol	161,17 $\pm$ 37,37
	Önkoşullama	137,63 $\pm$ 18,60
	Ağır Hipoksi	191,67 $\pm$ 79,71
	Önkoşullama+Ağır Hipoksi	175,50 $\pm$ 55,06

ALT değerleri, en yüksek oranda azalmayı önkoşullama grubunda (%41,0 azalma) gösterirken en fazla oranda artma ağır hipoksi grubunda gözlemlendi (%106,7). Önkoşullama+ ağır hipoksi gruplarında da artış gözlemlendi (%17,1 artma)

(Grafik 5). Karaciğer dokusunda ALT için ortalama değerler ve standart hata değerleri Tablo 5’te gösterilmiştir.



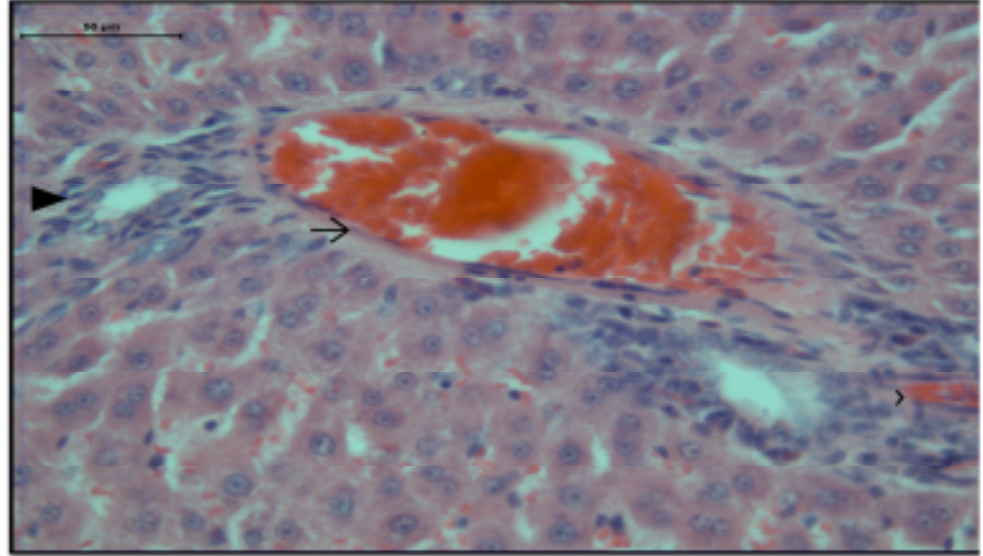
Grafik 5. Serumda ALT düzeyi için ortalama değerler ve standart sapma değerleri. ($p > 0,05$)

Tablo 5. Serumda ALT düzeyi için ortalama değerler ve standart hata değerleri.

	GRUPLAR	Ortalama±SH
ALT (U/L)	Kontrol	98,67± 33,10
	Önkoşullama	139,13±39,12
	Ağır Hipoksi	204,00±60,90
	Önkoşullama+Ağır Hipoksi	115,50±30,15

4.5. Histolojik Değerlendirme

Kontrol grubu dokularına ait küçük büyültmeli incelemelerde, klasik karaciğer lobülü ve portal triad normal yapıları ile izlendi. Yapılan büyük büyültmeli incelemelerde, portal triad' a ait yapılardan vena porta, arteria hepatica ve safra kanalı belirgin olarak ayırt edildi (Resim 1). Vena centralis normal yapıdaki endotel hücreleri ile izlenirken, hepatositler poligonal şekilleri, merkezde yerleşik ökromatik çekirdekleri ve belirgin çekirdekçikleri ile genel yapıya uygundu. Hepatosit kordonları arasında yer alan sinüzoidler, normal yapıları ile izlendi (Resim 2).



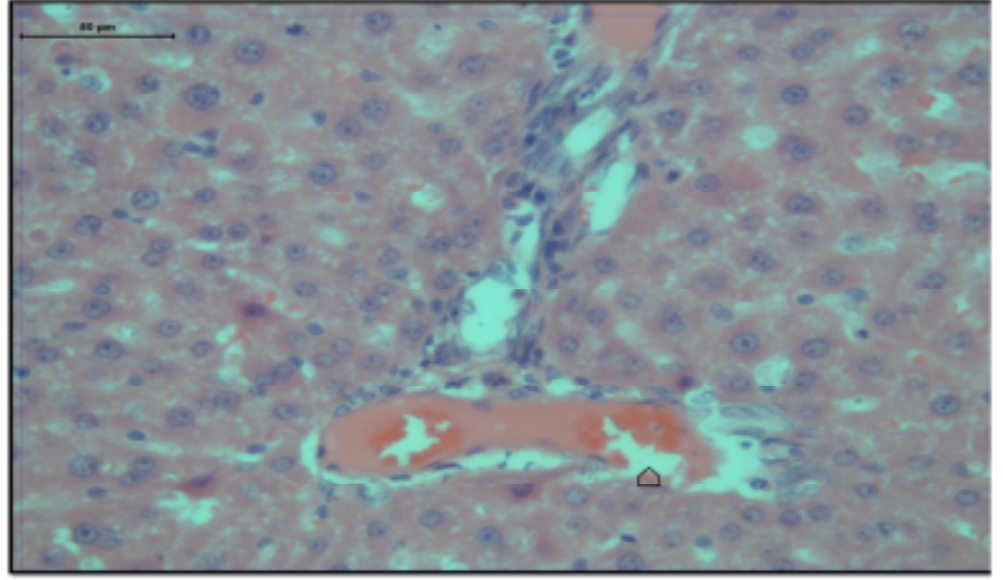
Resim 1. Kontrol grubuna ait incelemede vena porta (→), arteria hepatica (◄) ve safra kanalı (►) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).



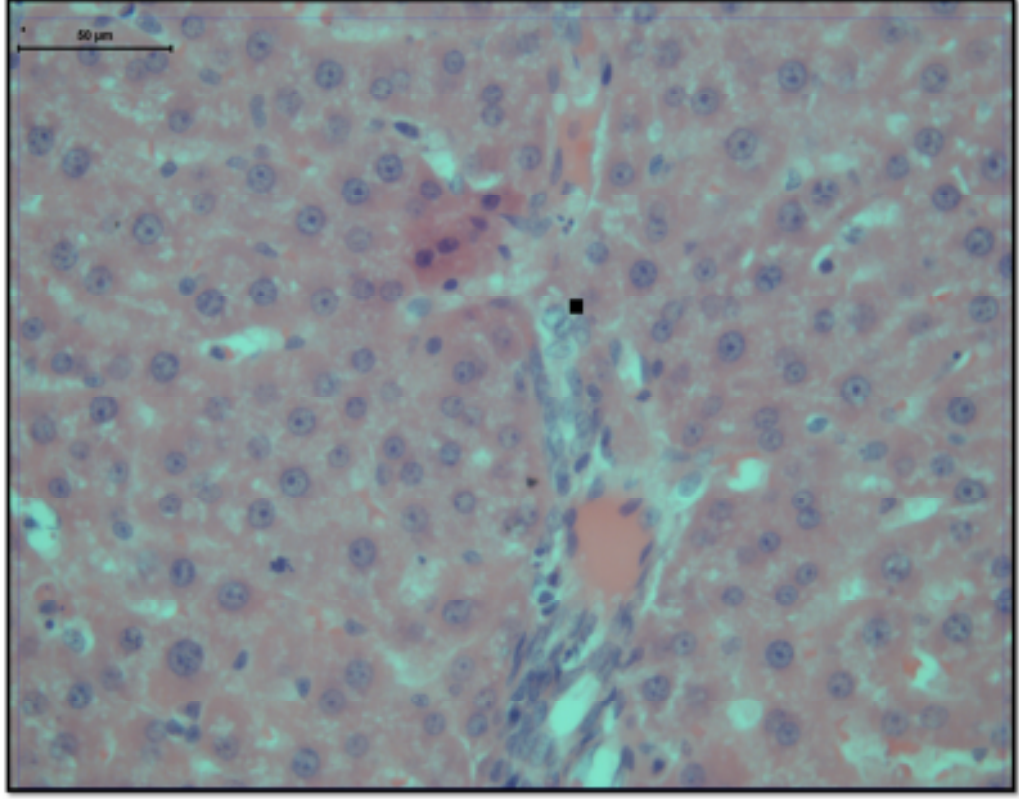
Resim 2. Kontrol grubuna ait incelemede normal yapıdaki endotel hücreleri ile vena centralis (v), hepatosit (h) ve sinüzoid (♦) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).

Ağır hipoksi uygulanan grupta küçük büyültmeli incelemelerde, portal triad ve klasik karaciğer lobülü değerlendirildiğinde, en belirgin morfolojik değişikliğin özellikle vena centralis'e yakın bölgede bulunan sinüzoidlerdeki dilatasyon olduğu tespit edildi. Doku genelinde portal triad yapısının bozulduğu ve bu alanda bulunması gereken vena porta, arteria hepatica ve safra kanalı yapılarının çoğunun ayırt edilemediği belirlendi. Yapılan büyük büyültmeli incelemelerde, portal alanda özellikle damar yapısında duvar bütünlüğünün bozulduğu dikkati çekti (Resim 3). Safra kanal epitelinin göreceli olarak hipertrofik bir görünüm kazandığı izlendi. Bu hücrelere ait çekideklerde yer yer kromatin kaybı gözlemlendi (Resim 4). Özellikle vena centralis çevresindeki sinüzoidlerde belirgin dilatasyon saptandı. Vena centralis lümeninde hyalünöz madde birikimi gözlemlendi. Hepatositlerin geneli, ökromatik çekirdek ve çekirdekçikleri ile normal yapıdaydı. Ancak diğer gruptan ayrıcalı olarak, bu

