



DENEYSEL KARACİĞER İSKEMİ-REPERFÜZYON OLUŞTURULAN SIÇANLARDA E VİTAMİNİ VE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER'İN (CAPE) METABOLİK ENZİMLERE ETKİLERİ*

EFFECTS OF VITAMIN E AND CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER (CAPE) ON METHABOLIC ENZYMES OF RATS WITH EXPERIMENTAL LIVER ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY

Efkan UZ¹ H. Ramazan YILMAZ² Mustafa IRAZ³ Ersin FADILLIOĞLU⁴ Hüseyin ÖZYURT¹
Sadık SÖĞÜT¹ Ömer AKYOL¹

¹İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Malatya

²İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Malatya

³İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Malatya

⁴İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Malatya

Anahtar Sözcükler: karaciğer, iskemi-reperfüzyon, heksokinaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, laktat dehidrogenaz, malat dehidrogenaz, CAPE, E vitamini

Key words: liver ischemia-reperfusion, hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase, CAPE, E vitamini

ÖZET

Bu çalışmada, deneysel olarak iskemi-reperfüzyon (I/R) oluşturulan sıçan karaciğerlerinde karbohidrat metabolizmasının önemli enzimleri olan heksokinaz (HK), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD), laktat dehidrogenaz (LDH) ve malat dehidrogenaz (MDH) enzimleri çalışılmış ve bu enzimlerin aktivitelerine E vitamini ve kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in etkileri araştırılmıştır. Wistar Albino erkek sıçanlar 10'arlı 4 gruba ayrılmıştır. İskemi-reperfüzyon gruplarına izotonik, E vitamini ve CAPE intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

Izotonik+I/R grubunda sham grubuna göre HK, G6PD ve 6PGD aktiviteleri anlamlı olarak artarken, LDH ve MDH aktiviteleri ise anlamlı olarak azalmıştır. E vitamini uygulanan sıçanların HK ve 6PGD aktivitelerinde izotonik+I/R grubuna göre anlamlı artış varken, LDH ve MDH aktivitelerinde ise anlamlı azalma saptanmıştır. CAPE uygulanan sıçanlar İzotonik+I/R grubu ile karşılaştırıldığında HK, G6PD ve 6PGD aktivitelerinde anlamlı artış ve LDH aktivitesinde anlamlı azalma gözlenmiştir. CAPE ile sham grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. CAPE uygulanan sıçanlar E vitamini grubu ile karşılaştırıldığında HK, G6PD, 6PGD ve MDH aktivitelerinin değerlerinde anlamlı artış oluşmuştur.

Sonuç olarak CAPE'nin, E vitaminine göre hasarlı dokuda glikoliz ve pentoz fosfat yolunun bütünlüğünü daha iyi koruduğu ve hasarı azalttığı, sitrik asit siklusunu da daha aktif tutarak enerji üretimini desteklediği söylenebilir. Bu etkisini direkt olarak bu metabolik enzimlerin indüksiyonunu artırarak/azaltarak değil de, daha önceki çalışmalarımızda da gösterildiği gibi doku hasarını azaltarak indirekt yoldan yaptığını düşünmekteyiz.

SUMMARY

In this study, the activities of liver carbohydrate metabolism enzymes, hexokinase (HK), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD), lactate dehydrogenase (LDH) and malate

Yazışma adresi: Efkan Uz, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyokimya Anabilim Dalı, Malatya

Makalenin geliş tarihi: 07. 02. 2002 ; kabul tarihi: 15. 05. 2002

dehydrogenase (MDH) after experimental ischemia-reperfusion of rat liver and effects of E vitamin and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on these enzyme activities were investigated. Wistar albino male rats were divided into 4 groups each consisting of 10 rats. Isotonic, CAPE and vitamin E were applied intraperitoneally in the I/R groups.

Activities of HK, G6PD and 6PGD were increased and activities of LDH and MDH were decreased in Isotonic+I/R group in comparison with the sham group. Increased activities of HK, 6PGD and decreased activities of LDH and MDH were observed in vitamin E group compared to isotonic+I/R group. In CAPE group, activities of HK, G6PD and 6PGD were increased and activity of LDH were decreased significantly when compared to the Isotonic+I/R group. There was no difference between CAPE and sham groups. Increased activities of HK, G6PD, 6PGD and MDH were detected in CAPE group in comparison with vitamin E group.

