

Karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarında α -lipoik asit ve L-karnitin'in koruyucu etkileri

[Protective effects of α -lipoic acid and L-carnitine in liver ischemia/reperfusion injury]

Gülben Sayılan Özgün¹,
Eray Özgün¹,
Ümit Nusret Başaran²,
Şemsi Altaner³,
Necdet Süt⁴,
Sevgi Eskioçak¹

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Tıbbi Biyokimya,
²Çocuk Cerrahisi Ana Bilim Dalı,
³Patoloji Ana Bilim Dalı, ⁴Biyostatistik ve Tıbbi
Bilişim Ana Bilim Dalı, Edirne

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Gülben Sayılan Özgün

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya
Ana Bilim Dalı, 22030 Edirne
Tel. 905444191946
E-posta. gulben_syln@hotmail.com

Kayıt Tarihi: 23 Eylül 2013; Kabul Tarihi: 23 Aralık 2013
[Registered: 23 September 2013; Accepted: 23 December 2013]

ÖZET

Amaç: Oksidatif stres, karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarının patogeneğinde önemli rol oynar. Bu nedenle antioksidanlar karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olabilir. Bu çalışmanın amacı karaciğer iskemi/reperfüzyon modelinde α -lipoik asitin ve L-karnitin, karaciğerde total oksidan düzeyine, lipid peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna, nötrofil infiltrasyonuna ve hepatik nekroza etkilerini incelemektir.

Gereç ve Yöntemler: Wistar albino erkek sıçanlar rastgele olarak 4 gruba ayrıldı: Sham (n=7), iskemi/reperfüzyon (n=7), α -lipoik asit (n=8) ve L-karnitin (n=8). α -Lipoik asit (100 mg/kg) ve L-karnitin (100 mg/kg) sırasıyla, α -lipoik asit grubuna iskemi/reperfüzyon protokolünden 15 dakika önce ve L-karnitin grubuna 30 dakika önce intraperitoneal yoldan uygulandı. Hepatik iskemi/reperfüzyon oluşturmak için; iskemi sham grubu hariç diğer gruplara 60 dakika iskemi ve devamında 30 dakika reperfüzyon uygulandı. Karaciğerdeki total oksidan, malondialdehit, ileri protein oksidasyon ürünleri ve miyeloperoksidaz düzeyleri ölçüldü. Hepatik hasar mikroskopik olarak skorlandı.

Bulgular: Nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olan miyeloperoksidaz düzeylerinde reperfüzyon prosedürü sonrası anlamlı bir değişme yoktu. Hem L-karnitin hem de α -lipoik asit hepatik nekrozu anlamlı derecede azalttı. L-karnitin iskemi/reperfüzyon hasarında karaciğerde total oksidan düzeyi, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunda artışı önlerken, α -lipoik asit sadece lipid peroksidasyonunu önledi.

Sonuç: Sonuç olarak; α -lipoik asit ve L-karnitin iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilere sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarı, total oksidan durum, lipid peroksidasyonu, ileri oksidasyon protein ürünleri, nötrofil infiltrasyonu, α -lipoik asit, L-karnitin

Çıkar çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

ABSTRACT

Objective: Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of liver ischemia/reperfusion injury. Thus, antioxidant treatment can be protective against to liver ischemia/reperfusion injury. The aim of this study to investigate the effects of α -lipoic acid and L-carnitine on liver total oxidant status, lipid peroxidation, protein oxidation, neutrophil infiltration and hepatic necrosis in liver ischemia/reperfusion model.

Methods: Wistar albino male rats were divided into four groups randomly: Sham (n=7), ischemia/reperfusion (n=7), α -lipoic acid (n=8) and L-carnitine (n=8). α -Lipoic acid (100 mg/kg) and L-carnitine (100 mg/kg) were given intraperitoneally to α -lipoic acid group 15 minutes before and to L-carnitine group 30 minutes before ischemia/reperfusion protocol, respectively. To induce hepatic ischemia/reperfusion injury, ischemia (60 minutes) and reperfusion (30 minutes) were applied to all groups except sham group. Total oxidant status, malondialdehyde, advanced oxidation protein products and myeloperoxidase levels were measured in ischemic lobes of liver tissues. Hepatic necrosis was scored microscopically.

Results: There was no significant change in myeloperoxidase levels as an indicator of neutrophil infiltration after reperfusion procedure. Both L-carnitine and α -lipoic acid caused a significant decrease in hepatic necrosis. While L-carnitine prevents an increase in total oxidant status, lipid peroxidation and protein oxidation, α -lipoic acid prevents only an increase in lipid peroxidation of the liver in hepatic ischemia/reperfusion injury.

