

T. C.  
SAĞLIK BAKANLIĞI  
HAYDARPAŞA NUMUNE  
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

**RATLARDA KARACİĞER İSKEMİ/REPERFÜZYON  
HASARINDA GRAPE SEED PROANTHOCYANİDİNİN  
KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Dr. YAHYA ÖZEL  
UZMANLIK TEZİ

5. GENEL CERRAHİ KLİNİĞİ

İSTANBUL – 2006

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen V. Genel Cerrahi Klinik Őefi Sayın Doç. Dr. Ümit TOPALOđLU, I. Genel Cerrahi Klinik Őefi Sayın Doç. Dr. M.İzzet TİTİZ, II. Genel Cerrahi Klinik Őefi Sayın Doç. Dr. NeŐet KÖKSAL, III. Genel Cerrahi Klinik Őefi Sayın Op. Dr. Yılmaz USER ve IV. Cerrahi Klinik Őefi Sayın Prof. Dr. Abdullah SAđLAM'a, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Klinikleri'nde görevli uzmanlarıma ve asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dr. Yahya ÖZEL

# İÇİNDEKİLER

## TEŞEKKÜR

### 1. ÖZET

### 2. GİRİŞ ve AMAÇ

### 3. GENEL BİLGİLER

#### 3.1. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARININ FİZYOPATOLOJİSİ

##### 3.1.1. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN ROLÜ

##### 3.1.2. KOMPLEMANIN RÖLÜ

##### 3.1.3. ENDOTELİN ROLÜ

##### 3.1.4. LÖKOSİTLERİN ROLÜ

#### 3.2. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNE KARŞI DOĞAL SAVUNMA MEKANİZMALARI

#### 3.3. PROANTHOCYANİDİNLER

##### 3.3.1. PROANTHOCYANİDİNLERİN ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİ

##### 3.3.2. PROANTHOCYANİDİNLER VE FARMAKOKİNETİK

##### 3.3.3. PROANTHOCYANİDİNLER VE TOKSİSİTE

### 4. MATERYAL VE METOD

#### 4.1. KİMYASAL İLAÇLAR

#### 4.2. HAYVANLAR VE TEDAVİLERİ

#### 4.3. BİYOKİMYA

##### 4.3.1. TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR ALFA (TNF – $\alpha$ )

##### 4.3.2. MALONDİALDEHİT (MDA)

##### 4.3.3. GLUTATYON (GSH)

##### 4.3.4. MYELOPEROKSİDAZ (MPO)

### 5. İSTATİSTİK USULU

### 6. SONUÇLAR

#### 6.1. ASPARTAMİNOTRANSAMİNAZ (AST), ALANİNAMİNOTRANSAMİNAZ (ALT) ve LAKTAT DEHİDROGENAZ (LDH)

#### 6.2. TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR ALFA (TNF – $\alpha$ )

#### 6.3. GLUTATYON (GSH)

#### 6.4. MALONDİALDEHİT (MDA)

#### 6.5. MYELOPEROKSİDAZ (MPO)

### 7. TARTIŞMA

### 8. KAYNAKLAR

## 1. ÖZET

Bu çalışmada karaciğerde iskemi/reperfüzyonun (İ/R) neden olduğu hasarın bazı biokimyasal parametreler üzerinden değerlendirilmesi ve grape seed proanthocyanidin ekstresi (GSPE) uygulamasının bu parametrelerde oluşabilecek değişikliklere etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla Wistar Albino ratlarda karaciğer dokusunda, orta ve sol loblara 45 dakika süreyle hepatik iskemi oluşturuldu, takiben 1 saat reperfüzyona bırakıldı. GSPE 50mg/kg uygulanan hayvanlarda ilaç iskemiden 30 dakika ve reperfüzyondan hemen önce intraperitoneal olarak uygulandı. Deney sonunda hayvanlar dekapite edilerek kan ve doku örnekleri alındı.

Karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmek amacıyla serumda aspartataminotransaminaz (AST), alaninaminotransaminaz (ALT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) seviyeleri ölçüldü. Doku örneklerinde glutatyon (GSH), malondialdehid (MDA), myeloperoksidaz (MPO) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF -  $\alpha$ ) ölçümleri yapıldı.

45 dakikalık iskemi ve 1 saatlik reperfüzyon sonunda karaciğer GSH düzeyleri anlamlı derecede azalırken, GSPE uygulaması bu azalmayı anlamlı olarak önlemiştir. MDA, MPO ve TNF- $\alpha$  değerlerinde ise İ/R sonucunda artış gözlenmiştir. Bu değerlerdeki artış seviyesi GSPE uygulaması ile azalmıştır.

AST, ALT ve LDH düzeylerinde İ/R sonucunda gözlenen artış da GSPE uygulaması ile önlenmiştir.

Bu bulgulara bakarak, GSPE teavisinin karaciğerde İ/R olayları sonucu ortaya çıkabilecek serbest radikal aracılı organ hasarı ve disfonksiyonunu önleyerek morbidite ve mortaliteyi önemli oranda azaltabileceği düşünülmektedir.

## 2. GİRİŞ ve AMAÇ

İskemi, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının dolaşım tarafından sağlanamaması ve oluşan artık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması olarak tanımlanır.<sup>1</sup> Reperfüzyon ise bu iskemik dokudaki kan dolaşımının yeniden sağlanmasıdır. İskemik bir dokunun reperfüzyonu dokunun oksijen ve diğer metabolik ihtiyaçlarını karşılarken paradoksal olarak dokularda hasar oluşturur.<sup>2</sup> Bir dokuda iskemi ve reperfüzyon sonucu oluşan hasar, dokunun aynı toplam sürede sadece iskemiyeye maruz kalması sonucu oluşan hasardan daha fazladır.<sup>3</sup>

İskemik dokunun reperfüzyonu sonrası gördüğü hasar akciğer, böbrek, karaciğer, kalp, beyin ve barsaklar gibi pek çok organda ayrıntılı olarak araştırılmıştır.<sup>4-5-6-7</sup> Ancak yine de İ/R hasarının fizyopatolojisi tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. İ/R hasarında serbest radikallerin oluşumu, polimorf nüveli lökositlerin aktivasyonu, endotel ve kompleman sistemi gibi major komponentlerin rol oynadığı bilinmektedir.<sup>8-9</sup> Bu tablo lokal ve sistemik inflamatuvar cevabın başlamasına yol açarak lokal ve uzak organlarda da hasar oluşturmaktadır.

Günlük uygulama içerisinde İ/R tıbbın pek çok alanında karşılaşılan bir olaydır. Şok, yanık, sepsis, pankreatit, serebrovasküler olaylar, miyokard infarktüsü, travma ve travma cerrahisi, ortopedik cerrahi, kardiyovasküler cerrahi, transplantasyon cerrahisi ve genel cerrahi İ/R olayının görüldüğü durumlardan sadece bazılarıdır. Pratikte bütün cerrahi işlemler sırasında dokuların iskemisi ve bunu takiben bir reperfüzyon periyodu vardır. Karaciğer İ/R hasarı ise karaciğer transplantasyonu ve hepatik rezeksiyon sırasında uygulanan pringle manevrası, veya hemorajik şok sonrasında görülen primer hepatik disfonksiyon veya yetmezlikten sorumludur.

Bu çalışmada orta ve sol lob hepatik arterler, portal ven ve safra yolları düzeyinde uygulanan İ/R sonucu oluşan karaciğer hasarına; güçlü serbest radikal süpürücü ve antioksidan olan GSPE' nin muhtemel koruyucu etkileri incelendi.

### 3. GENEL BİLGİLER

#### 3.1. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARININ FİZYOPATOLOJİSİ

İ/R sonrası dokularda mikrovasküler fonksiyon bozukluğu gelişir. Arteriyollerde endotele bağımlı dilatasyon bozulur. Kapillerlerde lokosit tıkaçları oluşur, sıvı filtrasyonu artar. Postkapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına çıkması ve lokositlerin hareketliliği başlar. Mikrosirkülasyonun bütün segmentlerinde aktive olan endotel hücreleri daha fazla serbest oksijen radikalleri (SOR) ve daha az nitrik oksit (NO) üretir. Endotel hücrelerinde süperoksit radikali ve nitrik oksit arasındaki dengesizlik inflamatuvar mediyatörlerin üretim ve salınımına öncülük ederken adhezyon moleküllerinin biyosentezini de artırır.<sup>9</sup>

Uzamış iskemi hücrede metabolik ve yapısal değişikliklere neden olur. İskemi nedeniyle hücresel oksidatif fosforilasyon azalır. Hücre membranında adenosin trifosfat (ATP) bağımlı iyon pompası fonksiyonunun bozulması sonucu hücre içine kalsiyum (Ca<sup>++</sup>), sodyum (Na<sup>+</sup>) ve su girişi artar. İskemi sırasında adenin nükleotid katabolizması sonucu hücre içine hipoksantin birikir. Bu arada endotelde bazı proinflamatuvar ürünlerin (lökosit adhezyon molekülleri, sitokinler) ve biyoaktif ajanların (endotelin, tromboksan A2) yapımı artarken, diğer bazı koruyucu ürünlerin (yapısal nitrikoksit sentaz, trombomodulin) ve biyoaktif ajanların (prostosiklin, NO) yapımı baskılanır. Böylece iskemi, daha sonraki reperfüzyon döneminde doku zedelenebilirliğini arttıran proinflamatuvar bir durum başlatır.