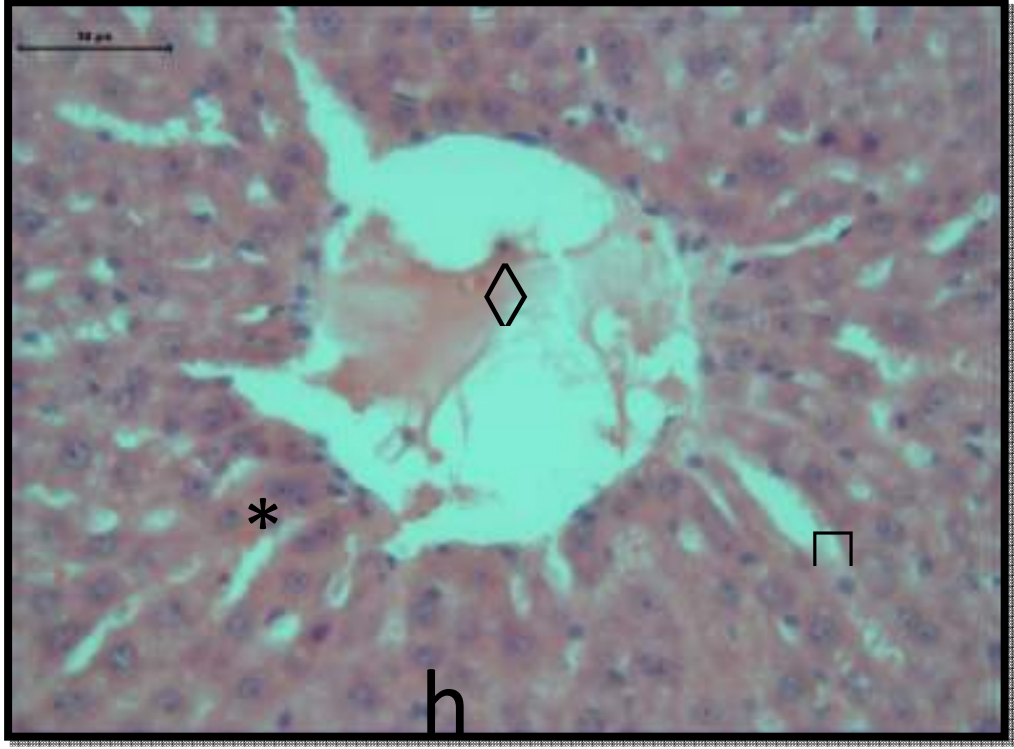
grupta çok sayıda çift çekirdekli hepatosit varlığı dikkat çekti (Resim 5). Bazı alanlarda hepatositlerin hücre sınırlarının yer yer seçilemediği ve birbirleri ile birleşir tarzda bir yapı sergilediği tespit edildi. Bazı alanlarda perivasküler ödem görüldü (Resim 6).



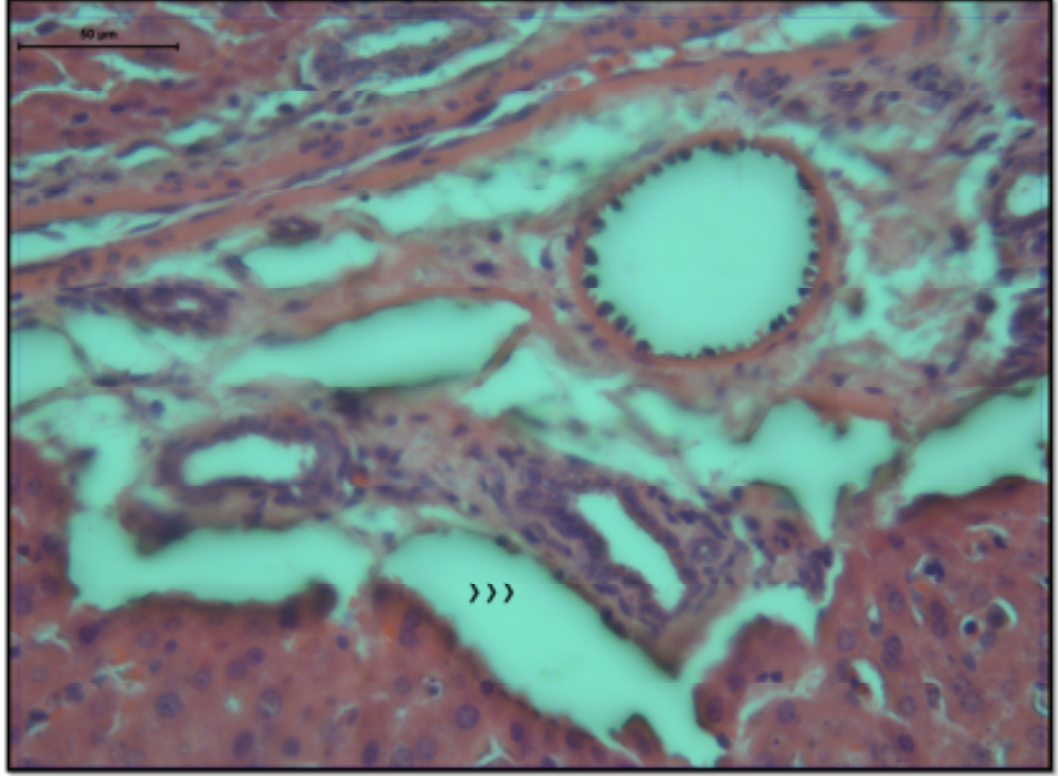
Resim 3. Ağır hipoksi uygulanan gruba ait incelemede portal triada ait duvar bütünlüğü bozulmuş damar yapısı (△) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).



Resim 4. Ağır hipoksi uygulanan gruba ait incelemede safra kanalı epitelinde kromatin kaybı (■) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).

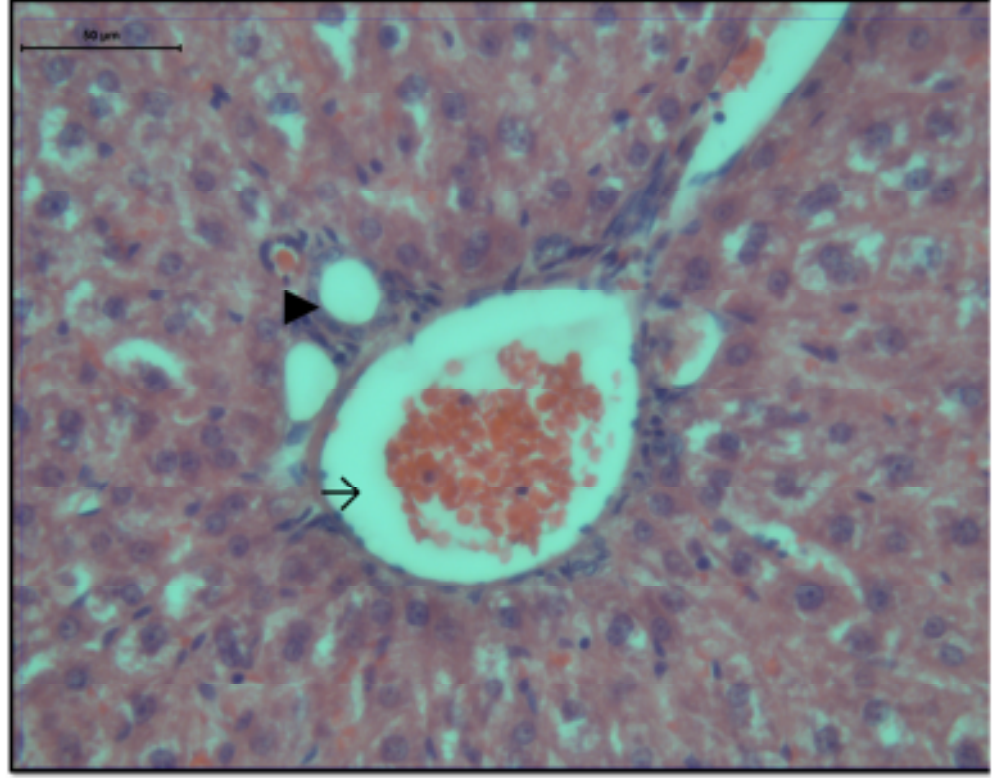


Resim 5. Ağır hipoksi uygulanan gruba ait incelemede normal yapısı ile hepatositler (h), sinüzoidlerde dilatasyon (□), vena centralis lümeninde hiyalinizasyon (◊) ve çok çekirdekli yapısı ile hepatosit (*) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).

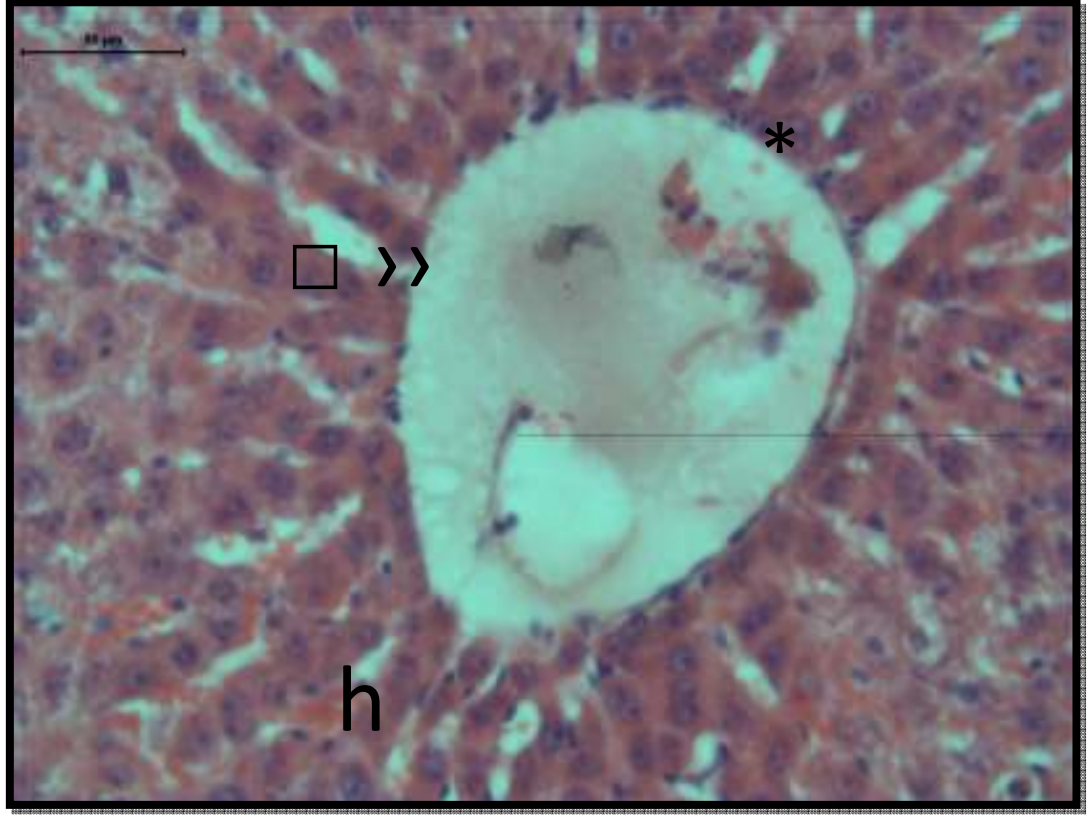


Resim 6. Ağır hipoksi uygulanan gruba ait incelemede perivasküler ödem (>>>) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).

