

Alpaslan TERZİ¹

Fahrettin YILDIZ¹

Sacit ÇOBAN²

Abdullah TAŞKIN³

Muharrem BİTİREN⁴

Nurten AKSOY³

Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı Yapılan Sıçanlarda *Urtica dioica*'nın Karaciğer Üzerine Koruyucu Etkisi

Protective Effect of *Urtica dioica* on Liver Injury Induced by Hepatic Ischemia Reperfusion Injury in Rats

ÖZET

Amaç: Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı yapılan sıçanlarda *Urtica dioica*'nın karaciğer dokusuna koruyucu etkilerini araştırmak amacıyla bu çalışmayı planladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda toplam 30 adet Wistar-albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar, opere sham grup (Grup1), kontrol grup (Grup2) ve *Urtica dioica* tedavi grubu(Grup3) olarak 3 eşit gruba ayrıldı. Tedavi grubuna iskemiden hemen önce ve reperfüzyondan hemen sonra 2 ml/kg intraperitoneal olarak *Urtica dioica* verildi. Karaciğer dokusunda total antioksidan kapasite, total free sülfidril grup, total oksidan durum, oksidatif stress indeksi ve myeloperoksidaz seviyeleri ölçüldü. Ayrıca serumda ALT, AST ve LDH seviyeleri ölçüldü.

Bulgular: Karaciğer dokusunda total antioksidan kapasite ve total free sülfidril grup değerleri tedavi grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı. ($p<0.05$, $p<0.05$). Yine grup 3 te oksidatif stress indeksi ve myeloperoksidaz'ın grup2 ye göre anlamlı olarak azaldığı görüldü ($p<0.05$, $p<0.05$) Tedavi grubunda karaciğer enzim değerleri kontrol grubuna göre belirgin olarak azalmıştı ($P<0.001$). Histolojik doku hasarı tedavi grubunda kontrol grubuna göre daha hafifti.

Sonuç: Sonuç olarak sıçanlarda *Urtica dioica*'nın karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında antioksidan kapasiteyi arttırdığı, oksidatif stresi ve karaciğer enzim seviyelerini azalttığını göstermiş olduk.

Anahtar Kelimeler: *Urtica dioica*, Karaciğer İskemi Reperfüzyon, Oksidan Durum.

ABSTRACT

Background: This study was designed to investigate the effects of *Urtica dioica* on liver ischemia reperfusion injury in rats.

Methods: Thirty male Wistar-albino rats were used in this experimental study. Animals were divided into three groups as sham operated (group 1), control (group 2), and *Urtica dioica* treatment group (group 3). *Urtica dioica* 2ml/kg were administered intraperitoneally before ischemia and immediately after the reperfusion. The levels of total antioxidant capacity, total free sulfidril group, Total oxidant status, Oxidative stress index, and myeloperoxidase in liver tissues were measured. The serum levels of ALT, AST and LDH were also measured

Results: Total antioxidant capacity and total free sulfidril group in liver tissue were significantly higher in group 3 than in group 2. Oxidative stress index and myeloperoxidase in liver tissue were significantly lower in group 3 than the group 2. The levels of liver enzymes in treatment group were significantly lower than those in the control group. Histological tissue damage was milder in the treatment group than that in the control group.

Conclusion: It is concluded that *Urtica dioica* increase the antioxidant capacity and decrease oxidative stress and liver enzymes in the hepatic ischemia reperfusion injury of rats.

Key words: *Urtica dioica*, Hepatic Ischemia Reperfusion, Oxidative status

GİRİŞ

Karaciğer iskemi reperfüzyon (KC-İR) hasarı, özellikle karaciğer cerrahisi ve transplantasyonunda yaygın klinik bir durumdur. KC-İR ilk olarak Toledo-Pereyra ve arkadaşlarının yaptığı deneysel karaciğer nakli sırasında gözlenmiştir (1). KC-İR'nin fizyopatolojisinde karaciğer hasarına neden olan birçok mekanizma vardır. Bu mekanizmalar temelde akut inflamatuvar cevap ile sonuçlanır. Bunun sonucunda iskemik dokuda lökosit agregasyonu ve intertisiyel hücre hasarı oluşur. Bu kompleks mekanizmalar hücre ölümüne,