As a result, we may conclude that CAPE protects glycolysis and pentose phosphate pathway in the injured tissue more than vitamin E and thus decreases injury via increased nucleic acid synthesis as well as supporting energy production by increased activity of citric acid cycle. We conclude that CAPE produces these effects not directly by decreased/increased metabolic enzyme induction, but by indirectly via decreasing tissue injury as shown in our recent studies.

GİRİŞ

Karaciğer iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı klinikte sıkça karşılaşılan ciddi problemlerden birisidir. Özellikle günümüzde artan karaciğer transplantasyonları bu konunun önemini artırmaktadır. Kan akımı kesilen dokularda birbirini ardı sıra bazı kimyasal reaksiyonlar gelişir. Bu reaksiyonlar sonucu hücresel disfonksiyon, hücresel ve interstisyel ödem, sonuçta hücresel kaos ve ölüm meydana gelir. Hücrelerin canlılığının ve fonksiyonunun devam edebilmesi için gerekli olan temel yakıtın eldesinde oksijen, merkezi bir role sahiptir. Aerobik metabolizmalar normal hücre fonksiyonu için gerekli olan enerjiyi yüksek enerjili fosfat bağlan şeklinde depo ederler. Oksijen yokluğunda anaerobik metabolizma devreye girer ve lokal olarak ilgili dokuda laktik asit konsantrasyonu artar (1). Sonuçta ortaya çıkan asidoz, hücrelerdeki normal enzim kinetiklerini değiştirir ve daha az miktarlarda yüksek enerjili bağlar oluşturur. Homeostazın korunması için gerekli enerji sağlanamaz (2). İskemi ile artan ATP ihtiyacı, glikolizi indükler. Glikolizde merkezi role sahip olan heksokinaz (HK) aktivitesinin ölçülmesi ile ATP üretimi hakkında bilgi sahibi olunabilir (3). İskemi ile aktive olan anaerobik glikoliz sonucunda laktat üretimi artar. Bu reaksiyonlar zincirinin son basamağı olan pirüvatın laktata dönüştüğü ve laktat dehidrogenaz enziminin (LDH) kontrol ettiği reaksiyon iskemi hasarı sonrası önemli bir parametredir (4).

İskemik dokunun tekrar kan akımı ile oksijenlenmesi doku hayatı için önemlidir. Böylece enerji kaynağı tekrar sağlanmakta ve toksik metabolitler uzaklaştırılmaktadır. Bununla beraber iskemik dokuda oluşan toksik metabolitlerin sistemik dolaşıma geçmesi ciddi metabolik bozukluklar doğurabilir. Ayrıca oksijenin iskemik doku tabanında oluşan bazı metabolitlerle reaksiyona girmesi sonucu, dokuda daha ileri hasarlar meydana gelebilmektedir. Buna reperfüzyon hasarı adı verilmektedir (5). Kısa bir iskemik periyottan sonra sağlanan reperfüzyondan sonraki hasar çok zararlı olmasa da uzun süreli iskemilerden sonra oluş-

turulan reperfüzyonda hasar oldukça büyüktür. Reperfüzyon sonrası oluşan serbest oksijen radikallerinin varlığı bu hasarda önemli bir yer tutar (1).

Pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH, okside glutatyonun tekrar redükte formuna dönüşümünde görev alarak antioksidan enzimlerin aktivitelehnin devamlılığı sağlar. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), 6-fosfogluconat dehidrogenaz (6PGD) enzimlerinin yer aldığı reaksiyonlar NADPH üretim noktalarıdır (6). Reperfüzyon ile tekrar oksijenlenen dokular hızla aerobik glikolize yönelme eğilimindedir. Malat dehidrogenaz enzimi (MDH) sitrik asit siklusunun önemli bir enzimi olup, aktivitesinin belirlenmesi siklusun sağlıklı çalışıp çalışmadığı hakkında bilgi veren önemli bir parametredir (7).