Önkoşullama uygulanan gruba ait yapılan küçük büyültmeli incelemelerde, portal triad ve klasik karaciğer lobülü izlendi. Yapılan büyük büyültmeli incelemelerde portal triad’ da vena porta, safra kanalı ve arteria hepatica’ nın dalı normal yapıları ile izlenirken; yakın alandaki sinüzoidlerde ağır hipoksi uygulanan gruba karşın göreceli olarak daha az dilatasyon saptandı (Resim 7). Sinüzoid dilatasyonu olan bölgelerdeki hepatosit kordonlarında hepatositlerin yer yer küçüldüğü ve hücre sınırlarının kaybolduğu, perifer alanda ise poligonal şekilleri ile belirgin oldukları tespit edildi. Yine vena centralis’ e yakın alanda çok çekirdekli hepatositler ilgiyi çekti (Resim 8).

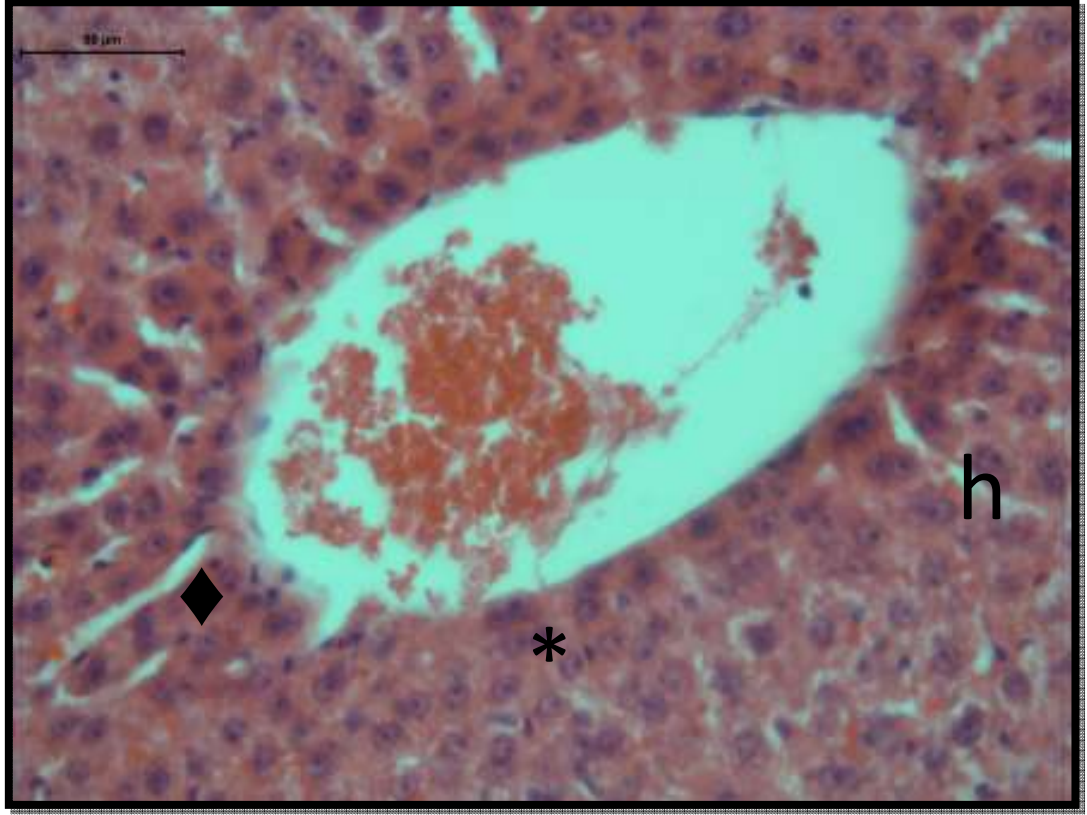


Resim 7. Önkoşullama uygulanan gruba ait incelemede portal triad' a ait vena porta (→) ve safra kanalı (►) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).

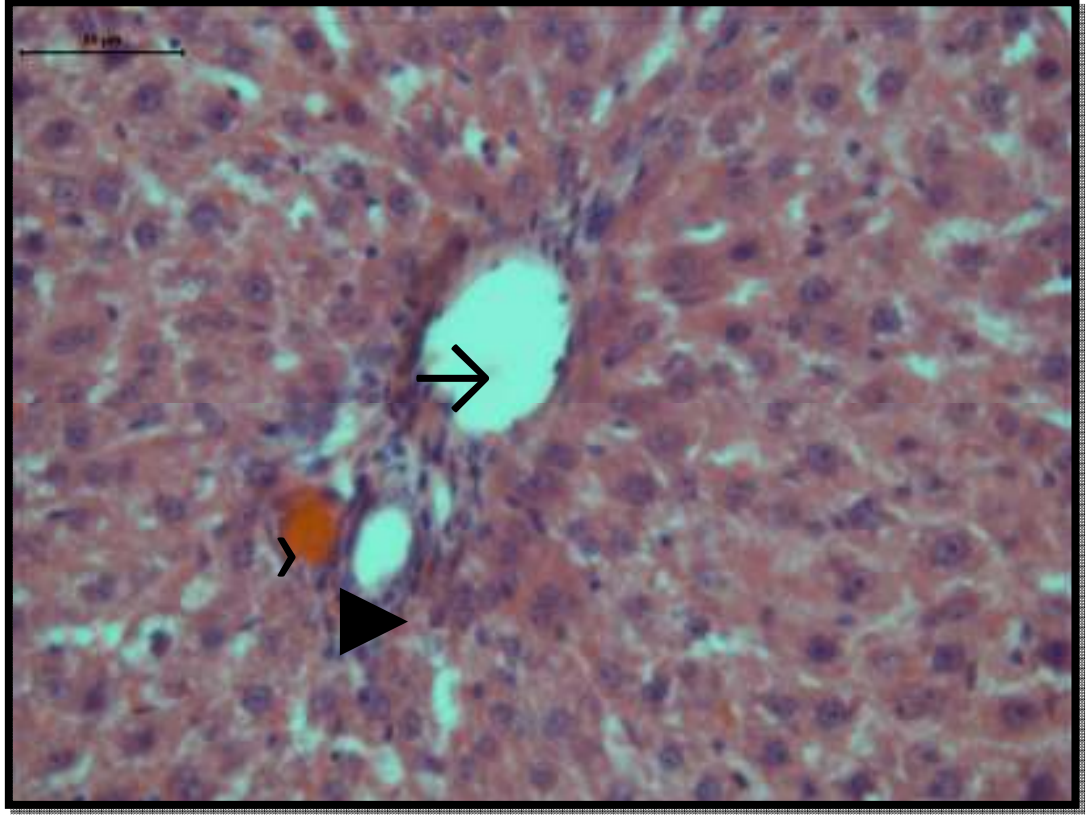


Resim 8. Önkoşullama uygulanan gruba ait incelemede normal yapısı ile hepatositler (h), sinüzoidlerde dilatasyon (□) ve bu bölgede küçülmüş hepatositler (≫), çok çekirdekli yapısı ile hepatosit (*) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).

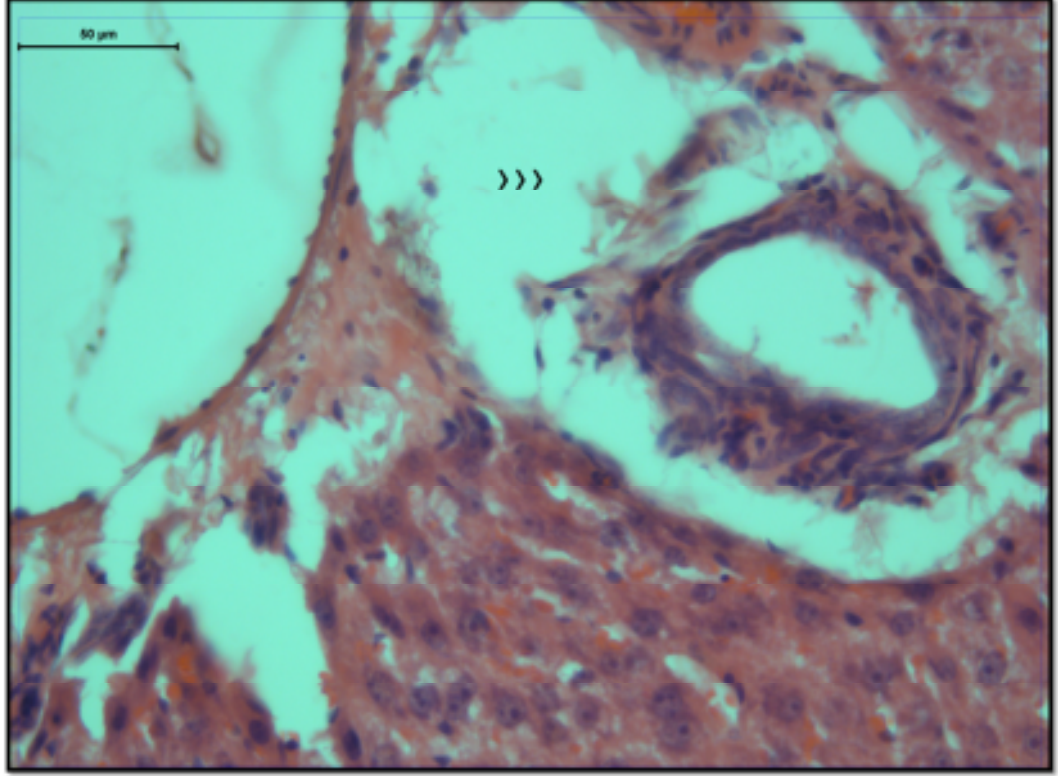
Önkoşullama ve ağır hipoksinin birlikte uygulandığı gruba ait yapılan küçük büyültmeli incelemelerde, portal triad ve klasik karaciğer lobülü normal yapıları ile izlendi. Yapılan büyük büyültmeli incelemelerde vena centralis' in ve çevresindeki sinüzoid ve hepatositlerin normal yapıda olduğu görüldü. Hepatositler poligonal şekilleri ve belirgin çekirdek ve çekirdekçikleri ile izlendi. Diğer deney grupları ile benzer olarak, vena centralis' e yakın hepatositlerin bir kısmında çok çekirdekli yapı dikkati çekti (Resim 9). Portal triad' a ait yapılar, çoğu alanda normal görünümündeydi (Resim 10). Ancak yer yer yaygın perivasküler ödem dikkati çekti (Resim 11).