İskemik dokuların reperfüzyonu ile iskeminin şiddetine ve süresine bağlı olarak, bir kısım hücre nekroz veya apoptozis ile ölmeye devam eder. Etkilenen dokularda sıklıkla nötrofil infiltrasyonu gözlenir. Parenkimal hücreler, endotel hücreleri ve lökositlerce SOR yapımı artar. Bu arada hasarlı mitokondrilerde oksijen yetersizliği veya alternatif yollardan oksijenin indirgenmesi ile de SOR oluşabilir. Hücresel antioksidan savunma sistemleri de iskemi nedeniyle zayıflar.

İ/R hasarının fizyopatolojisi tam olarak açığa kavuşmamış, birbiriyle ilişkileri karmaşık, hücresel ve humoral olaylar dizisidir.

Burada;

1. Serbest oksijen radikalleri

2. Kompleman

3. Endotel

4. Polimorf nüveli lökositler (PMNL), olmak üzere başlıca dört komponentten sözedilebilir.

##### 3.1.1. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN ROLÜ

Atom çekirdeğinin etrafında bulunan elektronlar 'orbit' denilen yörüngelerde hareket halindedir. Kararlı durumlarda ilk orbitte iki, diğerlerinde sekiz elektron bulunur. Bir veya daha fazla orbitinde eşlenmemiş elektron bulunan atom veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanır. Serbest radikaller kimyasal olarak kararsız yapılardır. Bu nedenle herhangi bir molekül veya atom ile etkileşime girerek, o yapıdan bir elektron alma veya bir elektron verme eğilimindedirler. Yani kimyasal olarak reaktiviteleri yüksek yapılardır.

Canlılarda SOR eksojen ve endojen, fizyolojik veya endojen patolojik mekanizmalar sonucu oluşabilir. İyonizan radyasyon ve ısı hücre içi serbest radikal oluşumuna yol açan eksojen etkenlere örnektir.

Moleküler oksijen (O<sub>2</sub>) iki tane eşleşmemiş elektronu olan biradikal bir moleküldür. Biyolojik sistemlerle ilişkili oksijen türevli serbest radikallerin başlıcaları şunlardır;

1. Süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ); 2. Peroksil radikali ( $HO_2$ ); 3. Hidroksil radikali ( $OH^-$ ); 4. NO;
5. Singlet oksijen ( $^1O_2$ ).<sup>10</sup>

Süperoksit radikalının toksisitesi biyolojik hedeflerle doğrudan reaksiyona girmesiyle oluşabilir. Ancak dokularda yaptığı etkinin çoğunu, oluşturduğu sekonder SOR aracılığı ile gerçekleştirir. Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve spontan olarak dismutasyona uğrayarak ya da süperoksid dismutaz (SOD) enzimi tarafından hidrojen peroksite ( $H_2O_2$ ) dönüştürülür.

$H_2O_2$  ise metal iyonları varlığında Fenton reaksiyonu ile oldukça toksik hidroksil radikaline döner.

Hidrojen peroksitin hücre içinde metabolizması birkaç şekilde olabilir;

1. Hidrojen peroksit, katalaz veya glutatyon peroksidaz (GPx) tarafından toksik olmayan ürünlere dönüşür.
2. Hidrojen peroksit, geçiş metallerin varlığında toksik  $OH^-$  radikaline dönüşür (Fenton reaksiyonu).

### **Serbest Radikallerin Hasar Mekanizması:**

Serbest radikaller bütün hücrel makromoleküllerle reaksiyona girebilirler. Hücrel hasar oluşumunda özellikle üç tip reaksiyon önemlidir;

**1. Lipid Peroksidasyonu:** Serbest oksijen radikalleri, plazma ve organel membranlarında lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Hidroksil radikali membran lipidleri ile çift bağ yapar ve böylece lipid-radikal etkileşimi ile zincirleme reaksiyon sonucu pek çok lipid peroksidasyon ürünü (malondialdehit, dien konjugatları gibi) oluşur. Eritrosit membranlarının, lipozomal membranların (özellikle hücre ve mitokondri) okside olması ile bu yapıların fiziksel ve kimyasal özellikleri değişir. Membranın iyon geçirgenliği bozulur. Eritrositlerde hemoliz olur. Böylece yaygın membran, organel ve hücre hasarı ortaya çıkar.

**2. Proteinlerin oksidatif modifikasyonu:** Serbest oksijen radikalleri, aminoasit yan zincirleri oksidasyonuna neden olarak protein-protein bağlarının oluşmasına yol açarlar. Ayrıca protein yapısında, ana zinciri okside ederek proteinlerin parçalanmasına neden olurlar. Böylece hücrede fonksiyonel önemi olan enzimlerde bozulmalar ortaya çıkar.

**3. DNA hasarı:** Serbest oksijen radikalleri, nükleer ve mitokondrial DNA'da timin ile reaksiyona girerek tek zincir kırılmaları oluşturur. Sonuçta hücrelerin enerji kaybetmeleriyle nekrotik tipte hücre ölümü olur.

### **3.1.2. KOMPLEMANIN RÖLÜ**

İskemi/reperfüzyon kompleman sistemini aktive eder. Kompleman aktivasyonunun başlangıç dönemi ve mekanizması halen tartışmalıdır ve tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Kompleman aktivasyonu sonucu oluşan, proinflamatuvar komponentler bir yandan lokositleri aktive ederken, diğer yandan TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 oluşumunu uyararak inflamatuvar cevabı güçlendirir.

**Tümör Nekroz Faktörü-alfa (TNF- $\alpha$ ).** Ciddi bir ameliyata bağlı doku travması veya infeksiyonlar sonucu oluşan inflamatuvar kompleks, bir proinflamatuvar sitokin döngüsünün başlamasına neden olur. Bu sitokinler arasında TNF- $\alpha$ , konakçı cevabının oluşumuna yol açan ilk ve en güçlü mediyatörlerden biridir. TNF- $\alpha$  sentezinin kaynağı, periton ve splanknik dokularda çok bulunan monositler, makrofajlar ve T hücreleridir. Kupffer hücreleri, insan vücudunda bir arada bulunan en büyük makrofaj topluluğudur. İç organlardaki cerrahi veya travmatik yaralanmalar, inflamatuvar mediyatörlerin oluşumu ve akut faz proteinlerinin yapımı gibi homeostatik cevapların oluşumunda belirgin etkiye sahiptir. Akut travmaya cevap olarak TNF- $\alpha$  salınımı hızlı ve kısa sürelidir. Endotoksin uyarısı ile akut inflamatuvar cevap gelişimini taklit eden deneylerde tümör nekroz faktörünün monofazik bir eğri izlediği, 90

dakikada pik yapıp 4 saat içinde ölçülmeyecek düzeye indiği saptanmıştır. Yarı ömrü 15 -18 dk. olmasına rağmen, TNF'nin kısa süreli ortamda bulunması bile önemli metabolik ve hemodinamik değişikliklerin gelişmesine ve döngünün ileri kısmındaki sitokinlerin aktive olmasına neden olur. TNF üretiminin kısa sürmesi, ortamda regüle edilemeyecek kadar çok TNF- $\alpha$  aktivitesinin oluşmasını engelleyen efektif endojen mediatörlerin olduğuna işaret eder. TNF yapımı ve aktivasyonunu engelleyen birçok doğal mekanizma bulunduğu gösterilmiştir. Dolaşımda transmembranöz TNF reseptörlerinin (solubl TNF reseptörleri = sTNFR) endojen inhibitörleri saptanmıştır. Bu reseptörlerin kompotetif olarak dolaşımda bulunan fazla TNF'yi sekestrize ederek koruyucu rol aldıkları sanılmaktadır. TNF- $\alpha$  ayrıca, stres sırasındaki adale katabolizması ve kaşeksi üzerine de önemli etkileri olan bir sitokindir. İskelet hücrelerinden mobilize olan aminoasitler hepatik dolaşımdaki siklüsler aracılığı ile enerji metabolizmasında kullanılırlar. TNF- $\alpha$ 'nın diğer fonksiyonları arasında; koagülasyonun aktivasyonu, prostaglandin E2, platelet aktive edici faktör (PAF), glukokortikoidler ve eikozanoidlerin salınımının arttırılması sayılabilir.

### 3.1.3. ENDOTELİN ROLÜ

İyon ve organik moleküllere geçirgenlikte bariyer oluşturması, prostoglandinlerin dolaşımdan kısmen uzaklaştırılması, akciğerlerde Anjiotensin I'in Anjiotensin II'ye dönüştürülmesi ve koagülasyondaki rolü, endotel hücrelerinin bilinen klasik görevlerindedir. Endotel hücrelerinin yukarda sayılan işlevlerine ek olarak, vazomotor etkinlikleri düzenlemesi ve hasara cevap olarak salgıladığı mediyatörler nedeniyle giderek daha fazla ilgi çekmeye başlamıştır.