Conclusion: As a result; we can report that L-carnitine and α -lipoic acid have protective effects against to hepatic ischemia/reperfusion injury.

Key Words: Liver ischemia/reperfusion injury, total oxidant status, lipid peroxidation, advanced oxidation protein products, neutrophil infiltration, α -lipoic acid, L-carnitine

Conflict of Interest: Authors have no conflict of interest.

Giriş

Karaciğer cerrahisi ve transplantasyonu başta olmak üzere hemorajik, kardiyojenik ve septik şok gibi klinik durumlarda ortaya çıkan karaciğer iskem/reperfüzyon (I/R) hasarı, yüksek mortalite ve morbidite ile seyredir. İskemi sırasında karaciğerde aktive olan Kupffer hücreleri reperfüzyon sırasında reaktif oksijen türleri (ROS) ve sitokinleri salgılayarak endotelde ve hepatositlerde hasara yol açmaktadır [1,2].

Canlıların yaşamsal ve biyokimyasal fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için, antioksidanlar ve pro-oksidanlar arasında sürekli olarak kontrol edilmesi gereken bir denge vardır. Bu dengenin pro-oksidanlar lehine bozulması (oksidatif stres) oksidatif hasara yol açabilir [3]. Oksidanların tümünün belirlenmesi amacıyla, total oksidan durum (TOS) ölçümü kullanılmaktadır [4].

Oksidatif stresin artması lipid, DNA ve protein gibi biyomoleküllerin oksidatif hasarına yol açar [3]. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonunun belirteçidir [5].

Kan ve dokudaki redoks değişimleri, proteinlerin sisten kalıntıları ve disülfid bağları gibi hassas bölgelerini etkileyerek tersiyer yapılarının bozulmasına, buna bağlı olarak proteinlerin proteolize ve oksidatif hasara yatkınlıklarının artmasına ve işlevlerini kaybetmesine yol açmaktadır. ROS'un proteinlerle etkileşimi sonucunda oluşan ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) proteinlerdeki oksidatif hasarı göstermektedir [6,7].

Reperfüzyonun başlamasıyla karaciğere nötrofil geçişi artmakta, aktive olmuş bu nötrofiller ROS ve çeşitli proteazlar salgılayarak hasara katkıda bulunmaktadır [8]. Miyeloperoksidaz (MPO) enzimi, nötrofillerde bulunur ve mikroorganizmalara karşı savunmada önemli rol oynar. Karaciğer dokusunda, MPO ekspresyonunun sadece nötrofillerde olduğu gösterilmiş olup, karaciğer dokusu MPO düzeyi, nötrofil infiltrasyonunun belirteci olarak kullanılmaktadır [9].

α -Lipoik asit, bitkilerin ve hayvanların mitokondrisinde, oktanoik asit ve sisteinden sentezlenir. Vücutta piruvat dehidrojenaz ve α -ketoglutarat dehidrojenaz enzimlerinin kofaktörü olarak rol oynar. α -Lipoik asidin hem indirgenmiş hem de okside formlarının antioksidan özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir [10].

L-Karnitin (L- β -hidroksi- γ -N-trimetil aminobütirik asit), S-adenozil metiyonin aracılığı ile proteine bağlı lizil kalıntılarının metilasyonu ile karaciğer ve böbrekte sentez edilir. Uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriyal membrandan açıl karnitin esterleri olarak geçişine yardımcı olarak bir mekik görevi görmektedir [11]. L-karnitin, serbest yağ asitlerinin β -oksidasyon için mitokondriye taşınmasını sağlayarak, lipid peroksidasyonunu ve ROS'un oluşumunu önler [12]. L-karnitinin oksidatif strese bağlı oluşan protein oksidasyonunu önlemede de kısmen başarılı olduğu gösterilmiştir [13,14]. Bu çalışmanın amacı karaciğer I/R hasarı oluşturulan sıçanlarda L-karnitin ve α -lipoik asitin, karaciğerde total

oksidan duruma, lipid peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna ve nötrofil infiltrasyonuna etkilerini incelemektir. Bu amaçla, Wistar sıçanlarda karaciğer iskem/reperfüzyon hasarı oluşturulmadan önce uygulanan L-karnitin veya α -lipoik asit tedavilerinin karaciğer dokusunda TOS, MDA, AOPP ve MPO düzeylerine etkisi incelenmiştir.