¹ Genel Cerrahi Anabilim Dalı,
Harran Üniversitesi Tıp
Fakültesi, Şanlıurfa,

² Genel Cerrahi Anabilim Dalı,
Gaziantep Üniversitesi Tıp
Fakültesi Gaziantep,

³ Klinik Biyokimya Anabilim
Dalı, Harran Üniversitesi Tıp
Fakültesi, Şanlıurfa,

⁴ Patoloji Anabilim Dalı,
Harran Üniversitesi Tıp
Fakültesi, Şanlıurfa.

Submitted/Başvuru tarihi:
21. 07. 2009

Accepted/Kabul tarihi:
03. 08. 2009

Registration/Kayıt no:
09 07 54

Corresponding Address

/Yazışma Adresi:

Dr. Alpaslan TERZİ
Genel Cerrahi Anabilim Dalı,
Harran Üniversitesi Tıp
Fakültesi,
63200 Şanlıurfa. Türkiye

Tel: +90-(414)-314 1170

Fax: +90-(414)-315 1181

alpaslanterzi@gmail.com

© 2010 Düzce Medical Journal
e-ISSN 1307- 671X
www.tipdergi.duzce.edu.tr
duzcetipdergisi@duzce.edu.tr

organ fonksiyon bozukluğuna ve sonunda organ kaybına neden olur. (2,3)

Urtica dioica (UD) çeşitli hastalıklarda alternative tedavi olarak kullanılmaktadır. İlaveten literatürde antimikrobial, antiinflamatuvar, analjezik ve antioksidant özellikleri ile ilgili çalışmalar vardır (4,5). Bunlar içinde UD'nin karaciğer üzerine koruyucu etkilerini araştıran çalışmalar da vardır (6,7). Ancak UD'nin KC-İR hasarında koruyucu etkilerini araştıran bir çalışmaya taranabilen literatürde rastlayamadık. Bundan dolayı çalışmamızda UD'nin KC-İR hasarında karaciğer dokusundaki etkilerini araştırmayı planladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda ağırlıkları 180-240 gr arasında olan 30 adet Wistar-albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar, opere sham grup(Grup 1), kontrol grup(grup2) ve *Urtica dioica* tedavi grubu (Grup3) olarak eşit 3 gruba ayrıldı. Tüm sıçanlar standart koşullar altında şebeke suyu ve standart sıçan yemi ile beslendi. Sıçanların anesteziinde Ketamin ve Xylazine kombine kullanıldı. Ketamin 50 mg/kg/im (Ketalar; Parke Davis, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve Xylazine 10 mg/kg/im (Rompun; Bayer AG, Leverkusen, Germany) dozlarında yapıldı. İşlemin devamında anestezi ihtiyacı olan sıçanlara ek doz yapıldı.

Sıçanların karın bölgesi dezenfekte edildikten sonra orta hat insiyonla laparotomi yapıldı. Sham grubuna laparotomi dışında işlem yapılmadı. Diğer 2 gruba karaciğer iskemi reperfüzyon yapıldı. Hepatik arter, v. porta ve koledok mikrovasküler bulldog klemp ile kapatılarak iskemi yapıldı. Atmış dakika iskemi yapıldıktan sonra klempler açılarak 60 dakika reperfüzyon yapıldı.. Tedavi grubuna iskemiden hemen önce ve reperfüzyondan hemen sonra 2ml/kg intraperitoneal olarak UD verildi. Kontrol grubuna sadece serum fizyolojik verildi. İşlemin sonunda tüm sıçanlardan karaciğer dokusu ve kan örnekleme yapıldı. Örnekler analiz için -80 derecede saklandı. Karaciğer dokusunda TAK (Total antioksidan kapasite), SH (total serbest sülfidril grup), TOD (Total oksidan durum), OSİ (Oksidatif stres indeksi) ve MPO (Myeloperoksidaz) seviyeleri ölçüldü. Serumda ise ALT, AST ve LDH seviyeleri ölçüldü. Bu çalışmadaki tüm uygulamalar Ulusal Sağlık Enstitüsünün Hayvan Araştırmaları kurallarına uygun olarak yapılmıştır.