Sıcak iskemi-reperfüzyon hasarı insanlarda hemorajik ve kardiyojenik şok, endotoksemi, karaciğer cerrahisi, Budd-Chiari Sendromu ve karaciğer transplantasyonu durumlarında klinik öneme sahiptir (8). İskemiyi takiben kan akımının sağlanması ile oluşan reperfüzyonda geri dönüşümsüz hücre hasarları meydana gelir ve sonuçta karaciğer hücrelerinin ölümü ile sonuçlanır. Bu hücre hasarının derecesini saptamak için kullanılan en önemli testler serumda transaminazlar ve laktat dehidrogenazdır (4).

Yapılan bazı çalışmalarda, I/R'un bazı maddelerin ve enzimlerin seviyelerini değiştirdiği belirtilmiştir (9-11). İskemi-reperfüzyonda oluşan hasarları önlemek için, ticari süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz enzimleri, E ve C vitaminleri, glutatyon, melatonin gibi kimyasallar kullanılmaktadır. Son yıllarda antioksidan özelliği ile dikkat çeken kafeik asit fenetil ester (CAPE), bal arılarında üretilen propolisin aktif bir bileşeni olup, antiinflama-tuvar özelliği ile mikrosirkülasyonu düzeltmektedir (12). Bu etkisi ile I-R hasarında önemli bir koruyucu ajan olarak rol oynadığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan karaciğer I/R'da E vitamini ve CAPE'nin karbohidrat metabolizmasının önemli enzimleri olan HK, G6PD, 6PGD, LDH ve MDH enzimlerinin aktivitelerine etkilerini araştırmak ve oluşan doku hasarını önlemede etkinliklerini gözlemlemek amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Wistar albino erkek sıçanlara mevsimsel gün ışığı ritminde, standart sıçan pellet yem ve çeşme suyu verildi. Çalışmaya alınan sıçanlarda deneylerin tüm aşamalarında "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH Publication 86-23, revised 1985) kurallarına uyulmuştur. 250 g'ı geçen sıçanlar rasgele alınarak cerrahi işlem sırasında gruplandırıldı. Sham operasyon, İzotonik+I/R grup, I/R+CAPE grubu, I/R+E Vitamini grubu şeklinde her biri 10 rat içeren 4 grup oluşturuldu. Sıçanların bir gün önceden standart yemleri kesildi. Sıçanlar tartılarak 1 mg/kg xylazine ile 0.5 ml/kg ketamin intraperitoneal uygulama ile genel anestezi yapıldı. Anestezi edilen sıçanların vücut sıcaklığı korunarak medline insizyonla batinları açılarak, sol ve median loba giden arteria hepatica, vena hepatica ve bilier duktus dalları tespit edilip bulldog klemp ile kleplendi. iskemiyi başlatılmasından 10 dakika sonra E vitamini gruplarına 10 mg/kg E-vitamini (Ephynal, ROCHE), izotonik gruplarına 0.1 ml/kg % 0.9 NaCl çözeltisi ve CAPE grubuna da 10 µmol/kg olacak şekilde peritonea CAPE (%10 etanolde çözünen) uygulandı.

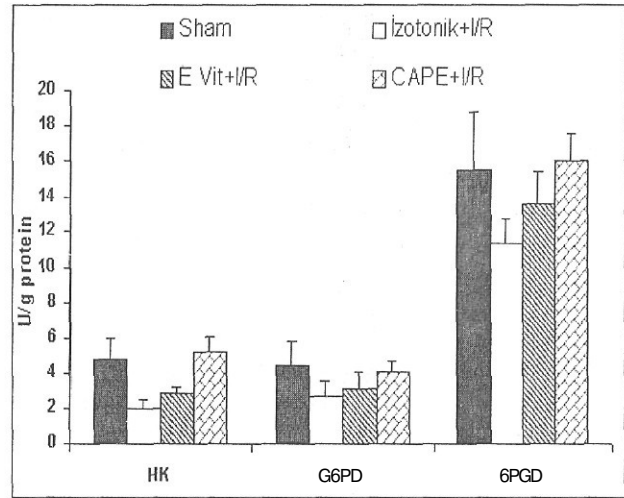
Sıçanların vücut sıcaklığı korunarak bir saatlik iskemiye takiben klemp çıkarıldı ve iki saat reperfüze edildi. Reperfüzyonun sonunda ratların karaciğer dokuları dikkatlice eksizye edildi. Biyokimyasal analiz için, karaciğer dokuları tartıldı, doku ağırlığına orantılı olacak şekilde soğuk Tris-HCl tamponu (50 mmol, pH 7.4) ilave edilerek 16.000 devir/dakika hızda 2 dakika homojenize edildi. Homojenizatlar 3220 rpm/30 dakika +6 °C soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Analiz zamanına kadar (~1 hafta) -40 °C'de bekletildi. G6PD, 6PGD, MDH, LDH ve HK enzimlerinin aktiviteleri süpernatantta ölçüldü. Bu enzimlerin aktiviteleri spektrofotometrik olarak tayin edildi (13,14). Lowry metoduna (15) göre süpernatantta protein tayinleri yapıldı.