Gereç ve Yöntemler

Üniversitemiz yerel etik kurul onayı alındıktan sonra (2007/05), ağırlıkları 194-250 g arasında değişen, standart koşullarda yetiştirilen erişkin erkek Wistar sıçanlar Deney Hayvanları Birimi'nden temin edildi. Sıçanlar bazal diyet ile beslendiler. 22 ± 2 °C oda ısısı, %55 nem oranı, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ritim sağlandı. Çalışmada 30 adet sıçan rastgele olarak sham (n=7), iskem/reperfüzyon (I/R) (n=7), α -lipoik asit (n=8) ve L-karnitin (n=8) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Sıçanlar cerrahi uygulamalardan önce ksilazin (10 mg/kg) ve ketamin (50 mg/kg) kullanılarak anestezi altına alındı.

İskem/reperfüzyon, α -lipoik asit ve L-karnitin gruplarındaki sıçanların karın bölgeleri insizyonla açılıp, karaciğer görünür hale getirilerek sol lateral karaciğer lobu pedikülünden silikon kurdele ile turnike uygulanarak 60 dakika boyunca iskem oluşturuldu. Ardından 30 dakika reperfüzyon yapıldı. α -Lipoik asit grubundaki sıçanlara cerrahi işlem başlatılmadan 15 dakika önce tek doz 100 mg/kg α -lipoik asit intraperitoneal (ip) yoldan uygulandı [15]. L-karnitin grubuna da cerrahi işlemden 30 dakika önce tek doz 100 mg/kg L-karnitin ip yoldan uygulandı [16]. Serum fizyolojik uygulanan sham grubuna sadece laparotomi yapıldı, karın bölgeleri diğer gruplarla eşit sürede açık bırakıldı. İşlem süresince sıçanların vücut sıcaklıkları 37°C'de tutuldu ve hiçbir grupta ölüm meydana gelmedi. Reperfüzyon süresinin bitiminde sıçanlar anestezi altındayken diyaframdan kalbe ulaşıldı ponksiyonla kanları alınarak sakrifiye edildi. İskem/reperfüzyon oluşturulan karaciğer lobu çıkarılarak soğuk serum fizyolojik ile yıkandı. Karaciğerlerden bir parça ayrılarak patolojik inceleme için %10 formalin solüsyonuna konuldu.

Karaciğer TOS, MDA, AOPP ve MPO analizleri için porsiyonlara ayrılan doku örnekleri analiz gününe dek -80°C'de saklandı.

Karaciğer TOS ölçümü, örnekteki oksidanların ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonlara okside etmesi ve oluşan ferrik iyonların asidik ortamda kromojen madde ile renk oluşturması esasına dayanan Erel'in metodu ile yapıldı [4]. Sonuçlar doku protein miktarına oranlanarak nmol H₂O₂ ekivalan (Eq)/mg protein olarak verildi.

Karaciğer dokusu MDA düzeyleri 0.15M KCl içinde hazırlanan 1/10 (w/v)'luk homojenatta Ohkawa ve ark. [17] tanımladığı spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Sonuçlar, MDA'nın 532 nm'deki molar absorpsiyon derecesi kullanılarak hesaplandı ve nmol MDA/mg protein olarak ifade edildi.

Karaciğer dokusunda AOPP düzeyleri, fosfat tamponu

içinde hazırlanan 1/10 (w/v)'luk homojenatta Witko-Sarsat ve ark. [18] tanımladığı spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Doku MPO düzeyleri, 200 mM NaCl, 10 mM Tris, 5mM EDTA, 1 mM PMSF, % 10 gliserol ve 28 µg/mL aprotinin içeren lizis tamponu ile hazırlanan 1/20 (w/v)'lik karaciğer homojenatında ticari ELİSA kiti (Nortwest, Vancouver, WA) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar ng/mg protein olarak ifade edildi.

Doku protein düzeyleri ise Lowry ve ark. [19] tanımladığı metotla ölçüldü.

Histopatolojik değerlendirme % 10'luk formalin solüsyonunda fikse edilen karaciğer dokularından hazırlanan kesitler Hematoksilen Eosin ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu ile incelenerek gerçekleştirildi. Grupların mikroskobik görüntüleri; nekroz yok (0), minimal derecede nekroz (1) ve orta derecede nekroz (2) olarak skorlandı [20] ve mikroskobik skorlarının yüzde dağılımı olarak ifade edildi.

Gruplar arasındaki farklılıklar, her bir gruptaki dağılım normal ve grupların varyansları homojen ise tek yönlü varyans analizi ile bu koşulların herhangi birinin sağlanmadığı durumlarda ise Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi. Varyans analizleri ile gruplar arasında farklılık olduğu tespit edilen parametrelerde çoklu karşılaştırma testi olarak Bonferroni ya da Dunn post-hoc testleri kullanıldı. Gruplara ait nekroz skorları açısından fark bulunup bulunmadığı pearson kıkare testi ve iki örneklem Kolmogorov Simirnov testi ile değerlendirildi. Elde edilen değerler ortalama±standart sapma (ort.±SS) olarak ifade edildi ve p<0.05'in altındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Grupların karaciğer dokusu TOS, MDA, AOPP ve MPO değerleri Tablo 1'de sunulmuştur.