Histopatolojik Değerlendirme

Hayvanlardan alınan karaciğer dokusu % 10'luk formalinle fikse edilip, parafin bloklara gömüldü, 4 µm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen-Eosin'le boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi.

Histopatolojik inceleme tek patolog tarafından yapıldı.

Total Antioksidan Kapasite Ölçümü

TAK ölçümü Özcan Erel tarafından tanımlanan total antioksidan aktivite metodu kullanılarak yapıldı (8). Ölçümün sonuçları µmol Trolox equivalent/l olarak birimlendirilmiştir.

Total Oksidan Durum Ölçümü

TOD ölçümü Özcan Erel tarafından tanımlanan yöntemle yapıldı(9). Ölçümün sonuçları mmol H2O2 Equiv./L olarak birimlendirilmiştir.

Oksidatif Stress İndeksi

OSİ değeri TAK ve TOD değerlerinin % oranı olarak kabul edildi. Öncelikle TAK değerleri mmol/L ye çevrildi. OSİ değeri Formula yöntemine göre hesaplandı (10). OSİ (Arbitrary Unit)=TOS (mmol H2O2 Equiv./L)/TAK (mmol Trolox Equiv./L).

Myeloperoksidaz Aktivite Tayini

MPO enzim aktivitesi, Wei ve arkadaşlarının tanımladığı substrat olarak 4-aminoantipyrine/phenol solusyonunun kullanıldığı H2O2 nin MPO aracılı oksidasyonu prensibine dayanan spektrofometrik yöntem ile tayin edildi (11). Sonuçlar ml/g protein olarak belirlendi.

Total Serbest Sülfidril Grup Aktivite Ölçümü

Serum örneğindeki Sülfidril grup değerleri Hu ve arkadaşları tarafından modifiye edilen yöntemle hesaplandı(12).

İstatistik Analiz

Bağımsız grupların karşılaştırılması Mann-Whitney-U ile yapıldı ve dağılımların düzgün olduğu parametreler Independent student't testi ile doğrulandı. Tüm analizler SPSS v.15.0 yazılımı kullanılarak yapıldı. p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi. Değerler ortalama±standart sapma (SD) olarak verildi.

Urtica dioica Eterik Yağının İzolasyonu:

UD tohumları botaniste teşhis ettirilerek alındı. Öncelikle elektrikli değirmende öğütülerek diyet eter içerisine kondu. Yarım saat kadar çözünmeye bırakılıp ardından filtre edildi. Filtrat, rotary evaporatör aracılığı ile vakum altında eterden ayrıştırılarak eterik yağ ekstresi toplandı. Ekstre, santrifüj cihazında 4.000/dk devirde, 15 dakika süreyle çevrildikten sonra tüpün altında kalan tortu atılıp üstte kalan berrak kısım alındı ve çalışmada bu kısım kullanıldı.

BULGULAR

Kontrol grubu ile sham grubu karşılaştırıldı. Kontrol

grubunda TAK ve SH değerlerinin karaciğer dokusunda istatistiksel olarak anlamlı azaldığı görüldü ($p<0.05$, $p<0.05$). Aynı dokuda TOD, OSİ ve MPO değerlerinin ise anlamlı derecede arttığı görüldü ($p<0.05$, $p<0.05$, $p<0.05$). Tedavi grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında TAK ve SH değerlerinin tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı arttığı görüldü ($p<0.05$, $p<0.05$). Yine tedavi grubunda OSİ ve MPO nun anlamlı azaldığı görüldü ($p<0.05$, $p<0.05$). Ancak TOD değerlerinde anlamlı değişiklik saptanmadı ($p>0.05$). Kontrol grubunda sham grubuna göre ALT, AST ve LDH değerleri anlamlı artmıştı ($p<0.001$). Tedavi grubunda ALT, AST ve LDH değerleri iskemi-reperfüzyon grubuna göre belirgin olarak azalmıştı ($p<0.001$). Tüm parametrelere ait sonuçlar Tablo 1’de özetlenmiştir.