Endotel hücrelerin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir, lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisi ile endotelden salınan trombosit aktive edici faktör lökositleri aktive eder. Lökosit endotel hücre etkileşimi sonucu lökositler endotele yapışır ve transmigrasyon gerçekleşir.

### 3.1.4. LÖKOSİTLERİN ROLÜ

İskemi/reperfüzyon lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonuna yol açar. Polimorf nüveli lökositler de, endotel hücreleri gibi SOR üretme kapasitesine sahiptir. İ/R hasarında PMNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bunlar; 1. Mikrovasküler oklüzyon; 2. SOR salınması; 3. Sitotoksik enzim salınması; 4. Vasküler permeablite artışı ve 5. Sitokin salınımında artıştır.

Polimorf nüveli lökositlerin başlangıçtaki kemoatraksiyonları endotel hücreleri ve ksantin oksidaz aracılığı ile olur. Aktivasyon ve migrasyonları ise endotel hücrelerde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığı ile olur. Lökosit adhezyon molekülleri (LAM) lökositlerde ve diğer başka hücrelerde de bulunan ve gelişme, haberleşme, inflamasyon ve apoptosis gibi pek çok biyolojik olaylarda rol alan yapılardır. Selektin grubu adhezyon molekülleri, doku hasarı olan bölgede aktive olmuş endotele, PMNL'lerin başlangıçtaki adhezyonunda rol alırlar. L, P ve E selektin olmak üzere bilinen üç üyesi vardır.

İ/R, endotelde P-selektin eksresyonunu arttırır. Bu molekül, PMNL'lerde bulunan P-selektin glikoprotein 1 (PSGL-1) adlı reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteli lökosit endotel bağlantısını oluşturur. İkinci aşamada lökosit Beta-2 integrinler ile endotelial intersellüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1) arasında etkileşim ile lökosit adhezyon ve agregasyonu gelişir. Üçüncü aşamada platelet endotelial hücre adhezyon molekül 1 ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim ile lökosit transmigrasyonu gelişir. Aktive lökositler ekstravasküler kompartmana ulaşıncaya hasar bölgesine doğru göç etmeye başlarlar (kemotaksis). Burada aktive lökosit cevabı şu mekanizmalarca gerçekleştirilir; 1. Fosfolipaz



A2 aktivasyonu sonucu araşidonik asit metabolitleri (prostoglandin ve lökotrienler) üretilir, 2. Degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır, 3. SOR üretimi gerçekleşir.

Bu ürünler endotel hasarı ve doku zedelenmesinin güçlü mediyatörleridir ve başlangıçtaki inflamatuvar uyarının etkisini güçlendirir. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya dilue etmeye yönelik bu inflamatuvar cevap sonucu mikrovasküler permeablite artışı, ödem, tromboz ve parenkim hücre ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümüne uğurlar ve lenfatik dolaşım ile ortamdan uzaklaştırılırlar.

Lökositlerin azurofilik granüllerinde yer alan miyeloperoksidaz enzimi, antimikrobik etkide önemli rol oynar.

### **3.2. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNE KARŞI DOĞAL SAVUNMA MEKANİZMALARI**

Serbest oksijen radikallerinin ciddi hasar yapma potansiyellerine karşı hücreler, bu toksik ürünleri hızla metabolize edecek savunmaları geliştirmişlerdir. Süperoksite karşı savunmanın ilk hattında süperoksid dismutaz enzimi yer alır. Süperoksite, hidrojenperoksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder. Sitozolde bulunan formu bakır, mitokondrideki formu ise manganez içerir.

Peroksizomlarda bulunan  $H_2O_2$  yine aynı organelde bulunan katalaz enzimi tarafından metabolize edilir. Sitozolde ve mitokondrilerde bulunan  $H_2O_2$  metabolizmasında rol alan bir diğer enzim glutatyon peroksidazdır.

Savunmanın bu ikinci hattındaki bir diğer yöntem Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali oluşumunu engellemek amacıyla redoks aktif metallerin (bakır, demir gibi) transport ve depo proteinlerine bağlanarak ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Demirin transferine bağlanarak taşınması veya ferritine bağlanarak depo edilmesi buna örnek verilebilir.

Serbest radikallerin lipidlerle oluşturduğu zincirleme reaksiyonların durdurulması da bir diğer savunma yöntemidir. Bu reaksiyonları A ve E vitamini gibi antioksidanlar yapar.

### **3.3. PROANTHOCYANİDİNLER**

Vitis vinifera: Botanik tanımlamada yıllık odunsu üzüm asmaı olarak tanımlanmaktadır ve Asya'ya özgündür. Daha sonraları, Avrupa ve diğer ülkelerde de kültüre edilmiştir. Bu bitkinin farklı kısımlarından özellikle de meyveleri kullanılarak yapılan ilaçlar, geleneksel tıpta yüzyıllarca kullanılmıştır. M.Ö. 2400 yılında mısır hiyerografilerinde; üzüm ve şarabın üretim tasvirleri duvar resimlerinde tespit edilmiştir. Antik çağlardan beri proanthocyanidinlerin en önemli diyetik kaynağı olan şarabın farmakolojik değeri bilinmektedir. Hipokrat, Pliny ve Galen birçok hastalığın tedavisinde şarap kullanmışlardır. Eski çağlarda; üzüm çekirdeğinden yapılan yağın; laksatif, antiasit, safra üretimini artırıcı özellikleri bildirilmiş. Yanık ve ağrısız ülserlere karşı da yararlı olduğu belirlenmiştir. Geleneksel tıpta özellikle de, siyah üzüm meyveleri; afrodisyak, diüretik, laksatif, purgatif ve serinletici olarak kullanılırken, bronşiyal astım, kan hastalıkları, göz hastalıkları, ateş, sarılık ve boğaz ağrısında ilaç olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Afrikada koyu renkli vitis vinifera, antiscorbüt özellikleri nedeniyle kullanılmış ve üzüm şurubunun difteri tedavisinde faydalı olduğu belirtilmiştir. Lübnanda yaşayan insanlar üzümü; ateş, sinirlilik, karaciğer hastalıkları ile çiçek hastalığında ve tüberküloz tedavisinde ilaç olarak kullanmışlardır. Bunun yanında kara üzümünden yapılan kırmızı şarap farklı ağırlarda analjezik olarak kullanılmıştır.

Botanik terminolojide V.vinifera olarak tanımlanan kara üzümün farmakolojik etkileri İngiliz ve Amerika farmakopelerinde tanımlanmıştır. V. vinifera içerisinde bulunan proanthocyanidinlerin vasküler bozuklukların tedavisinde terapötik etkinliklerinin oldukları gösterilmiştir. Üzüm çekirdeği içindeki biyoaktif antioksidan proanthocyanidinleri içeren özel

farmositik ürünler, başta Fransa olmak üzere, Avrupada, venöz-lenfatik yetmezlik ve periferik kapiller permeabilite artışı gibi mikrosirkülasyon bozukluklarının tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır.

Önceden de belirtildiği gibi şarabın farmakolojik etkilerinin olduğu bilinmekte idi, ancak bu etkinliğin alkole bağımlı ortaya çıktığı önceleri düşünülürdü. Fakat daha sonra yapılan çalışmalarda kırmızı şarap içerisinde bulunan proanthocyanidinlerin bu farmakolojik etkilerden sorumlu olduğu gösterildi. İlk defa 1979'da Lancet'te St. Leger ve arkadaşları daha sonrada 1992'de yine aynı dergide S. Renaud ve arkadaşları Fransız paradoksunu tanımlamışlardır. Fransızların diyetlerinde tereyağı ve krema gibi yüksek oranda doymuş yağdan besinleri kullanmaları, sigara tüketiminin fazla olması, yeterli egzersiz yapmamalarına rağmen kardiyovasküler hastalıklardan ölüm risklerinin diğer ülkelerle karşılaştırıldığında daha az olduğu gözlenmiştir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda ortaya çıkan paradoksun nedeni olarak Fransızların içinde yüksek konsantrasyonda proanthocyanidinleri bulunduran kırmızı şarabı fazla tüketmeleri olduğu gösterilmiştir.

Proanthocyanidinler C4 - C6 veya C4 - C8 bağları ile düzenli olarak bağlanmış çok sayıda flavon ünitelerinden oluşur. Basit prosiyanidinler dimeriktir, fakat üzüm içerisinde prosiyanidin karışımı, 8 ünitenin üzerinde trimerler, tetramerler ve oligomerler içerir. 4 bağlantı ile karakterize prosiyanidinlerden Bb1 - B4 en genel dimerlerdir, bazen 4-6 bağlı izomerlerle (B5 - B8) beraber de bulunur.