İskemi/reperfüzyon grubunun doku TOS değerleri, sham ve L-karnitin gruplarından anlamlı derecede yüksekti (her ikisi için p<0.05). İ/R grubu ile α-lipoik asit grubu arasında TOS değerleri bakımından anlamlı fark yoktu.

İskemi/reperfüzyon grubunun karaciğer MDA değeri, sham grubuna göre anlamlı derecede yüksekti (p<0.05). α-Lipoik asit ve L-karnitin tedavi gruplarının MDA değeri İ/R grubuna göre anlamlı derecede düşüktü (p<0.05).

Doku AOPP değerleri İ/R, α-lipoik asit ve L-karnitin gruplarında sham grubuna göre yüksekti (sırasıyla p<0.001, p<0.05 ve p<0.05). L-karnitin grubunun AOPP değeri İ/R grubuna göre anlamlı olarak düşüktü (p<0.05).

Sham, İ/R, α-lipoik asit ve L-karnitin gruplarının doku MPO değerleri arasında anlamlı fark yoktu.

Tüm gruplardan birer sıçanın karaciğer dokusu mikroskobik görüntüleri Şekil 1'de görülmektedir. Grupların karaciğer dokularının mikroskobik skorlarının yüzde dağılımı Tablo 2'de verilmiştir.

Tüm gruplar bir arada değerlendirildiğinde patolojik değişimin anlamlı olduğu gözlemlendi ($\chi^2=31.61$, p<0.001). Gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında İ/R grubundaki mikroskobik skorlar sham, α-lipoik asit ve L-karnitin gruplarından anlamlı olarak farklıydı (p<0.05). Sham, α-lipoik asit ve L-karnitin gruplarının mikroskobik skorları arasında anlamlı fark yoktu.

Tablo 1. Sham, İ/R, α-lipoik asit ve L-karnitin gruplarının karaciğer dokusu TOS, MDA, AOPP ve MPO (Ort±SS) değerleri.

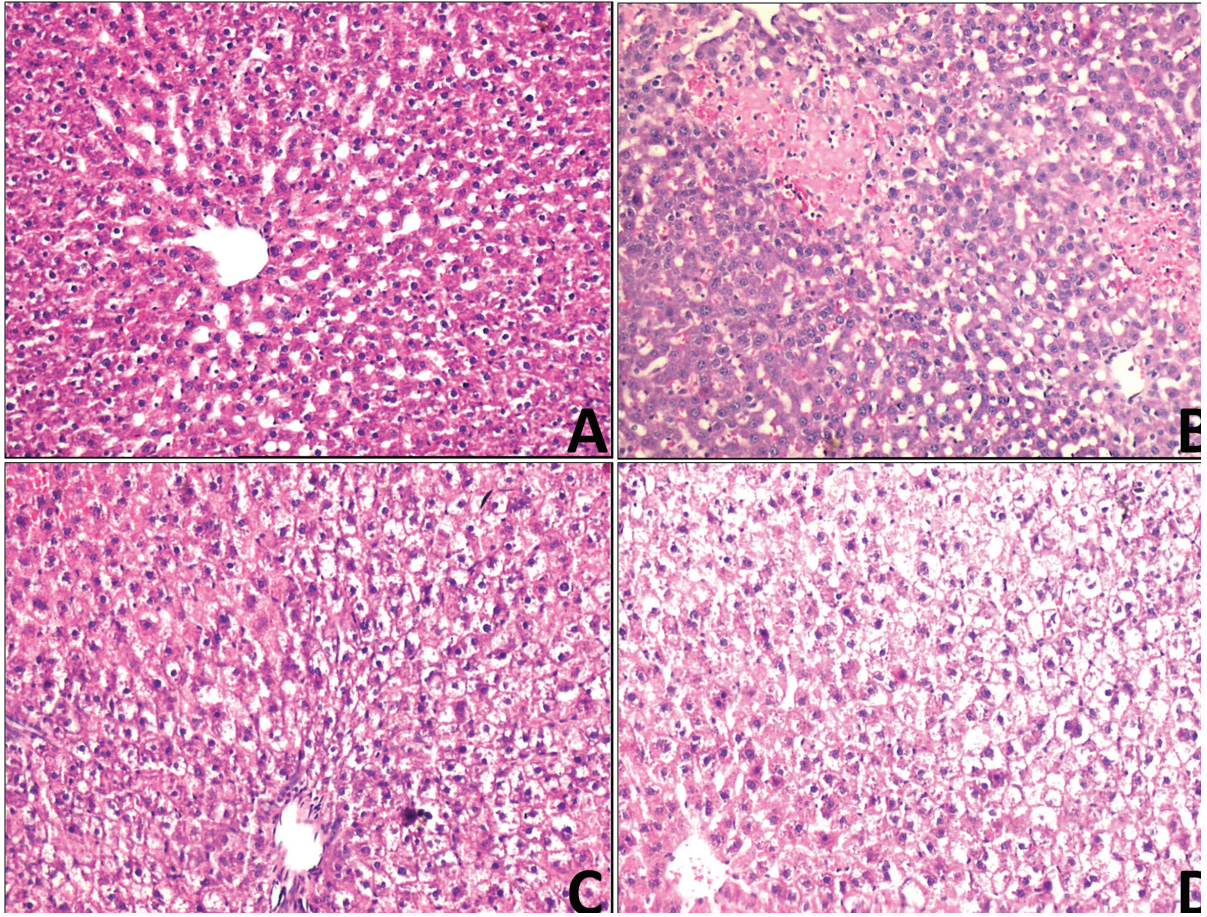
Gruplar	Sham (n=7)	İ/R (n=7)	α-Lipoik asit (n=8)	L-karnitin (n=8)	p
TOS (nmol H ₂ O ₂ Eq /mg protein)	1.27±0.15	1.69±0.08 ^b	1.49±0.06	1.40±0.15 ^a	<0.001
MDA (nmol/mg protein)	8.03±1.78	11.56±1.75 ^b	8.73±1.31 ^a	8.44±1.73 ^a	<0.05
AOPP (nmol/mg protein)	43.15±13.18	83.63±16.56 ^c	67.86±12.93 ^b	63.07±8.23 ^{ab}	<0.001
MPO (ng/mg protein)	1.63±0.36	2.49±0.94	1.92±0.56	1.77±0.93	AD