İstatistiksel Analizler: istatistikler Windows 95-98 uyumlu SPSS® 7.5 ile yapıldı. Grupların dağılımları Non-parametrik testlerden one-sample Kolmogorov-Smirnov Test ile değerlendirildi. Grupların normal dağılım göstermesinden dolayı grupların karşılaştırılmasında parametrik testlerden one-way ANOVA testi ve Post Hoc testlerden LSD kullanıldı. Grup içi korelasyon analizi için Pearson Korelasyon testi kullanıldı. Değerler ortalama ± standart sapma olarak verildi, istatistiksel anlamlılık için p<0.05 olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

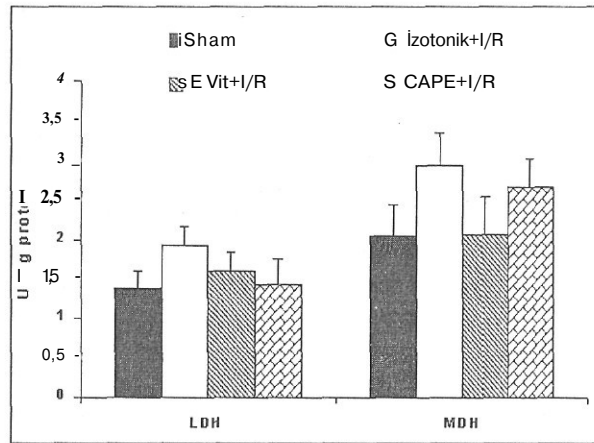
SONUÇLAR

Deneysel karaciğer I/R oluşturulan sıçanlarda E vitamini ve CAPE'nin karaciğer dokularında, G6P.D, 6PGD, MDH, LDH ve HK enzim aktivitelerine etkilerinin sonuçları Tablo 1'de ve Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir.

Yapılan korelasyon analizleri sonucunda, sham grubunda HK ile LDH arasında istatistiksel olarak önemli olan pozitif bir korelasyon bulunmuştur, ($r = 0.697$, $p = 0.025$). CAPE grubunda, LDH ile G6PD arasında anlamlı negatif bir korelasyon gözlenmiştir ($r = -0.649$, $p = 0.042$). E vitamini grubunda, LDH ile MDH arasında önemli pozitif, LDH ile HK arasında anlamlı negatif bir korelasyon bulunmuştur. (Sırasıyla, ($r = 0.722$, $p = 0.018$; $r = -0.635$, $p = 0.049$).



Şekil 1. Sham, İzotonik+I/R, E Vit+I/R ve CAPE+I/R gruplarında HK, G6PD ve 6PGD enzimlerinin aktivite düzeyleri



Şekil 2. Sham, İzotonik+I/R, E Vit+I/R ve CAPE+I/R gruplarında LDH ve MDH enzimlerinin aktivite düzeyleri.

Tablo 1: iskemi-reperfüzyon (I/R) uygulanan karaciğer dokularında bazı metabolik enzimlerin aktiviteleri.