Siyah üzüm çekirdeği tohumlarında tanımlanan ve identifikasyonu yapılan prosiyanidin dimerleri B1 - B4 ve B5 - B8 (gallik asidin C3 hidroksil grubuyla beraber esterleşmiş veya serbest form içinde) ve trimerleri (aralarında trimer C1 en yaygın olanıdır.) bulunur. Bu tanımlanan proanthocyanidin bileşikleri içerisinde farklı polifenolik bileşikler olan fenoldienonlar, epikateşin, epigallocateşin galat, ferulik asit, kaffeik asit, P - kumarik asit, kaempferol, quercetin ve myricetin'de bulunmaktadır.

Proanthocyanidinler, kondanse tanin olarak bilinen alt gruba aittir. Tanin'ler hidroksile yapılarıdır, karbonhidratlar ve proteinler ile çözünmez kompleksler oluştururlar ve bu özellikleri ile bağ dokusu korunmasında önemli görevler üstlenirler. Dimer, trimer ve tetramerik proanthocyanidinler düşük molekül ağırlıklı olup, su ve etanolde çözünürler, barsaklardan emilerek tüm dokulara ve plazmaya dağılırlar, bunun ötesinde diğer suda eriyen antioksidan moleküllerden farklı olarak plazma ve dokuda 7-10 gün boyunca mevcudiyetlerini devam ettirerek güçlü antioksidan özelliklerinin ortaya çıkmasını sağlarlar.

Proanthocyanidinler meyvelerde, sebzelerde, kuruyemişlerde, çekirdeklere, çiçeklerde ve kabukta bulunan doğal antioksidanlardır ve serbest oksijen radikallerine ve oksidatif strese karşı biyolojik, farmakolojik ve terapotik etkileri vardır.

Proanthocyanidinler konsantrasyona bağlı olarak serbest oksijen radikallerinin inhibisyonunu sağlarlar. Proanthocyanidinlerin şimdiye kadar gösterilmiş çeşitli farmakolojik tıbbi ve terapötik etkileri arasında; vazodilatör, antikarsinojenik, anti-alerjik, antiinflamatuvar, antifungal, anti-artritik, antibakteriyel, kardiyoprotektif, immunostimulan, antiviral etkiler sayılabilir. Proanthocyanidinler inflamatuvar reaksiyonda rol oynayan fosfolipaz A2, siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerini inhibe ederler, bunun yanı sıra hücre içi sinyal iletişimde rol oynayan protein kinaz-C (PKC), hipertansiyon oluşumunda rol oynayan anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) ve bağ dokusu yıkımına yol açan hyaluronidaz ve kollajenaz enzim aktivitelerini düzenlerler. Aynı zamanda yapılan araştırmalarda proanthocyanidinlerin sitokrom P-450 aktivitesini hücre proliferasyonunda rol oynayan DNA topoizomeraz II enzim aktivitelerini inhibe ettikleri gösterilmiştir. Proanthocyanidinler trombosit agregasyonu inhibisyonu yanında, kapiller frajilite ve permeabiliteyi de inhibe ederler. Bu inhibitör etki özellikle retinal mikrokapiller patolojilerin tedavisinde GSPE'nin kullanımına yol açmaktadır. Proanthocyanidinler yüksek antioksidan aktiviteleri aracılığı ile

serbest oksijen radikallerini süpürerek cilt yaşlanmasını ve ultraviyole radyasyonu ile ortaya çıkan lipid peroksidasyonunu önlerler ve kognitif fonksiyonlarda bozulmayı engellerler.

### 3.3.1. PROANTHOCYANİDİNLERİN ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİ

Serbest radikaller, yüksek oranda reaktif bileşiklerdir. Sahip oldukları bu reaktivite ile hücre membranının yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, DNA'daki nükleotidler ve proteinlerin sülfidril grupları ile reaksiyona girerek doku hasarına neden olurlar. SOR fizyolojik şartlarda endojen olarak oluşurken aynı zamanda hava kirliliği, pestisitler, UV, radyasyon, X-ışını gibi eksojen faktörlerin etkisi ile de oluşumları artmaktadır.

Serbest radikaller; artrit, hemorajik şok, ateroskleroz, yaşlanma, İ/R, alzheimer ve parkinson hastalığı, gastrointestinal disfonksiyonlar, tümör oluşumu, karsinogenez ile AIDS gibi insanlarda görülen yüzlerce hastalıkta işe karıştığı gösterilmiştir. Antioksidanlar güçlü serbest radikal süpürücüdürler. Çok sayıda sentetik ve doğal antioksidanın insan sağlığında ve hastalıkların önlenmesinde faydalı etkilerinin olduğu bilinmekte ve bundan yola çıkılarak SOR'lerine bağlı gelişen pek çok hastalıkta proanthocyanidinlerin kullanılabileceği bildirilmektedir.

SOR'nin ciddi hasar yapma potansiyellerine karşı hücreler, bu toksik ürünleri hızla metabolize edecek savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Hücre ve dokuları serbest oksijen radikallerine karşı korumada oksijen radikallerinin yapımlarının inhibisyonu önemlidir. Süperoksit karşı savunmanın ilk hattında süperoksit dismutaz enzimi yer alır. Sitozolik süperoksit dismutaz bakır-çinko içeren metalloenzimdir ve mitokondria da bulunan formu ise mangenez içerir. Süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder. Peroksizomlarda bulunan  $H_2O_2$  yine aynı organelde bulunan katalaz enzimi tarafından metabolize edilir. Katalaz, sitoplazma içinde ve peroksizomlarda ve hemen her hücrede bulunan enzimdir. Sitozolda ve mitokondrielerde bulunan  $H_2O_2$  metabolizmasında rol alan bir diğer enzim glutatyon peroksidazdır. Tüm bu organizmada bulunan antioksidan enzimler endojen veya hastalık durumunda oluşu artan serbest radikallere karşı vücudun antioksidan savunma sisteminin önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar.

Bir diğer ciddi öneme sahip antioksidan savunma yöntemi ise fenton reaksiyonu ile hidroksil radikali oluşumunun engellenerek redoks aktif metallerin (bakır, demir gibi) transport veya depo proteinlerine bağlanarak ortamdan uzaklaştırılması ve serbest radikallerin lipidlerle oluşturduğu zincirleme reaksiyonların durdurulmasıdır. Farklı bir koruma mekanizması da antioksidan etkili vitaminler ile serbest oksijen radikallerinin detoksifiye edilmesidir. Vitamin E lipidden zengin membranlarda, vitamin C su bazlı ortamlarda temel korumayı oluşturur. E vitamini(alfa-tokoferol) lipid peroksidasyonunda oluşan zincirleme reaksiyonu yapısındaki hidrojen atomunu lipid peroksiline vererek önler. Kendisi ise oksidasyon sonucu alfa-tokoferol radikaline dönüşür. C vitamini (askorbik asit) ise bir elektron vererek dehidroaskorbat'a indirgenirken tokoferoksil radikalinin alfa-tokoferole dönüşümünü gerçekleştirir.

Diğer antioksidan maddeler urat, glutatyon (GSH) gibi hidrofilik radikal süpürücüler, flavonoidler, karotenoidler, ubiquinol gibi lipid radikal süpürücüler ve GSH redüktaz, dehidroaskorbate redüktaz gibi küçük moleküler antioksidanların okside formalarının indirgenmesinde etkili enzimler, protein tiyollerin devamlılığında sorumlu olan thioeredoksin redüktaz, indirgenmiş formdaki glutatyon (GSSG)'un, glutatyona dönüşümünde elektron donörü olarak kullandığı NADPH yenileyen glukoz-6 fosfat dehidrojenez enzimi gibi enzimler antioksidan savunmaya katkıda bulunmaktadır.

Proanthocyanidinler güçlü antioksidan özellikleri ile oksidatif hasara neden olan serbest radikallerin inhibisyonuna neden oldukları hem in-vivo hem in vitro çalışmalarla gösterilmiştir. Proanthocyanidinler indirgeyici ajanlardır ve bir elektron vererek serbest radikalleri (süperoksit ve hidroksil radikali) süpürürler. Bu özellikleri nedeniyle GSPE

içindeki proanthocyanidinler oksidatif stres ile hasara uğrayan dokuların korunmasında çok etkilidirler.

Proanthocyanidinler aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan süperoksit anyonunu (O<sup>-</sup>) ve (OH<sup>-</sup>) süpürür, lipid peroksidasyonunu önler, endojen antioksidanlar olan E ve C'nin rejenerasyonunu sağlar, şelasyon yapıcı etkisiyle pro-oksidan etkili demir ve bakır gibi geçiş metalleri inaktive ederek oksidatif strese karşı direnci artırır.

Proanthocyanidinlerin antioksidan aktivitelerinin ortaya çıkmasında bir diğer önemli yol ise antioksidan enzim aktivitelerini artırmaları ile oksidan moleküllerin açığa çıkmasında rol oynayan enzim aktivitelerini inhibe etmeleridir. Proanthocyanidinler özellikle süperoksit radikali oluşumuna neden olan ksantine oksidaz enzimini nonkompetatif olarak inhibe ettiği in-vitro deneylerde gösterilmiştir. 0,5mmol/L konsantrasyonda bulunan proanthocyanidinler, ksantine oksidaz enzimi üzerinde %10,5 oranında inhibisyon oluşturmaktadırlar ve proanthocyanidinlerin konsantrasyonu arttıkça ksantine oksidaz enzimi üzerinde yaptığı inhibisyon aynı oranda artmaktadır.