Resim 9- Önkøşullama ve ağır hipoksinin birlikte uygulandığı gruba ait incelemede normal yapısı ile hepatositler (h), sinüzoid (♦) ve çok çekirdekli yapısı ile hepatosit (h) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).



Resim 10- Önkoşullama ve ağır hipoksinin birlikte uygulandığı gruba ait incelemede vena porta (→), arteria hepatica (◄) ve safra kanalı (►) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).



Resim 11- Önkoşullama ve ağır hipoksinin birlikte uygulandığı gruba ait incelemede yer yer perivasküler ödem (»») izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).

Sonuç olarak; yapılan ağır hipoksi uygulamasının karaciğer dokusu üzerinde vena centralis' e yakın sinüzoidlerde dilatasyona neden olduğu, portal triad yapısının bozulduğu, hepatositlerin çok çekirdekli hal aldığı ve perivasküler ödemin olaylanmasına neden olduğu gözlemlendi. Önkoşullama uygulaması sonrası yapılan incelemelerde sinüzoidlerde dilatasyonun varlığı yine tespit edilmekle birlikte, bu oranın göreceli olarak ağır hipoksi uygulamasından daha az olduğu saptandı. Yine bu grupta çok çekirdekli hepatositlerin varlığı dikkati çekerken, diğer histolojik yapıların kontrol grubu ile eşdeğer olduğu izlendi. Önkoşullama ve ağır hipoksi uygulamasının bir arada yapılması sonucunda portal triad ve vena centralis çevresi sinüzoid yapılarının normale döndüğü, önkoşullamanın bu

anlamda iyileştirici etki gösterdiği ancak yine de perivasküler ödem ve çok çekirdekli hepatositlerin varlığının izlenmeye devam ettiği dikkati çekti.

5.TARTIŞMA

Çalışmamızda Wistar Albino cinsi erkek sıçanları hipoksik önkoşullamaya ve ağır hipoksiye maruz bırakarak karaciğerde oksidan ve antioksidan sistemlerde oluşacak değişiklikleri görmeyi hedefledik. Hipoksik önkoşullamanın ve ağır hipoksinin antioksidan/oksidan sistemler üzerinde farklı etkiler ortaya çıkardığını göstermek için tüm gruplarda GSH, NO, MDA seviyelerine baktık. Ayrıca farklı hipoksik koşullarda karaciğer fonksiyonlarını test etmek için serum AST ve ALT seviyeleri ölçüldü. Hipoksinin karaciğer üzerine etkilerinin hücresel düzeyde değerlendirilmesi için, histolojik kesitler hematoxilen-eozin ile boyama yapıp, ışık mikroskobunda resimlendirildi.

İskemik/ hipoksik koşullar, birçok dokuda akut veya kronik olarak görülebilir. Kalp, iskelet kası, beyin, karaciğer gibi dokuların bu koşullara verdiği yanıtlar, hücrelerde birçok farklı süreçlerin başlamasına neden olur².

Önkoşullama kısa süreli travma ile indüklenen ve ölümcül düzeyde hasara karşı güçlü koruma sağlayan bir olaydır. Yapılan birçok hayvan çalışmasına göre, önkoşullama organizmada pek çok dokuya uygulanmaktadır. Önkoşullama iskemik hipoksi, hiperbarik oksijen, hipotermi, hipertermi, nörotoksin uygulanması gibi çok çeşitli uyaranlarla yapılabilir¹⁰.

Karaciğerde iskemi/hipoksiye neden olan olayların başında; karaciğer rezeksiyonu, travmaya bağlı karaciğer hasarı, hemorajik şok gelmektedir. Kan akımının kesilmesini takiben ortaya çıkan organ disfonksiyonun nedeni; reperfüzyon sonrası meydana gelen hücre hasarı ve organ hassasiyetinin artmasıdır⁷⁵⁻⁷⁶. Hasara neden olan faktörler; Serbest oksijen radikalleri, sinüzoidal endotelial hücre hasarı, mikrosirkülasyondaki düzensizlikler olarak özetlenebilir.

Literatürde hipoksik önkoşullamanın ve ağır hipoksinin karaciğerde glutatyon, nitrik oksit ve lipid peroksidasyonu üzerindeki etkilerinin ayrı ayrı değerlendirildiği çeşitli çalışmalar bulunmakla birlikte önkoşullamanın ardından ağır hipoksinin uygulandığı ve NO, MDA, GSH ve karaciğer enzimlerinin, ayrıca hücresel düzeydeki değişikliklerin bir arada değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Reaktif oksijen türleri, normal hücresel olaylara yanıt olarak üretilir. Düşük ROS konsantrasyonları, hücresel olaylar için gerekli iken, yüksek ROS konsantrasyonları zararlı etkilere neden olmaktadır. Hücrede DNA, proteinler ve lipidlerde oluşan hasara bağlı büyük miktarda ROS oluşur. ROS'un artması veya ROS yakalama kapasitesinin azalması oksidatif stresi gösterir³⁴.

Fizyolojik koşullarda organizmadaki ROS miktarı; yani süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil gibi ROS oluşturan radikaller ile ROS'u yakalayan superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimler ve GSH gibi enzimatik

olmayan antioksidan sistemler arasındaki düzenleyici denge ile stabil düzeylerde tutulmaktadır. Hipoksi/iskemi gibi patolojik durumlarda ROS oluşumu artmaktadır. ROS birikimi lipid peroksidasyonunun ve oksidatif stresin belirteçlerinden olan MDA'nın aşırı üretimine neden olmaktadır.³²

Yüksek GSH derişimi hücre fonksiyon ve canlılığının bir göstergesi olarak kabul edilir. Bunun aksine GSH derişiminin düşmesi hücre içi savunma sisteminin zayıflamasının ve mitokondriyal hasarın belirteçleri olarak kabul edilir³⁶.

Glutasyon sentezi oksidanlar, antioksidanlar ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenmektedir⁶⁷. Ağır hipokside oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengesizlik nedeniyle GSH seviyesinde azalma görülür. Bu bulgular literatürde GSH'taki azalmanın oksidatif stres sırasında oluşan ROS nedeniyle olduğunu göstermektedir⁷⁴.

Çeşitli çalışmalarda hipokside hem doku hem de kan GSH seviyesinde azalma olduğu gösterilmiştir⁸⁰⁻⁸¹. Demir ve arkadaşları⁸² iskemi ve reperfüzyon hasarında karaciğerde lipid peroksit düzeylerinin arttığını ve NAS (N-Asetil Sistein) uygulamasının doku lipid peroksit seviyelerinde azalmaya yol açtığını öne sürmüşlerdir. Bir GSH öncülü olan NAS uygulamasının doku GSH düzeyinde yükselmeyi sağladığı bildirilmektedir⁸³. Tiyoil grubu içeren NAS'ın GSH öncülü olduğu ve ayrıca çeşitli ROS bileşikleri ile tepkimeye girdiği bildirilmektedir⁸⁴. Enzimatik olmayan bir antioksidan olan GSH'ın azalmasının hipokside görülen

doku hasarına katkıda bulunabileceğini düşünerek NAS uyguladıkları grupta, doku lipid peroksit düzeylerinde hipoksik gruba göre anlamlı derecede düşüş saptamışlardır. Çalışmalarının sonuçları, hipoksi uygulamasının artan ROS üretimine bağlı olarak doku GSH seviyesinde azalmaya yol açabileceği ve NAS uygulamasının gerek GSH öncülü olması, gerekse direkt antioksidan etkileri aracılığı ile oksidan stresi azaltmış olabileceği savını güçlendirmektedir.

Alkan ve arkadaşları, yavru sıçan beyinlerinde hipoksik önkoşullamanın antioksidan enzim aktivitesi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin hipoksik önkoşullamada artarak oluşacak oksidatif strese karşı tolerans geliştirdiklerini buldular⁷¹.

Yapılan başka çalışmalarda, yüksek rakım ile indüklenen oksidatif stres nedeniyle karaciğerde glutatyon peroksidaz aktivitesinin azaldığını saptadılar⁷⁷.

Yaptığımız çalışmada karaciğer dokusunda GSH düzeylerinin ağır hipoksi grubunda diğer gruplara göre en düşük olması, hücre içi reaktif oksijen metabolitlerinin artmasına bağlı mitokondriyal hasarın belirteci olarak düşünülebilir. Ayrıca düşük GSH seviyesi ROS nedeniyle mitokondriyal ve sitoplazmik glutatyonun tüketilmesi savını güçlendirmektedir.

Önkoşullama uyguladığımız grupta ise GSH düzeyinin en yüksek bulunmasını; önkoşullamanın hem lipid peroksidasyonunu azaltmasına hem de oksidatif stresi azaltarak hücreyi özellikle de mitokondriyi hipoksik hasardan koruduğu şeklinde yorumladık.

Önkoşullamanın ardından ağır hipoksi uyguladığımız grupta GSH düzeyinin kontrol grubuna göre %38,16 yüksek bulunması da antioksidan sistemin hipoksik önkoşullama ile aktive olarak doku hasarını azalttığı sonucunu desteklemektedir.