Histopatolojik İnceleme

Histopatolojik değerlendirmede (Resim 1 A, B ve C) sham grubunda karaciğer dokusunda patolojik

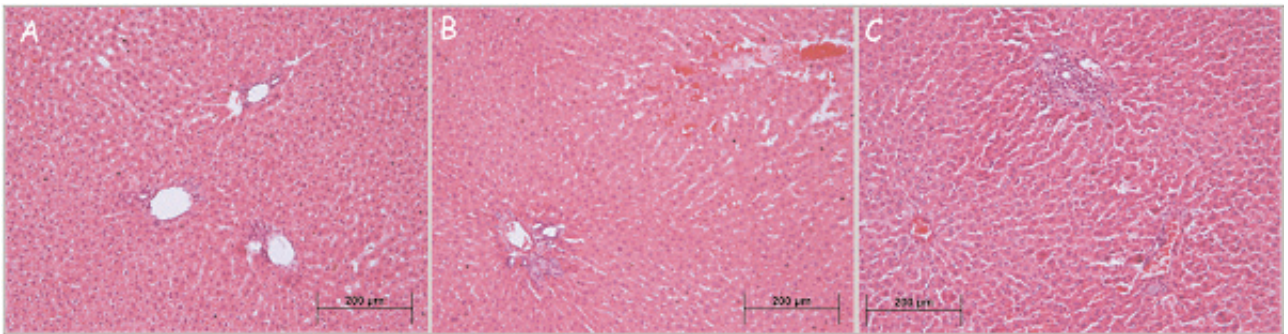
değişiklik saptanmadı (Resim A). Kontrol grubunda karaciğer dokusunda fokal nekroz alanları ve lenosit infiltrasyonları gözlemlendi (Resim B). UD tedavi grubunda kontrol grubundaki patolojik değişiklikler belirgin olarak azalmıştı (Resim C). UD tedavi grubunda doku hasarı kontrol grubuna göre azalmıştı.

TARTIŞMA

KC-İR hasarı özellikle karaciğer cerrahisi ve transplantasyonunda yaygın görülen klinik bir durumdur. Son yıllarda cerrahideki teknik gelişmelerle birlikte karaciğer cerrahisinde belirgin artış meydana gelmiştir. Özellikle karaciğer transplantasyonunun her geçen gün artması nedeniyle karaciğer hasarı ve buna karşı koruyucu maddeler daha da önem kazanmıştır. Bu nedenle iskemi-reperfüzyon hasarı ve bu hasara karşı koruyucu maddeler son yıllarda güncellik kazanmıştır. Biz de bu çalışmamızda antioksidan etkileri bilinen UD’nin karaciğer üzerine koruyucu etkilerini araştırdık.

Tablo 1. Sham, kontrol ve UD tedavi gruplarında; oksidan ve antioksidan parametreler.

	Sham	Kontrol	UD Tedavi	
Klinik Parametreler*	n = 10	n = 10	n = 10	p
AST (U/L)	132±21,6	952±251	452±82,9	$p<00.5$
ALT (U/L)	86,1±16,7	695±206	271±100	$p<00.5$
LDH (U/L)	534±181	4334±759	1988±1297	$p<00.5$
TAK (nmol Trolox Eqv./mg protein)	2,47±0,28	2,09±0,53	3,03±0,44	$p<00.5$
TOD (nmol H2O2 Eqv./mg protein)	49,9±7,32	45,63±6,17	47,2±4,94	$P>00.5$
OSI (Arbitrary Unite)	20,3±3,37	17,97±10,77	15,83±2,22	$p<00.5$
MPO (U/g protein)	401±96,5	583,7±154,8	446,6±186,9	$p<00.5$
SH	0,68±0,01	0,79±0,62	0,91±0,71	$p<00.5$
*(ortalama ± SD)				



Resim 1: Grupların histopatolojik incelemesi.