### **3.3.2. PROANTHOCYANİDİNLER VE FARMAKOKİNETİK**

Polifenollerin farmakokinetiği ile ilgili insan çalışmaları azdır. Fenolik bileşikler çözünürlüğüne ve yapısına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Midenin asidik ortamı proanthocyanidinlerin parçalanması için uygun değildir. Polifenollerin içerisindeki monomer dimer, trimer yapılar kolona ulaştıklarında hızla emilirler, fakat polimerler emilmezler ve kısmen hücre yüzeyine yapışırlar. Prosiyanidin polimerler kolona ulaştıktan sonra kolondaki mikroflora tarafından parçalanırlar. Kolondaki mikroflora, proanthocyanidinleri düşük moleküler ağırlıklı aromatik bileşiklere (laktone ve fenolik aside) çevirir. Barsak lümeninden emildikten sonra portal ven aracılığı ile karaciğere gelirler ve burada metabolize olurlar. Proanthocyanidinler karaciğerde metilasyon, dehidroksilasyon, oksidasyon, glukronik asitle veya sülfatla konjügasyon gibi biyotransformasyon reaksiyonları ile metabolitlerine ayrılırlar. C max ulaşma 45 dakikadır ve hesaplanan yarılanma ömrü 5 saattir.

Flavonoid ve metabolitleri temel olarak idrar ve feçes ile az oranda CO<sub>2</sub> ile elimine edilirler. GSPE bileşikleri tek doz oral uygulama sonrasında hızlı şekilde plazmada görülürler. Tek doz 50mg/kg oral uygulamadan sonra; uygulanan dozun %70'i ilk 24 saat içinde idrar ve %45'i feçes ile atılır. Temel idrar metabolitleri; hippürik asit, etikkatekol ve m-hidroksifenilpropionik asittir. Önemli feçes metaboliti; etikkatekol'dür. Temel safra metabolitleri ise; vanilik asit ve m-hidroksifenilpropionik asittir. Proanthocyanidinlerin oral uygulanmasından sonra çeşitli dokulara geçmektedir. Doku dağılımında, uygulanan dozun temel hedefi bağ dokusudur. Dimer, trimer ve tetramerik proanthocyanidinler düşük moleküler ağırlıklı olup, su ve etanolde çözünürler, diğer suda eriyen antioksidan moleküllerden farklı olarak plazma ve dokuda 7-10 gün boyunca mevcudiyetlerini devam ettirirler.

### **3.3.3. PROANTHOCYANİDİNLER VE TOKSİSİTE**

GSPE ile yapılan akut ve subkronik oral toksisite çalışmalarında; 2 ve 4 g/kg akut oral doz çalışmasında mutajenite gözlenmemiştir. %0,002, 0,2 ve 2 g/kg dozlarda 90 gün boyunca ratlara uygulanan GSPE ekstresi ile toksisite belirtileri görülmemiştir. Subkronik toksisite çalışmalarında diyet içinde %2'lik GSPE ekstre (erkek; 1410mg/kg vücut ağırlığı, günde, dişide; 1501mg/kg vücut ağırlığı karşılık gelen doz) uygulanması sonrası yan etkiler gözlenmemiştir. GSPE için LD50 (ortalama ölüm dozu) değeri erkek ve dişi ratlara akut toksisite çalışmasında uygulanan 4 g/kg'dan daha yüksek bulunmuştur. Proanthocyanidinler nontoksik, nonmutajenik ve nonkarsinojenik olarak kabul edilmektedirler.

## 4. MATERYAL VE METOD

**4.1. Kimyasal ilaçlar ;** Grapeseed proanthocyanidin ekstresi (*Vitis Vinifera*), antioksidan etkileri olan değişik polimerler içeren bir polyfenol bileşimidir (%70-75 min). Bu çalışmada procyanidolic oligomer (leucocyanidin) olan, standart grape seed ekstresi kullanıldı. Leucocyanidine (LCs) monomeric molekül (flavene-3,4-did LC) ve oligomerlerini içerir.<sup>11</sup> Procyanidolic oligomerlerin vasküler yaralanma, serbest oksijen radikallerinden koruyucu<sup>12-13</sup> ve antimutajenik aktiviteli<sup>14</sup> olduğu değişik çalışmalarla gösterilmiştir.

Bu çalışmada Abarta Technology Co. Ltd. tarafından üretilen standart GSPE kullanıldı. İlaç Mikro-gen ilaç san. ve tic. Ltd. tarafından temin edildi.

GSPE 50 mg/kg intraperitoneal. (İlaç 100 cc. izotonik içine 1 gr. GSPE ve 200 mg. metil sellüloz ile hazırlandı [metil sellüloz ilacın homojen dağılımı için kullanıldı]).

Anestezi için deney hayvanlarına intramüsküler (i.m.) 100 mg/kg Ketamine® (Ketalar, Parke-Davis, Eczacıbaşı-İstanbul) kullanıldı.

## 4.2. Hayvanlar ve tedavileri ;

Deney, T. C. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Labartuarı Deney Hayvanı Etik Kurulundan alınan 24.11.2005-38 sayılı izin ile gerçekleştirildi. Hayvanlar aynı labartuar'dan temin edildi. Deney aynı labartuarda gerçekleştirildi.

Her grup için 8, toplam 24 adet erkek Wistar albino cinsi ratlar (180-220 gr.) kullanıldı. Betadine ile cilt temizliğini takiben, orta hat insizyonu ile batına girildi. Vasküler klemple karaciğerin orta ve sol lobunu besleyen hepatik arterleri, portal ven ve safra yolu klempe edilerek 45 dakika iskemi gerçekleştirildi.

Reperfüzyon'dan 60 dakika sonra ratların vena cava inferiorundan 2 cc kan ve karaciğer'den doku örneği alındı.

- 1- **Kontrol Grubu (K);** Hayvanlar kontrol amacıyla orta ve sol lobu besleyen hepatik arterler, portal ven ve safra yolu eksplore edilip başka bir işlem yapılmadan 90 dakika sonra 2cc kan ve karaciğerden doku örneği alındı.
- 2- **İskemi Reperfüzyon grubu (İ/R);** Hayvanlar sadece iskemi reperfüzyona tabi tutuldu, 2cc kan ve karaciğerden doku örneği alındı.
- 3- **İskemi den 30 dak önce ve reperfüzyondan hemen önce grape seed proanthocyanidin ekstresi verilen grup (İ/R-GS);** Hayvanlara iskemiden 30 dakika önce 50 mg/kg GSPE intraperitoneal olarak verildi, aynı doz reperfüzyonun hemen öncesinde tekrarlandı. 60 dakika reperfüzyon sonrasında 2cc kan ve karaciğerden doku örneği alındı.

Rezeke edilen karaciğer dokusu soğuk %0,09 NaCl ile yıkanıp alüminyum folyo içine sarılarak -70 C'de muhafaza edildi. Dondurulan örnekler oda ısısında çözüldükten sonra MDA, MPO, GSH, TNF- $\alpha$  aktivitesi saptandı. Alınan kan örneği 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra ayrılan plazma -70 C'de muhafaza edildi. Dondurulan örnekler oda ısısında çözüldükten sonra AST, ALT ve LDH seviyeleri ölçüldü.

### **4.3. Biokimya:**

Alınan kan örneklerinde, karaciğerdeki hücre düzeyindeki doku hasarını belirlemek amacı ile AST, ALT, LDH bakıldı.

#### **4.3.1. Tümör Nekroz Faktör - Alfa (TNF – $\alpha$ ):**

Tümör Nekroz Faktör - Alfa ölçümü için hazır immunassay kiti kullanıldı.

#### **4.3.2. Malondialdehit (MDA):**

Lipid Peroksidaz düzeyinin hesaplanması: Beuge yöntemine göre yapıldı.<sup>15</sup>

#### **4.3.3. Glutatyon (GSH):**

Glutatyon düzeyinin hesaplanması: Ellman yöntemine göre yapıldı.<sup>16</sup>

#### **4.3.4. Myeloperoksidaz (MPO):**

Myeloperoksidaz aktivitesi: Hillegas ve arakadaşları tarafından tarif edildiği şekilde ölçüldü.<sup>17</sup>

## **5. İSTATİSTİK USULU**

Elde edilen verilerin istatistik analizi T-test, Student-Nevman-Keuls test ve Benforini testlerine göre yapıldı.