AD: Anlamlı değil

a: p<0.05 İ/R grubuna göre karşılaştırıldığında.

b: p<0.05 Sham grubuna göre karşılaştırıldığında.

c: p<0.001 Sham grubuna göre karşılaştırıldığında.



Şekil 1. Gruplara ait karaciğer dokusu mikroskopik görüntüleri

A) Sham grubuna ait düzenli karaciğer dokusunda portal aralıklar ve lobulusları düzenli yapıda izlenmektedir. İnflamasyon veya konjesyon yoktur. B) L-Karnitin grubunda ve C) α-Lipoik asit grubunda karaciğer lobuluslarda ödem ve çok seyrek mononükleer iltihabi hücreler mevcuttur. D) I/R grubunda santral ven çevresinde hepatositlerde nekroz ve L-karnitin ve α-lipoik asit gruplarına göre daha yoğun mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu görülmektedir.

Tablo 2. Grupların karaciğer dokularının mikroskopik skorları (%).

Nekroz derecesi	Sham (n=7)	İ/R (n=7)	α-Lipoik asit (n=8)	L-karnitin (n=8)	p
0 (Nekroz yok)	100	14.3	50	50	p<0.001
1 (Minimal nekroz)	0	0	50	50	
2 (Orta dereceli nekroz)	0	85.7	0	0	

Tartışma

Reaktif oksijen türleri, karaciğer İ/R hasarının patofizyolojisinde önemli rol oynar. Antioksidan savunma sistemi, çeşitli mekanizmalarla ROS oluşumunu kontrol altında tutar. Bu açıdan antioksidanlar karaciğer İ/R hasarının önlenmesinde etkili olabilir [1,21].

Karaciğer İ/R hasarında protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonunun yanı sıra oksidanların tümünün değerlendirilmesi amacıyla karaciğer TOS düzeyleri ölçüldü. Daha önce yapılan çalışmalar İ/R modelinde TOS düzeylerinin arttığını göstermiştir [22,23]. Çalışmamızda da İ/R grubunun TOS değerleri sham grubuna göre

anlamli olarak artmisti. Bu bulgumuz karaciğer İ/R hasarında oksidanların miktarında artış olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu artış, çalışmamızda görülen lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonundaki artıştan sorumlu olabilir.

Literatürde karaciğer İ/R hasarında α -lipoik asit ve L-karnitin tedavilerinin TOS düzeyine etkisini gösteren bir çalışmaya rastlamadık. Ancak bir çalışmamızda deneysel kolit öncesi tek doz 500 mg/kg L-karnitin serum TOS düzeyini azalttığını tespit etmiştik [24]. L-karnitin tedavisi karaciğer İ/R hasarında TOS düzeyini anlamli olarak azaltırken, α -lipoik asit tedavisi TOS düzeyini azaltmasına rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamli değildi. Bu bulgular, karaciğer İ/R hasarı öncesinde uygulanan 100 mg/kg L-karnitin oksidan miktarlarındaki artışı engellediğini, aynı dozda uygulanan lipoik asit tedavisinin ise artışı önlemede yetersiz kaldığını göstermektedir.