Glutatyonun biyolojik aktivitesi sisteinden kaynaklanır. Sistein ekstraselüler aralıkta kolayca okside olan bir karbon bağlı sülfidril grubu içerir. Sülfidril grubundaki disülfid bağı, bir protein olmayan GSH'ın birçok fonksiyonuna katkıda bulunur. Glutatyonun primer sistein deposu olarak, ksenobiyotik konjugasyonu ve detoksifikasyonunda ve de serbest radikal yakalayıcısı olarak pek çok fonksiyonu vardır. Ayrıca nitrozatif strese karşı da koruyucu olarak görev yapar.

Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz ile L-arjinin'den L-sitrüllin sentezinde üretilir. Nitrik oksit, süperoksit ve oksijeni içeren bir dizi reaksiyon ile nitrit ve nitrata metabolize edilir¹⁵.

Fizyolojik derişimlerdeki NO, lipid peroksidasyonunu sonlandırıcı etkiye sahiptir. Kantrow ve arkadaşları⁸⁴ hipoksik akciğerde NO üretiminin azaldığını göstermişlerdir.

Nitrik oksit yüksek miktarda üretildiğinde süperoksit radikali ile reaksiyona girerek peroksinitrite dönüşmekte ve hücrel hasarda önemli rol oynamaktadır. Peroksinitrit ise proteinlerle reaksiyona girerek protein rezidülerini okside etmektedir. Nitrotirozin oluşumu peroksinitrit aracılı protein modifikasyonunu temsil eder ve diğer ROS aracılı modifikasyonlardan farklıdır. NO hücrel sinyal molekülü olarak ve fizyolojik koşullarda vazodilatatör olarak görev yapar. NO₂⁻, hipoksi/iskemi koşullarında NO'ya indirgenir⁸⁶.

Peroksinitrit (ONOO⁻), NO ve süperoksit arasındaki reaksiyonunun stabil ürünü olarak oluşur⁸⁷⁻⁸⁸. Peroksinitrit, protein fonksiyonlarını bozarak tirozin nitrat oluşturur. ONOO⁻, NO oluşumunu bir negatif geribildirim ile düzenler.

Yapılan başka çalışmalarda NO'nun ksantin oksidazı inhibe ettiği gösterilmiş ve böylece radikal oluşumunu azaltabileceği ileri sürülmüştür. Hipoksik koşullarda arjinaz enziminin arjinini tüketerek, NO üretiminde azalmaya yol açmış olabileceğini, azalan NO'nun lipid peroksidasyonunu inhibe edememesinin bir sonucu olarak doku hasarının oluşmuş olabileceğini düşünmüşlerdir³¹.

Nitrik oksitin hipoksi sonucu oksidatif strese neden olarak doku hasarı yapacağı ya da fizyolojik koşullarda koruyucu etki yapabileceğine dair çelişkili çalışmalar⁸⁹ olmasına rağmen önkoşullama ve ağır hipoksinin birlikte değerlendirilerek NO'nun araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Nitrik oksitin radikal olarak reaktivitesi düşüktür, ancak metal içeren bileşikler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girerler. Özellikle lipid radikallerle tepkimeye girmesi NO'ya antioksidan bir etki kazandırır. Fizyolojik derişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO_3^-) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksidi ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin indüksiyonu sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bu reaktif türler NO'nun dolaylı etkilerinden sorumludur ve hücrel moleküllerin nitrozilasyonuna, nitrasyonuna, nitrozasyonuna yol açarak, proteinlerin ve enzimlerin aktivitelerinin sonlanmasına neden olabilirler³¹.

Çalışmamızda NO'nun oksihemoglobin tarafından oksitlenen şekli olan NO_3^- olarak ölçtük. NO değerlerimizde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmasa da kontrol grubuna göre önkoşullama grubunda % 4,5 artış; önkoşullama+ ağır hipoksi grubunda %13,6 artış görülürken ağır hipoksi grubunda herhangi bir değişiklik olmadı. Yapılan çalışmalara göre ağır hipoksi sonucu oluşan oksidan

stres, ortamda NO ve süperoksitin reaksiyona girerek peroksinitrit radikalleri oluşturmaya neden olmaktadır¹³. Önkoşullama sonrası ağır hipoksi grubunda, önkoşullama ile karaciğerde artmış antioksidan aktivite (GSH), nitrozatif strese karşı da koruyucu olarak görev yapar. Bu nedenle bu grupta peroksinitrit radikallerine dönüşüm azalacağı için NO seviyelerinde daha yüksek oranda artma görülmektedir.

Lipid peroksidasyonu, hücre membranındaki polienoik yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan otokatalitik bir reaksiyon sürecidir³². Poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu, reaktif karbonil bileşiklerinin ürünü olan ROS ile sonuçlanır. Lipid peroksidasyon göstergesi olarak MDA yaygın olarak kullanılmaktadır⁶⁻⁷.

Kılıç ve arkadaşları⁸² hipoksida beyin, kalp, akciğer ve karaciğer dokularında lipid peroksidasyon artışı olduğunu göstermişlerdir.

Altun ve arkadaşlarının hipoksi sonrası erken/geç dönem reoksijenasyonun umbilikal endotel vasküler hücrelerinde oksidatif stresin etkilerini incelediği çalışmada, MDA düzeylerinin 4 saat hipoksi uygulanan grupta artış gösterdiğini ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığını saptadılar. MDA düzeylerinin, hipoksi ardından erken ve geç reoksijenasyon gruplarında hipoksi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma gösterdiğini buldular. NO konsantrasyonunu ise tüm gruplarda artış göstermekle birlikte

istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gördüler. NO düzeylerinin hipoksi grubuna göre reoksijenasyon gruplarında hafif azalma gösterdiğini ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğunu saptadılar⁸⁹.

Yapılan başka çalışmalarda da⁸⁹⁻⁹⁰ bizim çalışmamız ile benzer olarak karaciğer dokusunda değerlendirilen MDA değerlerini istatistiksel olarak anlamlı bulamamışlardır. Yaptığımız çalışmada anlamlı olmasa da önkoşullama grubunda %37,36 azalma göstermesi, önkoşullama sonrası oksidatif stresin azalması savını doğrulamaktadır. Önkoşullama sonrası ağır hipoksi uygulanan grupta, ağır hipoksi grubuna göre daha az oranda artması, lipid peroksidasyonunun önkoşullamaya bağlı azaldığını düşündürmektedir. Ağır hipoksi grubunda % 24'lük artış olması ise literatürdeki serbest oksijen radikallerine bağlı oluşan hepatosit hasarı ile uyumludur.

Aspartat aminotransferaz ve Alanin aminotransferaz enzimleri, serumda ve birçok dokuda bulunmakla beraber en fazla karaciğer parenkimal hücrelerinde bulunmaktadır. Artmış AST ve ALT değerleri, akut karaciğer hasarına neden olan durumlarda görülmektedir⁵⁴. ALT, başlıca hepatosit sitoplazmasında bulunurken AST, mitokondri ve sitoplazmada bulunmaktadır. Bu nedenle ALT, başlıca sitoplazmik membran geçirgenliğindeki artışı gösterirken; artmış AST seviyeleri hem sitoplazmik membran geçirgenliğindeki artışı hem de mitokondriyal hasarı gösterir⁷⁰.

Alexander ve arkadaşlarının sol karaciğer lobuna 45 dakika iskemi ve 4 saat reperfüzyon sonrası hipoksik önkoşullama uyguladıkları hayvanlarda AST, ALT ve LDH seviyelerinde anlamlı düşme buldular. Bu koruyucu etkiyi reperfüzyon uygulamasından 1 saat sonra gördüler⁷⁹.

Hipoksi karaciğerde protein, lipid ve nükleik asitlerde oksidatif hasara neden olarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Hipoksik karaciğerde ATP seviyesi azalıp ADP ve AMP konsantrasyonları artar. Yapılan çalışmalara göre AST ve ALT değerleri ağır hipokside artmaktadır. Fakat hipoksik önkoşullama ve ağır hipoksinin birlikte uygulanarak AST ve ALT seviyelerini ölçen bir çalışma bulunmamaktadır¹⁷⁻⁶⁸⁻⁷⁰.

Yaptığımız çalışmada AST ve ALT değerleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bunun nedeni denek sayımızın az olmasından ve standart sapmaların yüksekliğinden kaynaklanabilir. Yapılan bazı çalışmalarda da hipoksi uygulanan hayvanlarda AST ve ALT değerlerinde anlamlı bir artış bulunamamıştır¹⁸.

Bununla birlikte AST ve ALT değerleri ağır hipoksi grubunda tüm gruplara göre artış gösterdi. AST değerlerinin en fazla ağır hipoksi grubunda

artması (%18,9artma) mitokondride GSH'ın azalması sonucu membran hasarının artmasıyla açıklanabilir.

Alanin aminotransferaz değerlerinin en fazla oranda ağır hipoksi grubunda artması (%106,7) ise sitosolde biriken serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu doku hasarıyla açıklanabilir.

Önkoşullama sonrası ağır hipoksi uygulanan hayvanlarda AST ve ALT değerleri, sadece ağır hipoksi uygulanan gruba göre daha az oranda artış gösterdi (AST %8,9 ve ALT %17,1 artış). Bu bulgular, önkoşullama nedeniyle mitokondride GSH sentezinin artmasına bağlı olarak karaciğerde doku hasarının azalarak AST ve ALT artışının kısmen de olsa önlenebilmesine neden olduğunu düşündürmektedir. Ağır hipoksi sonucu oluşan artış ise, serbest radikaller nedeniyle oksidatif stres oluştuğunu ve önkoşullamanın koruyucu etkisini ortadan kaldırdığını göstermektedir.

Diğer yandan önkoşullama grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılıkta olmasa da AST %14,6, ALT %41 oranında azalma gösterdi. Bu durum önkoşullamanın karaciğer membran hasarını önleyerek bu enzimlerin dolaşıma çıkmasını engellediğini gösterebilir.

Manukyan ve arkadaşları “whey proteini” denilen peyniraltı suyu proteiniyle sıçan karaciğerinde gerçekleştirdikleri GSH önkoşullamasının iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı üzerine etkilerini araştırdılar. Deneklerin kan örneklerinde kontrol grubu ve whey ile beslenen grup arasında AST ve ALT değerlerinde anlamlı fark bulmamakla birlikte iskemi/reperfüzyon yapılarak whey ile beslenen grupta anlamlı düşme buldular. Aynı zamanda önkoşullama yapılan grupta MDA değerlerinin düştüğünü ve GSH değerlerinin arttığını saptadılar⁹⁰.