	HK (U/q protein)	G6PD (U/q protein)	6PGD (U/q protein)	LDH (U/mq protein)	MDH (U/mg protein)
I Sham	4.782 ±1.268	4.480 ±1.312	15.58 ±3.20	1.384 ±0.209	2.048 ±0.392
II İzotonik+I/R	2.056 ±0.503	2.764 ± 0.837	11.38 ±1.31	1.909 ±0.246	2.922 ±0.413
III E Vit+I/R	2.871 ±0.365	3.133 ±0.951	13.56 ±1.90	1.592 ±0.246	2.063 ±0.471
IV CAPE+I/R	5.202 ±0.898	4.082 ±0.611	16.01 ±1.57	1.439 ±0.304	2.657 ±0.366
P değerleri					
I-II	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
I-III	0.0001	0.003	0.037	AD	AD
I-IV	AD	AD	AD	AD	0.002
II-III	0.036	AD	0.026	0.011	0.0001
II-IV	0.0001	0.004	0.0001	0.0001	AD
III-IV	0.0001	0.034	0.013	AD	0.003

AD: anlamlı değil.

TARTIŞMA

Son yıllarda karaciğer ameliyat tekniklerinin ileri ölçüde gelişmesi operasyonların kişide problemsiz olarak netice- lenme ihtimalini de artırmıştır. Bütün karaciğer ameliyatla- rında (tümör, travma vs) kanamanın kontrolü ancak bütün afferent damarların okluze edilmesi ile mümkün olabilmek- tedir. Olayın altında yatan sebep ne olursa olsun (ameli- yat, tümör, damar tıkanıklığı, travma vs) sonuçta organ- larda mekanizması birbirine çok benzeyen olaylar zinciri görülür, iskemi-reperfüzyonun ileri aşamalarında dokuda ciddi hasarlar meydana gelmektedir. Hücrede enerjinin elde edildiği esas yol elektron transport zinciri, dolayısıyla mitokondrilerdir. Burada motor güç moleküler oksijendir, çünkü sonuçta elektronlar oksijene aktarılarak su ve ATP oluşturulmaktadır. Oksijenin sağlanamadığı durumlarda hücrenin ATP deposu hızla tükenmektedir. Depo enerjinin tükenmesi ile birlikte membrandan transport işlemleri yapılamaz, statik değil dinamik bir organel olduğundan yeni moleküller kontrollü olarak hücre membranının yapı- sına girip çıkamaz, hücre içi ve dışı ortamlar arasında mevcut olan kimyasal ve elektriksel farklılıklar korunamaz ve membran yavaş yavaş bütünlüğünü kaybetmeye baş- lar. Bu arada reperfüzyonla birlikte başta ksantin oksidaz yolu ile olmak üzere üretilen serbest radikaller membranda lipid peroksidasyon olayını tetikleyerek hücre lizisine kadar varabilen olaylar zincirini başlatır. Hücre içinde üretilen oksijen radikalleri aynı zamanda organel membranlarında da hücre membranında olana benzer peroksidasyon işlemini başlatır.

Karaciğerde I/R hasarının önüne geçebilmek için çalışma- larda, glisin (16), kalsiyum kanal blokerleri (17), trimeta- zidin [1-(2,3,4- trimethoxybenzyl) - piperazine dihydroch- loride vastare] (18), aktive olmuş protein C (APC) (19), Caspaslar (20), koenzim Q (CoCho) ve redükte glutatyon (GSH) (21) denenmiştir.

Biz bu çalışmada iki antioksidan olan E vitamini ve CAPE'nin reperfüzyon hasarına olan etkisini araştırmayı amaçladık. E vitamini veya alfa-tokoferolün suda çözüne- bilen formu olan ve *in vitro* koşullarda mükemmel bir anti oksidan olan trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl- chroman-2-carboxylic acid), peroksil radikallerini daha kuvvetli şekilde yok etmektedir (11).

Kafeik asit fenetil ester yapıcı flavonoidlere benzeyen, bal arılarının bitki özlerinden topladığı propolisin aktif bir bile- şenidir (22). Yapılan araştırmalarda immünomodülatör (23), antioksidan (24-25), antimitojenik (26), antiinflama- tuvar ve antimikrobik (27) olduğu gösterilmiştir. Kafeik asit fenetil ester dolayısıyla antiinflamatuar etkileri ile mikrosirkülasyonu, sitokin üretimini ve Kupffer hücre akti- vasyonunu düzelterek enerji metabolizmasına etki etmek te ve I/R hasarını azaltmaktadır (12). Grunberger ve ark. hücre kültürü ortamında farklı hücre tiplerinin sayısı üzeri ne sentetik CAPE'nin sitostatik aktivitesini incelemişler (28), sonuçta karsinostatik özelliklerinin olduğunu fakat normal hücre büyümesini deştişirmediğini göstermişlerdir.