## 6. SONUÇLAR

### 6.1. AST,ALT, LDH

45 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon sonrası alınan AST, ALT, LDH değerleri Tablo-1’de gösterilmektedir. AST düzeyi kontrol grubunda  $186 \pm 11.1$  (U/L) iken, İ/R grubunda yükselerek  $491 \pm 19.1$ ’e çıktı. İ/R-GS verilen grupta ise  $362 \pm 19.8$ ’ye kadar düştü ve bu sonuç; kontrol grubuna göre yüksek olmakla beraber, İ/R grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha düşük ( $p < 0.001$ ) saptandı. ALT düzeyi kontrol grubunda  $47 \pm 4.3$  (U/L) iken, İ/R grubunda yükselerek  $133.2 \pm 9.9$ ’e çıktı. İ/R-GS verilen grupta ise  $95.5 \pm 5.2$ ’ye kadar düştü ve bu sonuç; kontrol grubuna göre yüksek olmakla beraber, İ/R grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha düşük ( $p < 0.01$ ) saptandı. LDH düzeyi kontrol grubunda  $2385 \pm 113$  (U/L) iken, İ/R grubunda yükselerek  $4552 \pm 176$ ’ye çıktı. İ/R-GS verilen grupta ise  $3579 \pm 165$ ’ye kadar düştü ve bu sonuç; kontrol grubuna göre yüksek olmakla beraber, İ/R grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha düşük ( $p < 0.01$ ) saptandı. Her üç biokimyasal değerinde GSPE ile tedavi edilen grupta İ/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük olduğu görüldü.

	AST (U/L)	ALT (U/L)	LDH (U/L)
Kontrol	$186 \pm 11.1$	$47 \pm 4.3$	$2385 \pm 113$
İ/R	$491 \pm 19.1$ ***	$133.2 \pm 9.9$ ***	$4552 \pm 176$ ***
İ/R-GS	$362 \pm 19.8$ **, +	$95.5 \pm 5.2$ **, ++	$3579 \pm 165$ **, ++

Tablo -1: 45 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon sonrası kan biokimyası:

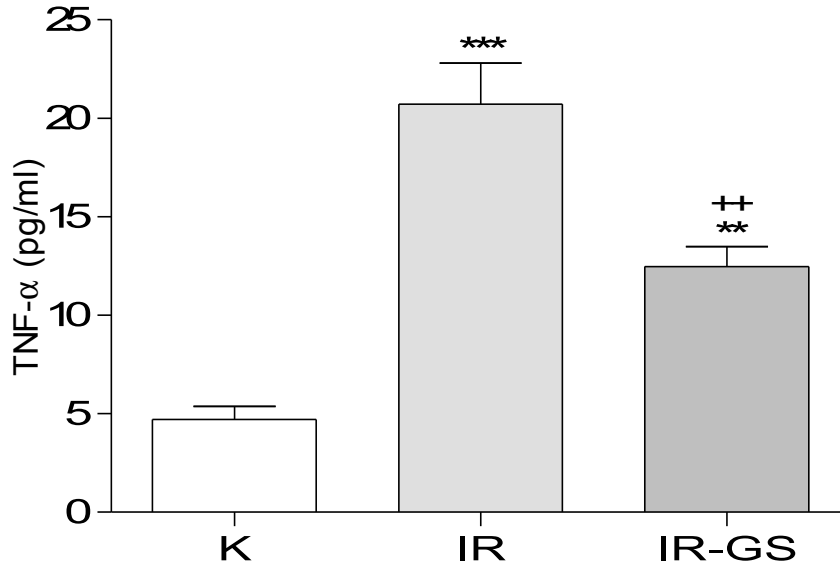
(K: kontrol, İR: iskemi/reperfüzyon, GS: grape seed tedavisi)

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  kontrol grubuna göre;

++:  $p < 0.01$  and +:  $p < 0.001$ . İ/R grubuna göre; Her grub için  $n=8$ .

### 6.2. Tümör Nekroz Faktör - Alfa

İnflamatuar sürecin parametresi olan TNF- $\alpha$  konsantrasyonu ölçülerek reperfüzyon hasarının değerlendirilmesi yapıldı. Sonuçları incelediğimizde; İ/R ve İ/R-GS verilen grup arasında belirgin bir fark olduğunu gördük. TNF-  $\alpha$  düzeyi, dokuda inflammatuar sürecin önlenemediğini açıkça gösterir bir şekilde İ/R grubunda anlamlı derecede yükselmiş olarak saptandı. İ/R-GS grubundaki ratlarda ise kontrol grubuna göre yükselmekle beraber, İ/R grubuna göre daha az oranda yükseldi ve bu fark İ/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.01$ ). Sonuç olarak, GSPE inflamasyonu engelleyerek TNF- $\alpha$  düzeylerini düşürmüştür. (Şekil 1)



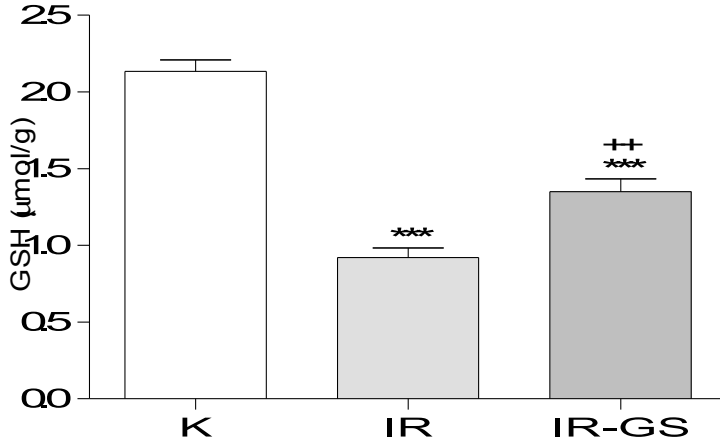
Şekil 1. Grupların karaciğer dokusundaki TNF- $\alpha$  seviyesi:  
(K: kontrol, İ/R: iskemi/reperfüzyon, GS: grape seed tedavisi)  
\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  kontrol grubuna göre;  
+:  $p < 0.01$  and ++:  $p < 0.001$ . İ/R grubuna göre; Her grub için  $n=8$ .

### 6.3. Glutasyon (GSH)

İ/R sonucu bir çok dokuda oluşan serbest oksijen radikallerine karşı korumada indirgenmiş glutasyon önemli bir antioksidandır. Glutasyon, peroksidaz enzimi ile okside olarak hidrojen peroksidaz radikalini ortadan kaldırır.<sup>18</sup> Karaciğer dokusundaki indirgenmiş glutasyon düzeyleri incelendiğinde İ/R-GS verilen grupta, İR grubuna göre daha az düşüş olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p < 0.01$ ). (Şekil 2a)



a)

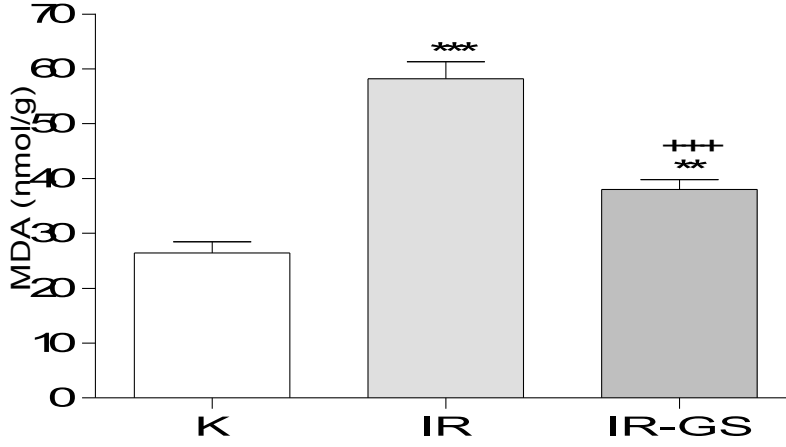


Şekil 2a Grupların karaciğer dokusundaki GSH seviyesi:  
(K: kontrol, İ/R: iskemi/reperfüzyon, GS: grape seed tedavisi)  
\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  kontrol grubuna göre;  
+:  $p < 0.01$  and ++:  $p < 0.001$ . İ/R grubuna göre. Her grup için  $n=8$ .

#### 6.4. Malondialdehit (MDA)

Oksidan hasarın parametresi olan lipid peroksidazın bir ürünü olan MDA konsantrasyonu ölçülerek reperfüzyon hasarın değerlendirilmesi yapıldı. Karaciğer dokularında yapılan serbest oksijen radikallerinin İ/R ve İ/R-GS verilen iki grup arasında belirgin bir fark olduğunu gördük. MDA düzeyleri İ/R grubunda anlamlı derecede yükselmiş ve bu da dokuda reperfüzyon hasarının önlenemediğini açık olarak göstermiş. İ/R-GS grubundaki ratlarda ise kontrol grubuna göre yükselmekle beraber, İ/R grubuna göre daha az oranda yükseldiği ve İ/R grubunun çok altında kaldığı ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p < 0.001$ ). Sonuç olarak GSPE, MDA düzeylerini düşürerek karaciğer dokusunu reperfüzyon hasarından koruduğu görüldü. (Şekil 3b)

b)

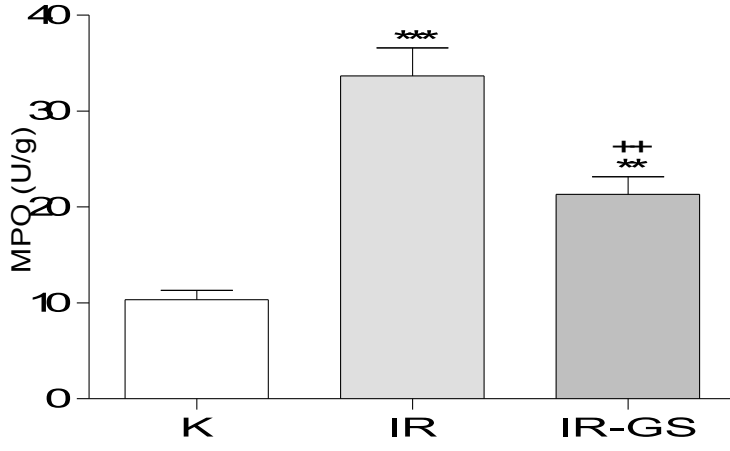


Şekil 3b Grubların karaciğer dokusundaki MDA seviyesi:  
(K: kontrol, İR: iskemi/reperfüzyon, GS: grape seed tedavisi)  
\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  kontrol grubuna göre;  
++:  $p < 0.01$  and +++:  $p < 0.001$ . İ/R grubuna göre. Her grup için  $n=8$ .