Reperfüzyon hasarının en önemli nedeni, artan serbest radikallerin plazma ve organel membranları üzerinde başlattıkları lipid peroksidasyonudur [25]. Karaciğer İ/R modelinde karaciğer MDA düzeylerinin arttığı gösterilmiştir [26,27]. Çalışmamızda İ/R grubunun karaciğer MDA düzeyi sham grubuna göre anlamli derecede artmıştı. Bu bulgumuz literatürü destekler nitelikte olup, karaciğer İ/R modelinde lipid peroksidasyonunun arttığını göstermektedir. Antioksidan tedavinin İ/R modelinde karaciğer MDA düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. İskemi oluşturulmadan 2 saat önce, iskemi oluşturulmadan hemen önce ve reperfüzyon aşamasından önce verilen tek doz 200 mg/kg L-karnitin tedavisinin karaciğer MDA düzeylerini azalttığı gösterilmiştir [28]. Karaciğer İ/R modelinde 15 dakika önce uygulanan 100 mg/kg α -lipoik asitin karaciğer MDA düzeylerini kontrol seviyelerine düşürdüğü bildirilmiştir [29]. Çalışmamızda, α -lipoik asit ve L-karnitin tedavileri karaciğer MDA düzeylerini İ/R grubuna göre anlamli derecede azalttı. Bu bulgumuz literatürle uyumlu olup, İ/R oluşturulmadan önce uygulanan 100 mg/kg dozundaki hem α -lipoik asit hem de L-karnitin tedavileri İ/R hasarı sırasında oluşan lipid peroksidasyonunu engellemektedir. α -Lipoik asitin TOS ve AOPP düzeyinde anlamli bir azalma yapmaksızın lipid peroksidasyonunda azalmaya yol açması etki mekanizmasının lipidler üzerinden olduğunu düşündürmektedir.

Literatürde karaciğer İ/R hasarında α -lipoik asitin karaciğer çoklu doymamış yağ asidi üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlamadık ancak Huong ve ark. sağlıklı sıçanlarda diyet eklenen α -lipoik asitin karaciğerde lipogenez ve karaciğer lipid düzeylerini azalttığını bildirmişlerdir [30]. Aynı zamanda başka bir çalışmada α -lipoik asit tedavisinin çoklu doymamış yağ asidi ile indüklenen karaciğer yağlanması, fibrosis gelişimi, inflamasyon ve apoptosis üzerine yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir [31]. Literatürdeki bu bilgilerin ışığında α -lipoik asitin lipid peroksidasyonu üzerindeki azaltma mekanizmasının karaciğerdeki lipogenez baskılaması ile ilişkili olabileceği akla gelmektedir.

İskemi/reperfüzyon hasarında artmış oksidatif stres sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir [25]. Protein oksidasyonu AOPP oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Karaciğer İ/R hasarında karaciğerde protein oksidasyonunun arttığı farklı belirteçler ile gösterilmiştir [32,33]. AOPP reseptörlerinin karaciğer İ/R hasarında mortalite oranı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [34], ancak literatürde karaciğer İ/R hasarında AOPP düzeylerinin ölçüldüğü bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızda, karaciğer İ/R hasarı oluşturulan gruplarda karaciğer AOPP düzeyleri sham grubuna göre anlamli olarak artmıştı. Bu bulgumuz karaciğer İ/R hasarında protein oksidasyonun son ürünü olan AOPP düzeylerinin arttığını göstermektedir. L-karnitin tedavisinin diyabet modelinde karaciğer AOPP düzeylerini diyabet grubuna göre anlamli olmasa da düşürdüğünü önceki bir çalışmamızda göstermiştik [14]. Çalışmamızda L-karnitin uygulanan grupta AOPP düzeyi İ/R grubuna göre anlamli derecede düşüktü. Bu açıdan L-karnitin karaciğer İ/R hasarında protein oksidasyonunu önlemede etkili olduğu söylenebilir.