Son yıllarda üzerinde yoğun çalışmalar yapılan CAPE'nin I/R olaylarında etkinliğinin incelendiği sınırlı sayıda çalış- ma mevcuttur, ilhan ve ark. CAPE'nin spinal I/R hasarına etkisini araştırdıkları çalışmalarında, tavşanlara aort oklüzyonundan 30 dakika önce intraperitoneal yolla CAPE uygulamışlar, hem histolojik hem de biyokimyasal açılardan reperfüzyon hasarını önemli ölçüde azalttığını saptamışlardır (29). Adı geçen çalışmada CAPE'nin lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit düzeyini anlamlı şekilde azalttığını, antioksidan enzimleri ni ise normalize ettiğini gözlemlemişlerdir. Kafeik asit fenetil esterinin sıçan ince barsak I/R hasarına etkisini Kol- tuksuz ve ark. araştırmış, özellikle histolojik kesitlerin skor-laması yapıldığında reperfüzyon hasarından dokuyu koruduğu gösterilmiştir (30). Araştırmacılar CAPE'nin muh- temelen hem oksidan hem de nötrofil infiltrasyonunu azal-

tıcı et-kisi ile reperfüzyon hasarından barsakları koruduğunu iddia etmişlerdir.

Yaptığımız literatür taramalarında CAPE'nin diğer metabolik enzimler üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlayamadık. Bu nedenle çalışmamız CAPE'nin karaciğer metabolik enzimleri üzerine etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

Çalışmamızda, İzotonik+I/R grubu, I/R+CAPE grubu, I/R+E vitamini grubunda Sham grubuna göre G6PD, 6PGD ve HK (I/R+CAPE grubu hariç) enzim aktivitelerinde bir azalma bulunmuştur (Tablo 1). Bu azalma, I/R+CAPE grubu hariç, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.0001$). Hekzokinaz, glikoliziste merkezi bir rol oynar (3). Nitekim, Elimadi ve arkadaşları, karaciğer iskemisiyle ATP miktarını azalttığını belirtmişlerdir (18). Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve 6PGD enzimleri pentoz fosfat metabolik yolunun önemli anahtar rolü oynayan enzimleridir. Pentoz fosfat metabolik yolunun temel amacı redükleyici güce sahip olan $NADPH+H^+$ molekülleri üretmektir. $NADPH+H^+$ lar kolesterol sentezinde, yağ asidi sentezinde, redükte glutatyon sentezinde, steroid hormon sentezinde ve enerji üretiminde kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu metabolik yolda üretilen D-riboz 5-fosfat ve D-deoksiriboz 5-fosfat, nükleik asit sentezinde kullanılmaktadır (6). İskemi reperfüzyon hasarı ile enerji açığı meydana gelen hücrelerde glukoz enerji üretimine yönelecektir. Hem iskemi hem de reperfüzyon ATP üretim yollarını aktive edeceklerdir, iskemi ile anaerobik mekanizmalar aktive olur ve glikoliz artar. Reperfüzyon ile tekrar oksijenlenen dokular ihtiyacı olan ATP için sitrik asit siklusunu çalıştırır. Dokuya hasar yapan bu olaylar sonucu pentoz fosfat yoluna yeterince substrat verilemez ve sonuçta enzim aktivitesi de azalır. Reperfüzyon ile sağlanan ATP ihtiyacından sonra serbest radikal oluşumu da söz konusudur. Reperfüzyon sonrası ATP'nin fazla miktarda üretimi sonucunda pentoz fosfat yolunun regülatör enzimleri inhibe olur (13). ATP'nin acil ihtiyaç olunan yerlerde kullanılmasından sonra aktive olan radikal üretiminin zararlı etkilerinden dokuyu korumak için antioksidan sistemler devreye girer. Bu sistemlerin çalışabilmesi için glutatyonun tekrar redükte hale gelmesi gerekir ve bu da $NADPH$ 'a bağlıdır. Yapılan bazı çalışmalarda, karaciğer I/R'da redükte glutatyon seviyesinin azaldığı belirtilmiştir