Nishimura ve arkadaşları ile Teschke ve arkadaşları alkole bağlı olarak serum AST ve ALT aktivitesinde artış olduğunu⁴⁰⁻⁵⁹, Glinsukon ve arkadaşları Serum ALT aktivitesinde artış, serum AST aktivitesinde azalma⁷², Ishii ve arkadaşları serum ALT aktivitesinde bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir⁵⁸. Bir hayli eski çalışmalara ait bu çelişkili yayınlara rağmen bugün artık AST ve ALT’nin karaciğer hücre harabiyetinin göstergesi olduğu kesindir⁷⁸.

Yaptığımız çalışmanın histolojik incelemelerinde ağır hipoksi uygulamasının karaciğer dokusu üzerinde vena centralis’e yakın sinüzoidlerde dilatasyona neden olduğu, portal triad yapısının bozulduğu, hepatositlerin çok çekirdekli hal aldığı ve perivasküler ödemin gelişmesine neden olduğu gözlemlendi. Bu bulgular literatürdeki çalışmalar ile uyumludur⁷⁹⁻⁸⁹⁻⁹⁰.

Hanan ve arkadaşlarının sıçan karaciğerinde hipoksinin antioksidan sistemler üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada, hipoksi sonucu karaciğerde

konjesyon, sinüzoidal dilatasyon, lenfatik genişleme, bölgesel hepatoselüler vakuolizasyon ve hepatosit şişmesi gibi histolojik değişiklikler gördüler. Kromatin yapısını, sitoplazmadaki mitokondri sayısı-yapısını normal olarak saptadılar⁶⁸.

Yavuzer'in sıçan karaciğerinde iskemi-reperfüzyon yaptığı çalışmanın histolojik incelemesinde ışık mikroskopunda apoptoz değerlendirmesi için en büyük büyütmede (x40 HBF) 200 hücre saydı. Pozitif boyanan hücre sayısı % olarak belirtildi⁷³.

GSH/GSSG redoks durumunun okside duruma kayması; protein kinaz B, protein fosfataz 1 ve 2A, kalsinörin, nükleer faktör kappa B, c-Jun N-terminal kinaz, apoptoz sinyal düzenleyici kinaz-1 ve mitojen ile aktive olan protein kinaz gibi pek çok sinyal yollarını aktive ederek hücre proliferasyonunu azaltmakta ve apoptozu artırmaktadır⁹².

Yaptığımız çalışmada ağır hipoksi sonucu hepatositlerin çok çekirdekli görünmesi ve perivasküler ödem, hücrelerde redükte glutatyonun azalmasına bağlı olarak apoptoz gittiğini düşündürmektedir.

Önkoşullama uygulaması sonrası yapılan incelemelerde sinüzoidlerde dilatasyonun varlığı yine tespit edilmekle birlikte, bu oranın göreceli olarak ağır

hipoksi uygulamasından daha az oranda saptanması, önkoşullamanın karaciğerde hasarı önleyici etkiler yaptığını göstermektedir. Yine bu grupta çok çekirdekli hepatositlerin varlığı dikkati çekerken, diğer histolojik yapıların kontrol grubu ile eşdeğer olduğu izlendi.

Önkoşullama ve ağır hipoksi uygulamasının bir arada yapılması sonucunda portal triad ve vena centralis çevresi sinüzoid yapılarının normale döndüğü gözlemlendi. Önkoşullamanın bu anlamda iyileştirici etki gösterdiği ancak ağır hipoksi nedeniyle perivasküler ödem ve çok çekirdekli hepatositlerin varlığının izlenmesi, sadece ağır hipoksi uygulanan gruba göre daha az sayıda hücrenin apoptoza gittiğini gösterir.

Manukyan ve arkadaşlarının GSH önkoşullaması ve iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı sonrasında sıçan karaciğerinde yaptıkları histolojik incelemede kontrol I/R grubunda perisantral alanda artmış hepatosellüler atrofi, sinüzoidal dilatasyon, onkotik nekroz ve belirgin apoptoz görüldü. Önkoşullama grubunda ise hepatosellüler atrofi, sinüzoidal dilatasyon daha az oranda izlendi. Onkotik nekroz hiçbir önkoşullama uygulanan karaciğer kesitlerinde saptanmadı⁹⁰.

Alexander ve arkadaşları yaptıkları çalışmanın histolojik incelemesinde doku hasarının derecesini 0'dan 4'e kadar olan bir skalada değerlendirdiler. Hasar

olmayan dokuları 0 ile gösterirken % 25'ten daha az dejenerasyonu (1)ile; %26–50 arasını (2) ile; %51–75 arasını (3) ile; %75'ten fazla olanları ise (4) olarak değerlendirdiler. Hepatoselüler hasarın hipoksik önkoşullama yapılan grupta kontrole göre yaklaşık % 50 oranında azaldığını buldular⁷⁹.

Hipoksik önkoşullamanın organizmada mekanizmasının henüz tam olarak açıklanamadığı birçok fonksiyona sahip olduğu açıktır. Çalışmamızdaki bulguların, bu mekanizmaları açıklamaya yönelik daha ileri araştırmalarla elde edilecek verilerle desteklenmesi gerektiği kanısındayız.

6. SONUÇ

1. Bu çalışmada hipoksik önkoşullamanın karaciğerde antioksidan sistemi aktive ederek ağır hipoksi sonucu ortaya çıkan oksidatif stresi önleyebileceği gösterilmiş oldu. Böylece karaciğerde oluşabilecek oksidan hasar en az düzeye inmektedir.

2. Yaptığımız çalışmada histolojik bulgularımızın da ışığında ağır hipoksinin karaciğerde metabolik aktiviteyi arttırarak hücre ve diğer yapılarda dejeneratif değişikliklere neden olduğu, önkoşullamanın ise kısmen bu aktiviteyi yavaşlatıp, normal metabolizmaya yaklaştırdığı kanısına vardık.

3. Hipoksik önkoşullama sonucu GSH'ın istatistiksel olarak anlamlı artması; karaciğerde oksidatif hasarın azalarak koruyucu etki yaptığı kanısını desteklemektedir.

4. Bununla beraber hipoksik önkoşullamanın karaciğer fonksiyonları üzerindeki etkisinin tedavide kullanılması için detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Saxena S, Shukla D, Bansal A. Augmentation of aerobic respiration and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by hypoxia preconditioning with cobalt chloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 264 (3): 324-34.
2. Mahura I. Cerebral ischemia-hypoxia and biophysical mechanisms of neurodegeneration and neuroprotection effects. *Fiziol Zh* 2003; 49(2): 7-12.
3. Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ, Land SC. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(18): 9493–9498.
4. Perkins G, Hsiao Y, Yin S, Tjong J , Tran MT , Lau J , et al. Ultrastructural modifications in the mitochondria of hypoxia-adapted drosophila melanogaster. *Plos One* 2012; 7(9).
5. Maxwell SR. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 1995; 49: 345-361.
6. Maiti P, Singh SB, Sharma AK, Muthuraju S, Banerjee PK, Ilavazhagan G. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. *Neurochem Int* 2006; 49(8):709-716.
7. Jayalakshmi K, Sairam M, Singh SB, Sharma SK, Ilavazhagan G, Banerjee PK. Neuroprotective effect of N-acetyl cysteine on hypoxia-induced oxidative stress in primary hippocampal culture. *Brain Res* 2005; 1046: 97-104.

8. Ramanathan L, Gozal D, Siegel JM. Antioxidant responses to chronic hypoxia in the rat cerebellum and pons. *J Neurochem* 2005; 93: 47-52.
9. Rau TF. The role of l-carnitine in preventing mitochondrial dysfunction after neonatal hypoxia-ischemia. *Neuroscience* 2007.
10. Stetler RA, Leak RK, Gan Y, Li P, Hu X, Jing Z, et al. Preconditioning provides neuroprotection in models of CNS disease: Paradigms and clinical significance. *Prog Neurobiol* 2014; 26: 68.
11. Yang CC, Lin LC, Wu MS, Chien CT, Lai MK. Repetitive hypoxic preconditioning attenuates renal ischemia/reperfusion induced oxidative injury via upregulating HIF-1 α -dependent bcl-2 signaling. *Transplantation* 2009; 88: 1251-1260.
12. Bin-Jaliah I, Ammar HI, Mikhailidis DP et al. Cardiac adaptive responses after hypoxia in an experimental model. *Angiology* 2010; 61: 145-156.
13. Pistilli E, Bogdanovich S, Mosqueira M, Lachey J, Seehra J, Khurana TS. Pretreatment with a soluble activin type IIB receptor/Fc fusion protein improves hypoxia-induced muscle dysfunction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 298 (1): R96-R103.
14. Lieber CS. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. *Adv Pharmacol* 1997; 38: 601-628.
15. Jo-Lin Chen. Hypoxia-induced adaptive responses. *Pharmacol* 2008; 283: 34432-44.

16. Zhou JY, Jiang ZA, Zhao CY, Zhen Z, Wang W, Nanji AA. Long-term binge and escalating ethanol exposure causes necroinflammation and fibrosis in rat liver. *Alcohol Clin Exp Res* 2013; 37(2); 213-222.
17. Chen XY, Zeng YM, Zhang YX, Wang WY, Wu RH. Effect of chronic intermittent hypoxia on theophylline metabolism in mouse liver. *Chin Med J (Engl)* 2013; 126(1); 118-123.
18. Wu XD, Zhang ZY, Sun S, Li YZ, Wang XR, Zhu XQ, et al. Hypoxic preconditioning protects microvascular endothelial cells against hypoxia/reoxygenation injury by attenuating endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis* 2013; 10495.
19. Baze MM. Effects of hypoxia and high altitude on gene expression, energetics and immune function. ProQuest UMI Dissertations Publishing, 2011; 3457511.
20. Shao Y, Zhao FQ. Emerging evidence of the physiological role of hypoxia in mammary development and lactation. *J Anim Sci Biotechnol* 2014; 5(1):9.
21. Nanduri R, Prabhakar S, Gregg LS. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol Rev* 2012; 92(3): 967–1003.
22. Hua F, Fengming L, Li Y, Wenchao W, Xiaojing L. Hypoxia stimulates the expression of macrophage migration inhibitory factor in human vascular smooth muscle cells via HIF-1 α dependent pathway. *BMC Cell Biol* 2010; 11: 66.