A. (Sham grup): Normal karaciğere ait bulgular,

B. (Kontrol grup): Fokal nekroz alanları ve lenosit infiltrasyonları,

C. (UD Tedavi grubu): Kontrol grubuna göre azalmış fokal nekroz ve lenosit infiltrasyon alanları.

KC-İR hasarı karaciğer cerrahisinin bir komplikasyonudur, lokal ve uzak hücrel hasara ve organ disfonksiyonuna yol açabilir (13,14). İskemi-reperfüzyon hasarının mekanizması günümüzde halen tam olarak bilinmemektedir. Ancak bazı çalışmalarda hasara yol açan değişik mekanizmalar belirtilmiştir. Bunlar içinde öncelikle inflamatuvar sitokinlerin artışı (TNF- α and IL-6), serbest radikaller ve fagositler sorumlu tutulmuştur (15,16). Reperfüzyon sırasında salınan serbest oksijen radikalleri son zamanlarda vurgulanmaya başlamıştır. Karaciğerinde içinde olduğu çeşitli organlardaki reperfüzyon hasarında mediatör olarak ön plana çıkmışlardır (15,16) Bu nedenle anti-oksidan moleküllerin iskemi-reperfüzyon hasarındaki mekanizmaların farklı basamaklarında hasarı önleyici rol alabileceği söylenebilir.

UD'nin karaciğer üzerinde koruyucu etkilerini araştıran bir çok çalışma vardır (6,7,17). Ancak literatürdeki bu çalışmaların çoğunluğu karaciğer toksisitesine karşı UD'nin etkilerini araştırmıştır. Bu çalışmalar karaciğere çeşitli toksik maddeler verilerek karaciğer toksisitesi oluşturularak yapılmıştır. Türkoğlan ve arkadaşları (6) CCl₄ toksisitesi yapılan sıçan karaciğerlerinde UD'nin koruyucu etkilerini araştırmışlar. Özbek ve arkadaşları (17) ise Phalloidin toksisitesi üzerine UD'nin etkilerini araştırmışlardır. Her iki çalışmada da UD'nin karaciğer toksisitesi üzerine azaltıcı etkilerini göstermişlerdir.

İskemi-reperfüzyon hasarına karşı anti-oksidan özellikleri bilinen birçok madde ile çalışmalar yapılmıştır. KC-İR hasarına karşı da n-asetil sistein, L-arjinin, selenyum ile yapılan çalışmalar vardır (18,19,20). Keleş ve arkadaşları KC-İR hasarı oluşturulan sıçanlarda N-asetil sistein ve Ginkgo Biloba extresinin oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etkilerini araştırmışlar. Çalışmada N-asetil sistein ile ginkgo biloba extresinin DNA hasarına karşı koruyucu etkilerini bulmuşlar. Ayrıca bu koruyucu etkilerin anti-oksidan özellikleri üzerinden oluştuğunu vurgulamışlardır (18). Literatürde DNA hasarına karşı UD'nin etkilerini araştıran çok az çalışma vardır (21). Karaciğerde de DNA hasarına karşı UD'nin etkilerini araştıran çalışmaya rastlamadık. Ancak genelde DNA hasarı ile oksidatif stress birlikte olduğu için UD'nin antioksidan özelliği ile karaciğerde de DNA hasarına karşı koruyucu etkilerinin olabileceğini söyleyebiliriz. Ancak bu konuda çalışmalara ihtiyaç vardır.

Literatürdeki UD ile ilgili çalışmalarda UD'nin dozu ve veriliş yolu değişiklik göstermektedir. UD dozu ile ilgili standart bir doz belirlenmemiştir. Çalışmaların çoğunda UD enteral yolla verilmiştir (6,18). Biz 2

ml/kg dozunda intraperitoneal olarak kullandık. UD'nin optimal dozu hakkında literatürde yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ayrıca veriliş yolu ile ilgili çeşitli çalışmalar olmasına rağmen en etkili veriliş yolu konusunda yeterli bilgiye sahip değiliz. UD'nin karaciğer enzimlerini düşürdüğünü göz önüne alırsak karaciğer toksisitesinin olmadığını söyleyebiliriz. Bu nedenle UD'nin daha yüksek dozlarda kullanılabileceğini ve daha farklı etkilerinin ortaya çıkabileceğini düşünebiliriz. Ancak bu konuda net bilgiler söylemek için daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak UD'nin KC-İR hasarı yapılan sıçanlarda antioksidan kapasiteyi arttırdığını ve oksidatif stresi azalttığını ortaya koymuş olduk. Aynı zamanda UD'nin karaciğer enzimlerini de azaltarak karaciğerin fonksiyonel kapasitesi üzerine olumlu etkilerini göstermiş olduk.