KAYNAKLAR

1. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury (Review). British J Surg 1994; 81:637-647.
2. Rhodes RS, DePalma RG. Mitochondrial dysfunction of the liver and hypoglycemia in hemorrhagic shock. Surg Gynecol Obstet 1980; 150:347-352.
3. Magnani M, Stocchi V, Dacha M, Fornaini G. Regulatory properties of rabbit red blood celi hexokinase at conditions close to physiological. Biochimica et Biophys Acta 1984; 804, 145-153.
4. Nieminen AL, Gores GJ, Wray BE, et al. Calcium dependence of bleb formation and celi death in hepatocytes. Celi Calcium 1988; 9:237-246.
5. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. Am J Physiol 1986; 250:G749-753.

(31,32). Uzun süren bir iskemi ve ardından reperfüzyon sonrasında $NADPH$ üretim kavşaklarının çalışmasında başlangıçta beklenen artış, reperfüzyon sonrası artan ATP üretimi ile $NADPH$ üretiminde görev alan enzimlerin inhibisyonu ile beklenen aktivite artışı gözlenmemiştir. Çalışmamızda İzotonik+I/R grubunda gözlemlenen G6PD enzim aktivitesindeki sham grubuna göre olan azalma muhtemelen reperfüzyon ile artan ATP'nin enzimi inhibe etmesine bağlanabilir. CAPE verilen grupta gözlemlenen G6PD enzim aktivitesi antioksidan sistemin korunması ile azalan $NADPH$ ihtiyacı sonucu enzim aktivitesinin korunduğunu düşündürmektedir.

LDH ve MDH enzim aktivitelerinde, her üç deney grubunda da Sham grubuna göre bir artış gözlenmiştir (Tablo 1). Bu artış, Sham grubuna göre, izo-tonik+I/R grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. LDH aktivitesi vücudun hemen bütün hücrelerinde mevcuttur ve yalnız hücrenin sitoplazmasında değişmeden sabit kalır. LDH reaksiyonu iki yönlü bir reaksiyondur. Piruvatı, $NADH+H^+$ varlığında laktata dönüştürür (6,7). MDH enzimi, oksaloasetatı, $NADH+H^+$ varlığında malata dönüştürür. Enzimin mitokondrial ve sitozolik formları bulunmaktadır (7).

iskemi/reperfüzyondan dolayı O_2 miktarı azalırken aşırı miktarda serbest radikaller oluşur. Ortamda yeterli oksijen olmadığı için LDH enzimi $NADH$ 'ı kullanarak, piruvatı laktat'a dönüştürür. Bu da yeterli oksijen olmayan ortamlarda ATP oluşumunu sağlar. Bulgularımız literatür ile uygunluk göstermiştir. Ozaki ve arkadaşları, hepatic reperfüzyondan sonra, serum GOT, GPT ve LDH enzim aktivitelerinin arttığını belirtmişlerdir (31). Ayrıca, Köken ve inel, iskemi grubunda, serum ALT ve LDH seviyelerini, kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır (11).

Sonuç olarak; CAPE'nin, E vitaminine göre hasarlı dokuda glikoliz ve pentoz fosfat yolunun bütünlüğünü daha iyi koruduğu ve böylece nükleik asit sentezini artırarak hasarı azalttığı, sitrik asit siklusunu da daha aktif tutarak enerji üretimini desteklediği söylenebilir. Bu etkisini direkt olarak bu metabolik enzimlerin indüksiyonunu artırarak/azaltarak değil de, daha önceki çalışmalarımızda da gösterildiği gibi doku hasarını azaltarak indirekt yoldan yaptığını düşünmekteyiz.