### 6.5. Myeloperoksidaz (MPO)

Nötrofil infiltrasyon ve aktivasyon parametresi olarak MPO konsantrasyonu ölçüldü.<sup>19-20</sup> Sonuçları incelediğimizde İ/R ve İ/R-GS verilen iki grup arasında belirgin bir fark olduğunu gördük. MPO düzeyleri İ/R grubunda anlamlı derecede yükselmiş ve bu da dokuda inflamasyonun belirgin olarak arttığını göstermiştir. İ/R-GS grubundaki ratlarda ise kontrol grubuna göre yükselmekle beraber, İ/R grubuna göre daha az oranda yükseldiği, İ/R grubunun çok altında kaldığı ve bu farkında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p < 0.01$ ). Sonuç olarak GSPE, MPO düzeylerini düşürerek karaciğer dokusuna olan nötrofil infiltrasyonu ve aktivasyonunu engellediği ve reperfüzyon hasarından koruduğu görüldü. (Şekil 4c)

ç



Şekil 4c Grupların karaciğer dokusundaki GSH seviyesi:  
(K: kontrol, İ/R: iskemi/reperfüzyon, GS: grape seed tedavisi)  
\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  kontrol grubuna göre;  
+:  $p < 0.05$  and ++:  $p < 0.01$  and +++:  $p < 0.001$ . İ/R grubuna göre. Her grub için  $n=8$ .

## 6. TARTIŞMA

Bir organ veya dokuya kan akımının kesilmesi ve daha sonraki reperfüzyon süreci hücre ölümü ve organ disfonksiyonuna yol açan bir dizi patolojik reaksiyonu başlatır. Son yıllarda araştırma tekniklerinin gelişmesiyle birlikte bu patolojik tablonun ortaya çıkmasında asıl önemli rolü reperfüzyon sürecindeki olayların oynadığı anlaşılmıştır. Reperfüzyon hasarı sonucu oluşan fonksiyon bozukluğu organdan organa değişiklikler göstermekle beraber, hasardan oksijen radikallerinin sorumlu olduğu belirlenmiştir.

Majör karaciğer cerrahisi esnasında kan kaybı mortalite ve morbidite hızı açısından önemli olduğundan, karaciğerin vasküler izolasyonu ile kan kaybı en aza indirilmelidir. İ/R hasarının mekanizması komplekstir ve karaciğer hasarında oksijenden türeyen serbest radikallerin bu değişikliklerin ana nedeni olduğu düşünülmektedir.<sup>21</sup> Jaeschke ve ark.<sup>22-23-24</sup> karaciğer İ/R hasarının iki ayrı fazda olduğunu göstermiştir. Başlangıç fazı, reperfüzyonun ilk iki saatinde gerçekleşir ve kupffer hücrelerinin aracılık ettiği oksidatif stresle karakterizedir. Bu dönemde kupffer hücrelerinden salıverilen reaktif oksijen metabolitleri bir dizi karmaşık inflamatuvar olaylar zincirini başlatarak nötrofilleri aktive eder. Aktive olmuş nötrofiller ise endotel hücrelerine yapışarak myeloperoksidaz, elastaz, kollojenaz gibi çeşitli proteazlar ve SOR salıverirler ve hasarı daha da kötüleştirirler. Dawson ve ark.<sup>25</sup> hücre içinde en önemli SOR kaynağının mitokondri olduğunu ve O<sub>2</sub> radikalının nötrofil aktivasyonunu uyararak hepatosit ölümüne yol açtığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda orta ve sol hepatik arterleri, portal ven ve safra yolunun klemplenmesiyle oluşturulan karaciğer İ/R'u sonucu karaciğer dokusunda meydana gelen patolojik değişiklikler biokimyasal olarak değerlendirildi ve güçlü serbest oksijen radikali süpürücüsü olarak bilinen grape seed proanthosiyanidin ekstresinin bu hasara karşı olası koruyucu etkileri araştırıldı.

İ/R hasarı sonrasında karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmek için değişik yöntemler kullanılabilirse de bugün için bunların en çok kabul gören ve en çok kullanılan AST, ALT, LDH aktivitesi tayinidir. Karaciğer hasarında bu enzimlerin aktivitesinin arttığı bilinmektedir. Yabe ve ark.<sup>26</sup> karaciğerde İ/R sonucunda ALT ve AST düzeylerinin artırdığını ve bu artışın iskemi reperfüzyon sonucu oluşan serbest radikallerin dokuda meydana getirdiği hasara bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamızda, karaciğer hücre hasarını gösteren karaciğer enzimleri olan AST, ALT, LDH seviyelerinin tedavi edilen grupta anlamlı olarak daha düşük çıktığını ve bu da bize doku hasarının GSPE ile tedavi edilen grupta daha az olduğunu göstermektedir

İ/R sonucu oluşan serbest radikallerin en önemli hedef yapılarından biri de lipidlerdir. Lipid peroksidasyonu bazı araştırmacılar tarafından İ/R hasarında anahtar olarak kabul edilmektedir.<sup>27</sup> Serbest oksijen radikalleri çoklu doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen atomu alarak lipid peroksidasyonunu başlatır ve sonuçta hidroperoksitler oluşur. Bu reaksiyonlar sonucunda hücre membranı akışkanlığını yitirir ve membran bütünlüğü bozulur. Bu durum hücre fraksiyonlarının çevreye salıverilmesine ve hücre ölümüne yol açar. Diğer taraftan çevreye salıverilen bu subsellüler yapılar inflamatuvar olayları tetikler ve hasarı daha da kötüleştirir.<sup>28</sup> Dokuda lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak farklı metodlar kullanılmaktadır. Bu metodların en çok kullanılanlardan biri de dien konjugatları olan malondialdehit tayinidir.

Çalışmamızda MDA seviyesinin yükselmesi tedavi gören grupta anlamlı olarak engellenmiştir.

Tüm aerobik canlılar metabolizmaları sırasında fizyolojik olarak oksidatif strese maruz kalırlar. Vucutta oluşan  $H_2O_2$ ,  $O_2$  gibi serbest radikaller daha toksik metabolitlere dönüşerek özellikle DNA, lipidler ve proteinler gibi hedeflere saldırırlar ve metabolik olayları bozarlar. Ancak organizma bu reaktif ajanları nötralize edebilen bir çok savunma mekanizmasına sahiptir. 'Antioksidan savunma sistemi' adı verilen bu sistemin en önemli komponenti glutatyondur. Glutasyon serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreyi oksidatif hasara karşı korumaktadır. Karaciğer İ/R hasarı boyunca hepatic GSH konsantrasyonunun hızla azaldığı gösterilmiştir. Bu durum GSH'un reaktif oksijen moleküllerinin nötralize edilmesi için kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Bir çok çalışmada eksojen verilen GSH'un hücre içi GSH seviyelerini artırdığı ve oksidatif hasarı engellediği gösterilmiştir. Glutasyon oksidatif yaralanmalarda major koruyucu etkilidir.<sup>29</sup>

Çalışmamızda Glutasyon seviyesinin GSPE tedavisi ile anlamlı olarak yüksek kaldığı görüldü.