23. Ghose P, Park EC, Tabakin A, Vasquez NS, Rongo C. Anoxia reoxygenation regulates mitochondrial dynamics through the hypoxia response pathway, SKN-1/Nrf and Stomatin-Like Protein STL-1/SLP-2. *PLoS Genet* 2013; 9:12.
24. Araneda O, Tuesta M. Lung oxidative damage by hypoxia. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 2012: 856918.
25. Mian G, Chi X, Zhang A, Luo G, Sun G, Xie H, et al. Intestinal NF-E2-related factor-2 expression and antioxidant activity changes in rats undergoing orthotopic liver autotransplantation. *Oncol Lett* 2013; 6(5): 1307–1312.
26. Poljsak B. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev* 2011; 2011: 194586.
27. Y Lu, CC Wu, YC Huang, CY Huang, CY Yang, T.C Lee, et al. Neutrophil priming by hypoxic preconditioning protects against epithelial barrier damage and enteric bacterial translocation in intestinal ischemia/reperfusion. *Oral and gastrointestinal systems. Lab Invest* 2012; 92(5):783-96.
28. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87(1):315-424.
29. Hartlage-Rübsamen M, Schliebs R. Rat basal forebrain cholinergic lesion affects neuronal nitric oxide synthase activity in hippocampal and neocortical target regions. *Brain Res* 2001; 889,(1-2):155-64.

30. Nels O, Albert V. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease nitric oxide 2011; 25(2): 125–137.
31. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* 2009; 22: 46-55.
32. Baron V, Muriel P. Role of glutathione, lipid peroxidation and antioxidants on acute bile-duct obstruction in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1999;1472(1-2):173-80.
33. Abudayyak M, Ozden S, Alpertunga B, Ozhan G. Effects of bentazone on lipid peroxidation and antioxidant systems in human erythrocytes in vitro. *Drug Chem Toxicol* 2014; 33: 62.
34. Malik UU, Siddiqui IA, Hashim Z, Zarina S. Measurement of serum paraoxonase activity and MDA concentrations in patients suffering with oral squamous cell carcinoma. *Clin Chim Acta* 2014; 430C:38-42.
35. Carecani P, Rosenbloom E.R, Van Thiel DH. Reoxygenation injury in isolated rat hepatocytes: Relation to oxygen free radicals and lipid peroxidation. *Am J Physiol* 1994; 266-806.
36. Foschi D, Castoldi L, Lesma A., Musazzi M., Effects of ischemia and reperfusion on liver regeneration in rats. *Eur J Surg* 1993; 159:393-398.

37. Niki E. Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chem Phy Lipids* 1987;44: 227-253.
38. Porter N.A. Chemistry of lipid peroxidation, methods in enzymology 1984; 105: 273-283.
39. Ma Y, Zhang L, Rong S, Qu H, Zhang Y, Chang D, et al. Relation between gastric cancer and protein oxidation, DNA damage and lipid peroxidation. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013:543760.
40. Teschke R., Neufeind M., Nishimura M., Strohmeyer G.: Hepatic gamma glutamyl transferase activity in alcoholic fatty liver. *Gut* 1983; 24: 625-630.
41. Symon Z, MD, Levi M, M Sc, Ensminger WD. Selective radioprotection of hepatocytes by systemic and portal vein infusions of Amifostine in a liver tumor model. *Virchows Arch* 1997;431: 119-124.
42. Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 204: 263-73.
43. Ault JG, Lawrance DA. Glutathione distubation in normal and oxidatively stressed cells. *Exp Cell* 2003; 285: 9-14.
44. Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 1995; 21: 1725-1741.
45. Jaeschke H. Moleculer mechanisms of hepatic ischemia reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;125: 917-36.

46. Terada T, Nakanuma Y. Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile duct development. *Am J Pathol* 1995; 146: 67-74.
47. Ronen RL, Esther S. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms. *Neuroprotective opportunities*. 2002; 39: 55-73.
48. Ballatori N, Hammond C L, Krance S M. Molecular mechanism of reduced glutathione transport: Role of the MRP/ CFTR / ABCC and OATP / SCL21A families of membrane proteins. *Toxicol App Pharmacol* 2005; 204: 238-255.
49. Shaw L. A phase study comparing bioavailability of intravenous and subcutaneous administration of Amifostine. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1997; 16: 250.
50. Nazzareno B, Suzanne MK, Sylvia N, Sh Shujie S, Kim T, Christine LH. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 2009; 390(3): 191–214.
51. Anne MF, Dean PJ, Lou ASB. Glutathione redox control of asthma: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2012; 17(2):375-408.
52. Tobias I NE, Anthonet NE, Orish EO, Nwigwe HC, Ferdinand OU, Osuala OE. Anicteric hepatotoxicity: a potential health risk of occupational exposures in Nigerian petroleum oil refining and distribution industry. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 2014; 9:3.

53. Linlin Z, John BS, James FR. Screening for reactive metabolites using electro-optical arrays featuring human liver cytosol and microsomal enzyme sources and DNA. *Chem Commun (Camb)*. 2009;36: 5386–5388.

54. Lu XX, Wang SQ, Zhang Z, Xu HR, Liu B, Huangfu CS. Protective effects of sodium nitrite preconditioning against alcohol-induced acute liver injury in mice. *Sheng Li Xue Bao* 2012; 64(3):313-20.

55. Kannan N, Sakthivel KM, Guruvayoorappan C. Protective effect of *Acacia nilotica* (L.) against acetaminophen induced hepatocellular damage in Wistar rats. *Adv Pharmacol Sci* 2013; 20:987692.

56. Fickert P, Zatloukal K. Pathogenesis of alcoholic liver disease. In: *Handbook of Alcoholism* (Eds. G. Zernig, A. Saria, M. Kurz, and S.S. O'Malley) Boca Raton, FL: CRC Press 2000; 317-323.

57. Dolar E: *Klinik Karaciğer Hastalıkları*. Bölüm 4, , 1.Baskı, Nobel&Güneş Tıp Kitabevi, 2002; 133-146.

58. Ishii H, Watanabe Y, Okuno F, Takagi T, Munakata Y, Miura S, et al. Alcohol-induced enhancement of intestinal gamma-glutamyl transpeptidase activity in rats and humans: a possible role in increased serum gamma-glutamyl transpeptidase activity in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 12(1):111-5.

59. Nishimura M, Teschke R. Effect of chronic alcohol consumption on the activities of liver plasma membrane enzymes. *Biochem Pharmacol* 1982; 31 (3): 377-381.

60. Yang CC, Lin LC, Wu MS, Chien CT, Lai MK. Repetitive hypoxic preconditioning attenuates renal ischemia/reperfusion induced oxidative injury via upregulating HIF-1 alpha-dependent bcl-2 signaling. *Transplantation* 2009; 88: 1251-1260.

61. Bin-Jaliah I, Ammar HI, Mikhailidis DP et al. Cardiac adaptive responses after hypoxia in an experimental model. *Angiology* 2010; 61: 145-156.

62. Boyette LB , Creasey OA , Guzik L , Lozito T, Tuan RS. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells display enhanced clonogenicity but impaired differentiation with hypoxic preconditioning. *Stem Cells Transl Med* 2014; 3(2):241-54.

63. Hu S, Yan G, Xu H, He W, Liu Z, Ma G. Hypoxic preconditioning increases survival of cardiac progenitor cells via the Pim-1 kinase mediated anti-apoptotic effect. *Circ J* 2014; 78(3):724-31.

64. Monson NL, Ortega SB, Ireland SJ, Meeuwissen AJM, Chen D, Plautz JE, et al. Repetitive hypoxic preconditioning induces an immunosuppressed B cell phenotype during endogenous protection from stroke. *Journal of Neuroinflammation* 2014; 11: 22.

65. Plock J, Frese S, Keogh A, Bisch-Knaden S, Ayuni E, Corazza N, et al. Activation of non-ischemic, hypoxia-inducible signalling pathways up-regulate cytoprotective genes in the murine liver. *J Hepatol* 2007; 47(4):538-45.

66. Chen W, Qiu JF, Zhang ZQ, Luo HF, Rosello-Catafau J, Wu ZY. Gene expression changes after hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5(3):416-21.
67. Jebur AB, Nasr HM, El-Demerdash FM. Selenium modulates b-cyfluthrin-induced liver oxidative toxicity in rats. *Environ Toxicol* 2013; 21:863.
68. SA Ali, HF Aly, LM Faddah, ZF Zaidi. Dietary supplementation of some antioxidants against hypoxia. *World J Gastroenterol* 2012;18(44):6379-86.
69. Singh R, Bhardwaj P, Sharma P. Antioxidant and toxicological evaluation of Cassia sopherain streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Pharmacognosy Res* 2013;5(4):225-32.
70. Ezejiofor TIN, Ezejiofor AN, Orish EO, Nwigwe HC, Osuala FOU, Iwuala MOE. Anicteric hepatotoxicity: a potential health risk of occupational exposures in Nigerian petroleum oil refining and distribution industry *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 2014; 9:3.
71. Alkan T, Gören B, Vatansever E, Sarandöl E. Effects of hypoxic preconditioning in antioxidant enzyme activities in hypoxic-ischemic brain damage in immature rats. *Turkish Neurosurgery* 2008; 165-171.
72. Glinsukon T, Taycharpipranai S, Toskulkao C: Alphatoxin 1 hepatotoxicity in rats pretreated with ethanol. *Experientia*. 34(7): 869-870, 1977.
73. Yavuzer N. Karaciğerde iskemi reperfüzyon ile indüklenmiş rejenerasyon modelinde kompleman inhibitörünün rolü. Uzmanlık Tezi. Ankara: Başkent Üniversitesi, 2008.