Çalışmamızda, α -lipoik asit grubunda karaciğer AOPP düzeyleri İ/R grubuna göre azalmış olmasına rağmen aralarında anlamli fark yoktu. Lipoik asitin TOS düzeyindeki artışı da önleyememesi bu bulgumuzla uyumlu olup tek doz 100 mg/kg α -lipoik asit tedavisinin karaciğer İ/R hasarında artan protein oksidasyonunu önlemede yetersiz kaldığı söylenebilir. Oysa, Dulundu ve ark. [29] 45 dk. iskemi ve 60 dk. reperfüzyon öncesi 100 mg/kg α -lipoik asit uygulamasının karaciğerdeki oksidatif hasara karşı koruyucu olabileceğini bildirmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak çalışmamızda iskemi süresinin 60 dk. olması, α -lipoik asitin TOS ve AOPP düzeyindeki artışı engellemesinde yetersiz kalmasına yol açmış olabilir. Daha uzun iskemi süresi, İ/R hasarında ROS oluşumunun ana kaynağı olan Kupffer hücre aktivasyonunu (2) arttırmış ve artan oksidatif strese karşı 100 mg/kg α -lipoik asit dozu yetersiz kalmış olabilir.

Miyeloperoksidaz normal ve inflamasyonlu karaciğerde sadece nötrofillerden salınmaktadır [9]. Karaciğer İ/R hasarında nötrofil infiltrasyonunun reperfüzyon aşamasının 2. saatinden sonra belirginleştiği bildirilmiştir [1]. İ/R grubunun karaciğer MPO düzeyleri diğer gruplara göre artmış olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamli fark yoktu. Bu açıdan bulgumuz literatürü destekler nitelikte olup çalışmamızdaki 30 dakikalık reperfüzyon sonrası nötrofil infiltrasyonunun tam olarak gerçekleşmediğini göstermektedir.

Karaciğer dokularının mikroskopik incelenmesinde elde edilen sonuçlara göre kontrol grubunda hiçbir sıçanın karaciğerinde nekroz görülmezken iskemi grubunda %85.7 oranında orta derecede nekroz görülmesi modelimizin başarıyla gerçekleştiğinin göstergesidir. Ayrıca α -lipoik asit ve L-karnitin gruplarında bazı hayvanlarda sadece minimal nekroz gözlenmesi bu tedavilerin İ/R hasarına karşı koruyucu etkisi olduğunun göstergesidir.

Duenschede ve ark. [15] İ/R hasarından 15 dakika önce uygulanan α -lipoik asitin karaciğeri koruyucu etkisi olduğunu ve karaciğerin yenilenmesini hızlandırdığını bildirmişlerdir. Atilla ve ark. [35] ise İ/R hasarından 3 saat önce 200 mg/kg L-karnitin uygulanmasının İ/R sırasında oluşan hepatosit hasarını azalttığını bildirmişlerdir.

Sonuç olarak çalışmamızda, karaciğer İ/R hasarı oluşturulan sıçanlarda 30 dakikalık reperfüzyon aşaması nedeniyle belirgin bir nötrofil infiltrasyonu gözlenmemekle birlikte, L-karnitin tedavisi, İ/R hasarı sonrası karaciğerde lipid peroksidasyonundaki, protein oksidasyonundaki, total oksidan durumdaki artışı ve nekrozu azalttı. α -Lipoik asit tedavisi ise lipid peroksidasyonu ve nekrozu azaltmasına rağmen protein oksidasyonu ve total oksidan durumdaki artışı engellemede yetersiz kaldı. Bu açıdan 100 mg/kg L-karnitin tedavisinin karaciğer İ/R hasarını önlemede etkili olduğunu söyleyebiliriz. Diğer yandan çalışmamız, α -lipoik asit tedavisinin kısmen faydalı olabileceğini göstermekle birlikte bu modelde 100 mg/kg tedavi dozunun yetersiz olabileceğini de düşündürmektedir.

Çıkar çatışması: Yazarların çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynaklar

- [1] Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, Davidson BR, Seifalian AM. The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: a review. *Liver Transpl* 2005; 11(9):1031-47.
- [2] Zhang W, Wang M, Xie HY, Zhou L, Meng XQ, et al. Role of reactive oxygen species in mediating hepatic ischemia-reperfusion injury and its therapeutic applications in liver transplantation. *Transplant Proc* 2007; 39(5):1332-7.
- [3] Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002; 30(6):620-50.
- [4] Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005; 38(12):1103-11.
- [5] Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005; 15(4):316-28.
- [6] Kayalı R, Çakatay U. Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. *Cerrahpaşa J Med* 2004; 35:83-9.
- [7] Nelson DL, Cox MM. In *Lehninger Principles of Biochemistry* 2008; p. 140-1, 5th Ed., W. H. Freeman and Company, New York.
- [8] Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2008; 147(1):153-9.
- [9] Amanzada A, Malik IA, Nischwitz M, Sultan S, Naz N, et al. Myeloperoxidase and elastase are only expressed by neutrophils in normal and in inflamed liver. *Histochem Cell Biol* 2011; 135(3):305-15.
- [10] Golbidi S, Badran M, Laher I. Diabetes and alpha lipoic Acid. *Front Pharmacol*. 2011; 2:69.
- [11] Mingrone G. Carnitine in type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1033:99-107.
- [12] Görür S, Bağdatoğlu OT, Polat G. Protective effect of L-carnitine on renal ischaemia-reperfusion injury in the rat. *Cell Biochem Funct* 2005; 23(3):151-5.
- [13] Sayılan Özgün G, Eskioçak S, Süt N. Diyabetik sıçanlarda L-karnitin protein oksidasyonu üzerine etkisi. *Turk J Biochem* 2010; 35(3):183-89.
- [14] Sayılan Özgün G, Eskioçak S, Süt N. Diyabetik sıçanlarda L-karnitin karaciğer protein oksidasyonu üzerine etkisi. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2012; 10(1):21-8.
- [15] Duenschede F, Erbes K, Kircher A, Westermann S, Schad A, et al. Protection from hepatic ischemia/reperfusion injury and improvement of liver regeneration by alpha-lipoic acid. *Shock* 2007; 27(6):644-51.
- [16] Yonezawa K, Tolba RH, Wetter A, Yamamoto Y, Yamaka Y, et al. L-carnitine could not improve hepatic warm ischemia-reperfusion injury despite ameliorated blood flow. *J Surg Res* 2005; 125(1):16-22.
- [17] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2):351-8.
- [18] Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49(5):1304-13.
- [19] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265-75.
- [20] Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation* 1993; 55(6):1265-72.
- [21] Jaeschke H, Woolbright BL. Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. *Transplant Rev (Orlando)* 2012; 26(2):103-14.
- [22] Yıldız F, Coban S, Terzi A, Ates M, Aksoy N, et al. Nigella sativa relieves the deleterious effects of ischemia reperfusion injury on liver. *World J Gastroenterol* 2008; 14(33):5204-9.
- [23] Sözen S, Kisakürek M, Yıldız F, Gönültaş M, Dinçel AS. The effects of glutamine on hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *Hippokratia* 2011; 15(2):161-6.
- [24] Özgün E, Sayılan Özgün G, Eskioçak S, Yalçın Ö, Süer Gökmen S. Deneysel kolitte L-karnitin serum paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktivitelere ve oksidatif duruma etkisi. *Turk J Biochem* 2013; 38(2):145-53.
- [25] Akkoç H. Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Dicle Med J* 2008; 35(3):211-15.
- [26] Morsy MA. Protective effect of lisinopril on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Indian J Pharmacol* 2011; 43(6):652-5.
- [27] Wang J, Kan Q, Li J, Zhang X, Qi Y. Effect of neferine on liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Transplant Proc* 2011; 43(7):2536-9.
- [28] Canbaz H, Akca T, Tataroglu C, Caglikulekci M, Dirlık M, et al. The effects of exogenous L-carnitine on lipid peroxidation and tissue damage in an experimental warm hepatic ischemia-reperfusion injury model. *Curr Ther Res* 2007; 68 (1): 32-46.
- [29] Dulundu E, Ozel Y, Topaloglu U, Sehırlı O, Ercan F, et al. Alpha-lipoic acid protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Pharmacology* 2007; 79(3):163-70.
- [30] Huong DT, Ide T. Dietary lipoic acid-dependent changes in the activity and mRNA levels of hepatic lipogenic enzymes in rats. *Br J Nutr*. 2008; 100(1):79-87.
- [31] Kaya-Dagistanlı F, Tanrıverdi G, Altınok A, Ozyazgan S, Öztürk M. The effects of alpha lipoic acid on liver cells damages and apoptosis induced by polyunsaturated fatty acids. *Food Chem Toxicol* 2013; 53:84-93.
- [32] Sener G, Tosun O, Sehırlı AO, Kaçmaz A, Arbak S, et al.

Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sci* 2003; 72(24):2707-18.

- [33] Lanteri R, Acquaviva R, Di Giacomo C, Caltabiano R, Li Destri G, et al. Heme oxygenase 1 expression in postischemic reperfusion liver damage: effect of L-arginine. *Microsurgery* 2006; 26(1):25-32.
- [34] Zeng S, Dun H, Ippagunta N, Rosario R, Zhang QY, et al. Receptor for advanced glycation end product (RAGE)-dependent modulation of early growth response-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Hepatol* 2009; 50(5):929-36.
- [35] Atila K, Coker A, Sagol O, Coker I, Topalak O. Protective effects of carnitine in an experimental ischemia-reperfusion injury. *Clin Nutr* 2002; 21(4):309-13.