TNF- $\alpha$  makrofajlardan salınması yanında aynı zamanda önemli bir aktivatörü olan bir sitokindir. Sitotoksik etkisi yanında, inflamatuvar reaksiyon ve inflamasyonun regülasyonunda da önemli bir role sahiptir.<sup>30-31</sup> Kupffer hücreleri karaciğere yerleşik doku makrofajlarıdır. Aktive olduklarında bir çok sitokinle beraber, TNF- $\alpha$  da salgırlar. Sitokinler hipermetabolizma, karaciğerin akut faz cevabı ve proliferatif/apoptoz kaskadının mediyatörleridir. Travma sonrası pro- ve anti-inflamatuvar sitokinler homeostazı sağlamak amacı ile sentezlenip salgılanırlar.<sup>32</sup> Klinik çalışmalarla da gösterilmiştir ki pro-inflamatuvar sitokinler multiorgan yetmezliğine sebep olabilirler.<sup>33-34</sup> Pro-inflamatuvar sitokin etkilerine ve reseptörlerine yönelik yapılmış bir çok çalışmaya rağmen yapıları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.<sup>33-35-36-37</sup> Nötrofiller, inflamasyonda ve travmalarda serbest oksijen radikalleri ve birtakım lizozomal enzimler salgılamaktadır. Ek olarak nötrofiller uyarı aldığıında TNF- $\alpha$  ve miyeloperoksidaz da salgırlar.<sup>38</sup> Nötrofillerin İnflamatuvar barsak hastalığı, romatoid artrit, kanser ve reperfüzyon hasarında, hasardan sorumlu major ajanlar olduğu düşünülmektedir.<sup>39-40</sup>

Çalışmamızda TNF- $\alpha$  ve MPO seviyelerinin, İ/R grubuna göre anlamlı bir şekilde GSPE ile tedavi edilen grupta daha düşük kaldığı ve daha az yükseldiği gösterilmiştir. Bu da bize reperfüzyon hasarında tetikleyici rol oynayan nötrofillerin aktivasyon ve infiltrasyonun engellenerek inflamatuvar cevabın azaldığını göstermektedir.

Karaciğer dokusundaki mevcut kupffer hücreleri ve aktive olan nötrofillerin, karaciğer dokusuna olan infiltrasyonu İ/R hasarını arttırmaktadır. GSPE'nin muhtemel etkilerinden biri de PMN stimülasyonunu ve reaktif oksijen radikali üretimini inhibe ederek etkisini göstermektedir. Kuşkusuz GSPE sinin açığa kavuşturulmamış bir çok etki mekanizması olduğu gerçektir. Bu çalışmamızda GSPE'in İ/R hasarı üzerine olan koruyucu etkilerini ortaya koymaya çalıştık.

Sonuç olarak, Karaciğer dokusunda oluşan İ/R sonrasında GSH düzeyinin düştüğü, lipid peroksidasyonu ve MPO aktivitesinin arttığı ve buna bağlı olarak karaciğerde fonksiyon bozukluğu olduğu gözlenmiştir. GSPE karaciğer dokusunda İ/R hasarını anlamlı ve önemli ölçüde azaltarak koruma sağlamıştır. Bu bulgularla, GSPE tedavisinin karaciğerde oluşacak İ/R olayları sonucu ortaya çıkabilecek serbest radikal aracılı organ hasarı ve fonksiyon bozukluğunu önleyerek morbidite ve mortaliteyi önemli oranda azaltabileceğini düşündürmektedir.

## 8. KAYNAKLAR

1. Majino G., Jorris I.: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of the cell death. *Am. J. Pathol.*, 146: 3-9, 1995.
2. Zimmerman B. J., Granger N.: Reperfusion injury. *Surg. Clin. North. Am.* 72: 65-83, 1992.
3. Parks D. A., Granger D. N.: Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesions formation. *Am. J. Physiol.*, 250: G749-753, 1986.
4. Horton J. W., Walker P. B.: Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischaemia and reperfusion. *J. Appl.*, 74: 1515-1520, 1993.
5. Bilbao G., Contreras J. L., Eckhoff D.E. et al.: Reduction of ischemia-reperfusion injury of the liver by in vivo Adenovirus-mediated gene transfer of the antiapoptotic Bcl-2 gene. *Ann Surg.*, 230: 185-193, 1999.
6. Weight S. C., Bell P. R. F., Nicholson M. L.: Renal ischemia-reperfusion injury *Br. J. Surg.*, 83: 162-170, 1996.
7. Collard C.D., Gelman S.: Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anest.* 94: 1133-1138, 2001.
8. Carden D. L., Granger D. N.: Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J. Pathol.*, 190: 255-66, 2000.
9. Chamoun F., Burne M., O' Donnell M., Rabb H.: Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front. Biosci.* 5: E103-E109, 2000.
10. Cuzzocrea S., Riley D. P., Caputi A. P., Salvemini D.: Antioxidant Therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol. Rev.*, 53: 135-159, 2001.
11. Masquelier J.: Perfumes, Cosmetiques, Aromes. Oct.-Nov., 89-97 1997.
12. Facino R.M. Carini M., Aldini G., Bombardelli E, Morazzoni P., Morelli R.: *Drug Res.*, 44-592-601 1994.
13. Nutall S. L., Kendall M. J., Bombardelli E., Morazzoni P. J.: *Clin.Pharm Ther.*, 23. 385-389 1998.
14. Morazzoni P., Bombardelli E., *Fitoterapia LXV*, 203-208 1994.
15. Beuge J.A., Aust S.D.: Microsomal lipid peroxidation. *Methods. Enzymol.* 52: 302-3113 1978.
16. Beutler E.: Glutathione in red blood cell metabolism. *A manual of biochemical methods*, Grune&Stratton, New York: 112-114, 1975.
17. Hillegas L.M., Griswold D.E., Brickson B., Albrghtson-Winslow C.: Assesment of myeloperoxidase activity in whole rat kidney. *J. Pharmacol. Methods.*, 24: 285-295, 1990.
18. Meister A., Anderson M. E.: Glutathion. *Ann Rev Biochem.* 52: 711, 1983.
19. Colletti L. M., Remick D.G., Burtch G. D., Kunkel S. L., Strieter R. M., Campbell D. A. J.: Role of tumor necrosis factor-alfa in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in rat. *J. Clin Invest* 1990, 85: 1936-1943.
20. Schmekel B., Karlsson S. E., Linden M., Sundström C., Tegnet H., Venge P.: Myeloperoxidase in human lung lavage:a marker of local neutrophil activity , inflammation 1990, 14: 447-454.
21. Hasselgren P. O.: Prevention and treatment of ischemia of the liver. *Surg Gynecol Obstet* 1987, 164: 187-196.

22. Jaeschke H.: Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem. Biol. Interact.*, 79: 115-136, 1991.
23. Jaeschke H., Smith C. W., Mitchell J. R.: Reactive oxygen species during ischemia-reperfusion injury in isolated perfused rat liver. *J. Clin. Invest.*, 81: 1240-1245, 1988.
24. Jaeschke H., Farhood A.: Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am. J. Physiol.*, 260: G355-G362, 1991.
25. Dawson T. L., Gores G. J., Nieminen A. L., Herman B., Lesmasters J. J.: Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.*, 264: C961-C967, 1993.
26. Yabe Y., Kobayashi N., Nishihashi T., Takahashi R., Nishikawa M., Takakura Y., Hashida M.: Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia-reperfusion injury by Superoxide dismutase and Catalase derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 298: 894-899, 2001.
27. Tappel A. L.: Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.*, 32: 1870-1874, 1973.
28. Jaeschke H., Smith C. W., Clemens M.G., Ganey P. A., Roth R. A.: Mechanism of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 139: 213-226, 1996.
29. Mandel G. L.: ARDS, neutrophils and pentoxifylline, *Am.Rev.Respir. Dis.* (1998) 138
30. 110-1105. 5 Semenzato G.: Tumour necrosis factor a cytokine with multiple biological activities. *Br. J. Cancer*, 1990; 61:354-361.
31. Zhou L. S., Shi J. S., Wang Z. R., Wang L.: Tumor necrosis factor- $\alpha$  in gallbladder and gallstone. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*, 2000; 8: 426-428.
32. De Waal Malefeyt R., Abrams J., Bennett B.: Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulation role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 1991; 174:1309-1220.
33. Livingston D. H., Mosenthal A. C., Deitch E. A.: Sepsis and multipl organ dysfunction syndrome: acinical-mechanistic overview. *New Horizons*. 1995; 3: 276-287.
34. De Maio A., de Mooney M.L., Matesic L. E., et al.: Genetic component in the inflammatory response induced by bacterial lipopolysaccharide. *Shock*. 1998; 10: 319-323.
35. Pruitt J. H., Copeland E. M., Moldawer L. L.: Interleukin-1 and Interleukin-1 antagonism in sepsis systemic inflammatory response syndrome and septic shock. *Shock*. 1995; 3: 235-251.
36. Williams G., Giroir B.: Regulation of cytokine gene expression: tumor-necrosis factor, interleukin-1, and the emerging biology of cytokine receptors. *New Horizons*. 1995; 3: 276-287.
37. Tracey K. J. et al.: Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. 1987; 330: 662-664.
38. Hillegass L. M., Griswold D. E., Brickson B., Albrightson-Winslow C.: Assesment of myeloperoksidase in whole rat kidney. *J. Pharmacol. Method* (1990) 24 285-295.
39. Beuther E.: Glutathione in red blood cell metabolism. *A manuel of biochemical methods* (2'nd edn.). Grune Strutton. New York, 1975. pp. 112-114.
40. Siegers C. P., Riemann D., Thies E., Younes M.: Glutathione and GSH-dependent enzymes in the gastrointestinal mucosa of the rat. *Cancer Lett.* (1998) 40 71-76.