KAYNAKLAR

1. Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Najarian JS: Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation. *Am J Surg.* 129:513-7, 1975.
2. Kaplowitz N. Mechanisms of liver injury. *J Hepatol.* 32:39-47, 2000.
3. Jaeschke H: Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* 284:G15-G26, 2003.
4. Gülçin I, Küfrevioğlu OI, Oktay M, Büyükkuroğlu ME: Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J Ethnopharmacol.* 90: 205-215, 2004.
5. Mittman P: Randomized, double-blind study of freeze-dried *Urtica dioica* in the treatment of allergic rhinitis. *Planta Med.* 56:44-47, 1990.
6. Turkoğlan MK, Özbek H, Yener Z, Tuncer I, Uygan I, Ceylan E: The role of *Urtica dioica* and *Nigella sativa* in the prevention of carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res.* 17: 942-946, 2003.
7. Kanter M, Coskun O, Budancamanak M: Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. *World J Gastroenterol.* 42: 6684-6688, 2005.
8. Erel O: A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.* 37:112-9, 2004.
9. Erel O: A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 38:1103-11, 2005.
10. Bolukbas C, Bolukbas FF, Horoz M, Aslan M, Celik H, Erel O: Increased oxidative stress associated with the severity of the liver disease in various forms of hepatitis B virus infection. *BMC Infect Dis.* 5:95, 2005.
11. Wei H, Frenkel K: Relationship of oxidative events and DNA oxidation in senear mice to in vivo promoting activity of phorbol ester-type tumor promoters. *Carcinogenesis.* 14:1195-1201, 1993.

12. Hu ML, Louie S, Cross CE, Motchnik P, Halliwell B: Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *J Lab Clin Med.* 121:257-62, 1993.
13. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA et al: The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology.* 23:506-14, 1996.
14. Jaeschke H, Farhood A: Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol.* 260(3 pt 1):G355-62, 1991.
15. Yuan GJ, Ma JC, Gong ZJ, Sun XM, Zheng SH, Li X: Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol.* 11:1825-1828, 2005.
16. Zhang SJ, Shi JH, Tang Z, Wu Y, Chen S: Protective effects of glycine pretreatment on brain-death donor liver. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 4:37-40, 2005.
17. Özbek H, Tuncer İ, Dülger H, Uğraş S, Bayram İ, Türkođan K, Uygan İ: E Vitamini, N-Asetil Sistein, Penisilin-G ve Urtica dioica L.'nin Phalloidin Toksisitesi Üzerine Etkileri. *Van Tıp Dergisi.* 12(1);16-21, 2005.
18. Keles MS, Demirci N, Yildirim A, Atamanalp SS, Altinkaynak K: Protective effects of N-acetylcysteine and Ginkgo biloba extract on ischaemia-reperfusion-induced hepatic DNA damage in rats. *Clin Exp Med.* 8(4):193-8, 2008.
19. Gong J, Lao XJ, Zhang SJ, Chen S: Protective effects of L-arginine against ischemia-reperfusion injury in non-heart beating rat liver graft. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 7(5):481-4, 2008.
20. Zapletal C, Heyne S, Breitreutz R, Gebhard MM, Golling M: The influence of selenium substitution on microcirculation and glutathione metabolism after warm liver ischemia/reperfusion in a rat model. *Microvasc Res.* 76(2):104-9, 2008.
21. Toldy A, Stadler K, Sasvári M, Jakus J, Jung KJ, Chung HY, Berkes I, Nyakas C, Radák Z: The effect of exercise and nettle supplementation on oxidative stress markers in the rat brain. *Brain Res Bull.* 65(6):487-93, 2005.