74. Dowd WW , Renshaw GMC , C Joseph , Kültz D. Compensatory proteome adjustments imply tissue-specific structural and metabolic reorganization following episodic hypoxia or anoxia in the epaulette shark (*Hemiscyllium ocellatum*). *Physiol Genomics* 2010; 42(1): 93–114.
75. Lehmann GT, Koeppe TA, Steffen M, Heger M, Kirschfink M, Klar E et al. Impact of inhibition of complement by scr1 on hepatic microcirculation after warm ischemia. *Microvascular Research* 2001; 62: 284-292.
76. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD, Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia reperfusion. *Am J Pathol* 1994; 145:1421-1431.
77. Dosek A, Ohno H, Acs Z, Taylor AW, Radak Z. High altitude and oxidative stress. *Respir Physiol Neurobiol.* 2007;158(2-3):128-31.
78. Samir P, Desai MD, Sana Isa-Pratt MD. *Clinician's Guide to Laboratory Medicine* 2004; Pt 66: 612- 613.
79. Choukèr A, Ohta A, Martignoni A, Lukashev D, Zacharia LC, Jackson EK, et al. In vivo hypoxic preconditioning protects from warm liver ischemic/reperfusion injury through the adenosine A2B receptor. *Transplantation.* 2012; 94(9): 894–902.
80. Pullar JM, Winterbourn CC, Vissers MC. Loss of GSH and thiol enzymes in endothelial cells exposed to sublethal concentrations of hypochlorous acid. *Am J Physiol.* 1999; 277(4 Pt 2): H1505-1512.

81. Sarada SK, Sairam M, Dipti P, Anju B, Pauline T, Kain AK, et al. Role of selenium in reducing hypoxia-induced oxidative stress: an in vivo study. *Biomed Pharmacother* 2002; 56(4): 173-178.

82. Kılıç İ, Kılıç BA, Güven C, Demirpençe E, Akşit MA: Role of nitric oxide in hypoxia-induced changes in newborn rats. *Biol Neonate* 2000; 78: 191-197.

83. Allameh A, Vansoun EY, Zarghi A. Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Mech Ageing Dev* 1997; 95(1-2): 71-79.

84. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 1989; 6(6): 593-597.

85. Kantrow SP, Huang YC, Whorton AR, Grayck EN, Knight JM, Millington DS, et al. Hypoxia inhibits nitric oxide synthesis in isolated rabbit lung. *Am J Physiol*. 1997; 272(6 Pt 1): L1167-L1173.

86. Karlin KD, Hematian S, Siegler AM. Nitric oxide generation from heme/copper assembly mediated nitrite reductase activity. *J Biol Inorg Chem*. 2014; 86: 9.

87. Dick AS , Ivanovska J , Kantores C, Belcastro R, Keith AT, Jankov RP. Cyclic stretch stimulates nitric oxide synthase-1-dependent peroxynitrite formation by neonatal rat pulmonary artery smooth muscle. *Free Radic Biol Med* 2013; 61C:310-319.

88. Muntané J. , De la Rosa AJ. , Marín LM. , Padillo JF. Nitric oxide and cell death in liver cancer cells. *Mitochondrion* 13; 2013; 257–262.
89. Altun ZS, İşlekel H, Sayın O, Eğrilmez MY, Genç Ş, Genç K, Çavdar Z, Oktay G, Güner G. How does early and late reoxygenation following hypoxia affect human umbilical vascular endothelial cells in respect to oxidative stress? *Turk J Biochem* 2010; 35 (3) ; 225–229.
90. Manukyan MN, Yavuz Y, Erbarut İ, Velioglu ÖA, Çelikel ÇA, Yalçın S, et al. The effect of glutathione preconditioning on heme oxygenase-1 system established by whey protein feeding on hepatocellular injury in a rat hepatic normothermic i/r injury model. *Turkish Journal of Surgery* 2008; vol 137-44.
91. Carini R, Grazia CM, Splendore R, Domenicotti C, et al. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology* 2000; 32: 333A.
92. Guoyao W, Fang YZ, Yang S, Joanne R. Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *American Society for Nutritional Sciences* 2004; 112-115.
93. Li J, Yang C, Hana S, Zua P, Wu J, Xua Q, et al. Increased phosphorylation of neurogranin in the brain of hypoxic preconditioned mice. *Neuroscience Letters* 2006; vol 150–153.

94. Wu X, Liu X, Zhu X, Tang C. Hypoxic preconditioning induces delayed cardioprotection through p38 mapk-mediated calreticulin upregulation. *Shock* 2007;27, 572-577.
95. Wick A, Wick W, Waltenberger J, Weller M, Dichgans J, Schulz. Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt. *The Journal of Neuroscience*, 2002, 22(15):6401–6407.
96. Casini A, Ferrali M, Pompelam A, Maellaro A, Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene intoxicated mice. *Am J Pathol*. 1986; 123:520-531.
97. Aykac G, Uysal M, Yalcin AS, Kocak-Toker N, Sivas A, Oz H. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology* 1985; 36: 71-76.
98. Miranda KM, Espey MG, Wink DA, Nitric Oxide: *Biol and Chem*, 2001; 5(1) :62-71. Taskiran D, Kutay FZ, Sozmen E, Pogun S. Sex difference in nitrit/nitrate levels and antioxidant defence in rat brain. *Neuroreport* 8. 1997; 881-884.

8. ÖZET

SIÇANLARDA HİPOKSİK ÖNKOŞULLAMANIN KARACİĞERDE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİSİ

Yaptığımız çalışma ile hipoksik önkoşullamanın sıçan karaciğerinde oksidatif stres üzerindeki olumlu etkilerini görmeyi hedefledik.

Çalışmada ağırlıkları 220-300 g arasında değişen, 24 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı. I. grup, kontrol olarak kabul edildi. II. grup, 3 gün süre ile günde 2 saat %10 O₂ verilen hipoksik kamaraya yerleştirilerek hipoksik önkoşullama yapıldı. III. grup, 3 gün süre ile normal atmosfer koşullarında yaşatılıp, 4.günde 3 saat süre ile %7 O₂ ile ağır hipoksiye maruz bırakıldı. IV. grup, 3 gün süre ile günde 2 saat %10 O₂ verilen hipoksik kamaraya yerleştirilip önkoşullama yapıldıktan sonra, 4. günde 3 saat süre ile %7 O₂ verilen kamara ortamında ağır hipoksiye maruz bırakıldılar. Tüm sıçanlar bu işlemlerden sonra anestezi altında kalplerinden kan alınarak feda edildi ve incelenecek parametreler için gerekli kan ve karaciğer doku örnekleri alındı.

Karaciğer dokusunda oksidatif stres hasarı GSH, MDA ve NO düzeyleri ile, karaciğer fonksiyonları serumda AST ve ALT tayini ile, hücresel hasar ise histolojik olarak ışık mikroskopisi ile değerlendirildi.

Sonuç olarak; hipoksik önkoşullama karaciğer dokusunda GSH düzeylerini anlamlı derecede artırarak oksidan hasarı sınırlamış ve hücresel

düzeyde koruyucu etki göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Hipoksik önkoşullama, oksidatif stres, hepatosit hasarı
Glutasyon, Malondialdehit, Nitrik oksit

9. SUMMARY

THE EFFECTS OF HYPOXIC PRECONDITIONING ON OXIDATIVE STRESS IN RAT LIVER

The aim of this study was to investigate the positive effects of hypoxic preconditioning on oxidative stress in rat liver. Twenty four male Wistar- Albino rats weighing between 220-300 g were divided into 4 groups randomly: 1- Control, 2- Hypoxic Preconditioning, 3-Severe hypoxia, 4- Hypoxic Preconditioning + Severe hypoxia.

The animals of the first group were sacrificed after living in normal atmospheric conditions for 3 days. The second group underwent hypoxic preconditioning by breathing 10% oxygen for 2 hours followed by 3 days. After living in normal atmospheric conditions for 3 days, the third group was exposed to severe hypoxia by breathing 7% oxygen for two hours in the followed fourth day.

After preconditioning in a hypoxic atmosphere that was given %10 oxygen for two hours followed by three days, they were exposed to severe hypoxia under the atmosphere in which exists %7 oxygen in the followed fourth day.

After this procedure, all rats were sacrificed under anesthesia by drawing intracardiac blood. Blood and the liver tissue samples were collected for parameters. Oxidative stress injury in the liver tissue was assessed by GSH, MDA and NO levels, the functions of liver were measured by serum AST and ALT

determination, the cellular injury was evaluated for histological examination under light microscopy.

In conclusion; hypoxic preconditioning restricted the oxidative injury by increasing GSH levels significantly in the liver tissue and had protective effects in cellular levels.

Key Words: Hypoxic preconditioning, oxidative stress, hepatocyte injury, glutathione, malondialdehyde, nitric oxide.

10. EKLER

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Dilşat

Soyadı : Yıldırım Bingöl

Doğum Yeri ve Tarihi: Adana-16.08.1982

Eğitimi

- Tıpta Uzmanlık Eğitimi-Fizyoloji-2011-2014
- Çukurova Üniversitesi Eğitim Fakültesi Tezsiz Yüksek Lisans-2006
- Çukurova Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü-2004
- Adana Ayşe Atıl Anadolu Öğretmen Lisesi-2000

Yabancı Dili: İngilizce

Bilimsel Etkinlikleri:

1. 39.Ulusal Türk Fizyoloji Kongresi-10-14.09.2013-Ankara
2. Netherlands Institute For Neuroscience, Department of Synaptic Development –Amsterdam/Netherlands-1.06-31.08.2013 (Erasmus programı ile 3 aylık yurtdışı eğitim)

3. 11. Ulusal Sinirbilim Kongresi- 28.04-1.05.2013-İzmir
4. 38.Ulusal Türk Fizyoloji Kongresi- 25-29.09.2012-Trabzon

Katıldığı Kurslar:

1. EMG Kursu-10.09.2013-Ankara
2. EEG kursu-28.04.2013-İzmir
3. Gazi TÖMER İngilizce konuşma kursu-26.03.2013-30.05.2013
4. Gazi TÖMER İngilizce gramer kursu-24.09.2012-19.05.2013
5. Araştırma görevlileri için İngilizce telaffuz ve tekniklerini geliştirme kursu-12.04.2012
6. Araştırma görevlileri için tıpta iletişim becerileri eğitim programı-05.03.2012
7. Araştırma görevlileri uyum kursu-06.01.2012
8. Deney hayvanları uygulama ve etik kursu-22-30.11.2010
9. Temel biyoistatistik kursu-11-12.12.2010