6. Gözükara EM. Biyokimya 2, 2. Baskı, Evin Matbaası, Malatya, 1994.
7. Araş K, Ersen G. Tıbbi Biyokimya Teorik ve Klinik Enzimoloji. Atatürk Üniversitesi Basım Evi, Ankara, 1988.
8. Lichtman SN, Lemasters JJ. Role of cytokines and cytokine-producing cells in reperfusion injury to the liver [Cytokines in liver injury and repair] *Seminars in Liver Disease* 1999; 19:171-187.
9. Harada N, Okajima K, Kushimoto S, et al. Antithrombin reduces ischemia/reperfusion injury of rat liver by increasing the hepatic level of prostacyclin. *Blood* 1999, 93(1): 157-164.
10. Marubayashi S, Dohi K, Sugino K, Kawasaki T. The protective effects of administered alpha-tocopherol against hepatic damage caused by ischemia-reperfusion or endotoxemia. *Ann N Y Acad Sci* 1989; 570:208-218.
11. Köken T, İnal M. The effect of nitric oxide on ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Clin Chim Acta* 1999; 288:55-62.
12. Khayyal MT, El-Ghazaly MA, El-Khatib AS. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. *Drugs Exp Clin Res.* 1993; 19:197-203,
13. Boehringer Mannheim, Biochemica Information. Glucose 6-phosphate dehydrogenase, Hexokinase, Lactate dehydrogenase, Malate dehydrogenase, 1973; v.1: pages; 99-100, 113-114, 121-122, 125-126.
14. Rudack D, Gözükara EM, Chisholm ME, Holten D. The effect of dietary carbohydrate and fat on the synthesis of rat liver 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1971; 252: 305-313.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Rondall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193, 265-275.
16. Zhong Z, Jones S, Thurman RG. Glycine minimizes reperfusion injury in a low-flow, reflow liver perfusion model in the rat. *Am J Physiol* 1996; 270:G332-338.
17. Bolling SF, Schirmer WJ, Gott VL, et al. Enhanced myocardial protection with verapamil prior to postischemic reflow. *Surgery* 1983; 94:283-90.
18. Elimadi A, Settaf A, Morin D, et al. Trimetazidine counteracts the hepatic injury associated with ischemia-reperfusion by preserving mitochondrial function. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286:23-8.
19. Mizutani A, Okajima K, Jchiba M, Noguchi T. Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation. *Blood* 2000; 95:3781-3787.
20. Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, et al. Caspase inhibition protects from liver injury following ischemia and reperfusion in rats. *Transpl Int* 2000; 13:S568-572.
21. Marubayashi S, Dohi K, Ochi K, Kawasaki T. Protective effects of free radical scavenger and antioxidant administration on ischemic liver cell injury. *Transplant Proc* 1987; 19:1327-1328.
22. Mirzoena OK, Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1996; 55:441-449
23. Dimov V, Ivanovska N, Bankova V, Popov S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivate. *Vaccine* 1992; 10: 817-823.
24. Pascual C, Gonzales R, Torricella RG. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* 1994; 41: 9-13.
25. Krol W, Czuba Z, Scheller S, Gabrys J, Grabiec S, Shani J. Anti-oxidant property of etanolic extract of propolis (EEP) evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. *Biochem Int* 1990; 21: 593-97.
26. Edenharder R, von Petersdorff I, Rauscher R. Antimutagenic effects of flavanoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino- 3 methylimidazol (4,5-f) quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. *Mutat Res* 1993; 287:261-74.
27. Dobrowolski JW, Vohoraq SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SAH, Dandiya PC. Antibakterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory, and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol* 1991; 35:77-82.
28. Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Olts EM, Efras L, Caldwell M, Estevez V, Nakanishi K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 1988; 44:230-232.
29. İlhan A, Koltuksuz U, Özen S, Uz E, Ciraklik H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999; 16:458-463.
30. Koltuksuz U, Özen S, Uz E, Aydin M, Karaman A, Gultek A, Akyol O, Gursoy MH, Aydin E. Caffeic acid phenethyl ester prevents intestinal reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 1999; 34:1458-62.
31. Ozaki M, Nakamura M, Satoshi T, Ota K. Ebselen, a novel anti-oxidant compound, protects the rat liver from ischemia-reperfusion injury. *Transpl Int* 1997; 10:96-102.
32. Marubayashi S, Dohi K, Kawasaki T. Role of free radicals in hepatic reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 723:368-370.

*Bu çalışma, II. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi 31 Ekim-4 Kasım 2001 Kuşadası'nda Poster olarak sunulmuştur.