

# Renal İskemi Reperfüzyonun İndüklediği Uzak Karaciğer Hasarında Koenzim Q10'un Koruyucu Etkisi

## The Protective Effect of Coenzyme Q10 on the Renal Ischemia Reperfusion Induced Liver Injury

© Aylin Akbulut<sup>1</sup>, © Buğra Bilge Keseroğlu<sup>2</sup>, © Gökhan Koca<sup>1</sup>, © Cem Nedim Yüçetürk<sup>2</sup>, © Berat Cem Özgür<sup>2</sup>, © Hatice Süner<sup>3</sup>, © Elmas Ögüş<sup>3</sup>, © Nihat Yumuşak<sup>4</sup>, © Jale Karakaya<sup>5</sup>, © Meliha Korkmaz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Nükleer Tıp Kliniği, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Üroloji Kliniği, Ankara, Türkiye

<sup>3</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Kliniği, Ankara, Türkiye

<sup>4</sup>Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

<sup>5</sup>Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

### Öz

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı renal iskemik reperfüzyon (RIR) sonrası ortaya çıkan karaciğer hasarına karşı, anti-oksidan ve anti-enflamatuvar özellikleri bilinen koenzim Q10'un etkinliğini göstermektir.

**Gereç ve Yöntem:** Deneysel RIR modeli oluşturulmak üzere sıçanlar üç gruba ayrıldı. Grup 1 sıçanlar Sham grubu olarak belirlendi. Grup 2 sıçanlara herhangi bir ilaç uygulanmadan RIR yapıldı. Grup 3 sıçanlara RIR öncesi koenzim Q10 verildi. Tüm gruplarda serumda üre, kreatinin, aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP), laktat dehidrojenaz (LDH) ve gama-glutamil transferaz (GGT) değerlerine bakıldı. Oksidatif stres değerlendirmesi için karaciğer dokusunda malondialdehit (MDA), toplam sülfidril (SH), toplam nitrit (nitrit) ve miyeloperoksidaz (MPO) düzeyleri değerlendirildi. Tüm dokular patolojik olarak incelendi. İlave olarak kaspaz-3 ve TUNEL ile apoptotik parçalanma sonucu ortaya çıkan DNA fragmantasyonu histokimyasal olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Üre ve kreatinin seviyelerinin yanı sıra ALP, ALT, AST, GGT ve LDH seviyeleri grup 2'de Sham grubuna göre anlamlı artış göstermiştir. Bu artış grup 3'te anlamlı olarak azalmaktadır. Doku testlerinden MDA, nitrit ve MPO düzeylerinde grup 2'de Sham grubuna göre anlamlı artış, SH düzeyi grup 2'de anlamlı azalış gözlenmektedir. Koenzim Q10 kullanan grupta ise grup 2 ile karşılaştırıldığında MDA, nitrit ve MPO düzeyleri azalmaktadır. Histopatolojik değerlendirmede grup 2 skorlarında, Sham grubu ile karşılaştırıldığında skorlamada anlamlı artış gözlemlendi. Ayrıca grup 3'te grup 2'ye göre histopatolojik skorlamadaki azalma anlamlı bulundu. Yine kaspaz-3 ve TUNEL boyanmalarında grup 2'de grup 1'e göre anlamlı artış gözlenirken, grup 3'te grup 2'ye göre anlamlı azalma izlenmektedir.

**Sonuç:** Koenzim Q10 kullanımı ile RIR sonrası karaciğer dokularında gerek histopatolojik olarak ve gerekse serum testlerinde ve doku oksidatif stres düzeylerinde iyileşme gözlenmesi, koenzim Q10 kullanımının RIR sonrası gelişen karaciğer hasarına karşı korumada önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Koenzim Q10, Renal İskemi Reperfüzyon, Uzak Organ Hasarı, Anti-oksidan, Anti-enflamatuvar

### Abstract

**Objectives:** The aim of this study was to show the efficacy of coenzyme Q10, known as anti-oxidant with anti-inflammatory properties, in liver damage after renal ischemia-reperfusion (RIR).

**Materials and Methods:** For this purpose, rats were divided into three groups to design an experimental RIR model. Group 1 rats were Sham group. Group 2 rats underwent RIR without any medication. Group 3 rats were given coenzyme Q10 before RIR. In order to evaluate the damage, serum urea, creatinine, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH) and

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Aylin Akbulut

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Nükleer Tıp Kliniği, Ankara, Türkiye

Tel.: +90 533 646 16 31 E-posta: aylinbaskin@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0003-4665-7895

Geliş Tarihi/Received: 30.01.2019 Kabul Tarihi/Accepted: 15.04.2019

©Telif Hakkı 2019 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

Yayınlanan tüm içerik CC BY-NC-ND lisansı altındadır.



gamma glutamyl transferase (GGT) levels were investigated and additionally tissue (MPO), malondialdehyde (MDA), total sulfhydryl (SH), total nitrite and myeloperoxidase (MPO) levels were investigated. Histopathologic examination was performed for all groups and DNA fragmentation resulting from apoptotic fragmentation was evaluated with caspase-3 and TUNEL with immunohistochemical methods.

**Results:** Urea and creatinine levels and also ALP, ALT, AST, GGT and LDH levels were significantly increased in group 2 compared to the Sham group. These increases were significantly lower in group 3. The tissue levels of MDA, nitrite, and MPO were significantly increased in group 2 compared to the Sham group, and SH levels were significantly decreased in group 2. In the group 3 rats, MDA, nitrite and MPO levels were decreased when compared to group 2. Additionally there was a significant increase in histopathologic scores in group 2 compared to the Sham group, whereas the decrease in histopathologic scores of group 3 was found to be significant when compared to group 2. Similarly, caspase-3 and TUNEL scores were significantly high in group 2 compared to Sham group and the scores were significantly low in group 3 compared to group 2.

**Conclusion:** Coenzyme Q10 improved the histopathological findings, the serum tests and tissue oxidative stress levels in post-RIR liver tissues. Our results show that coenzyme Q10 can play an important role in protection of liver against RIR-induced damage.

**Key Words:** Coenzyme Q10, Renal Ischemia-reperfusion, Distant Organ Injury, Anti-oxidant, Anti-inflammatory

## Giriş

Renal iskemi-reperfüzyon (RIR) hasarı sekonder travma, şok, sepsis gibi durumlarda, renal transplantasyon, kardiyovasküler ve renal cerrahiler sonrasında sıklıkla görülebilen ciddi ve yaygın bir klinik olay olup böbrek fonksiyon bozukluğu yanı sıra beyin, kalp, akciğer ve karaciğer gibi uzak organ disfonksiyonu ile sonuçlanabilir (1). Bu çoklu organ yetmezliği, RIR hasarı sonrası gelişen yüksek mortalite oranından sorumludur. Akut renal hasar gelişen hastalarda hepatik disfonksiyon birlikteliği sıklıkla görülmektedir (2).

Koenzim Q10, özellikle kalp, karaciğer, böbrek ve pankreasta olmak üzere vücutta birçok organ ve kimyasal reaksiyonun düzgün çalışması için gerekli olan, antioksidan, anti-enflamatuvar ve anti-apoptotik aktiviteye sahip vitamin benzeri bir maddedir (3). Gıdalardan kırmızı et ve deniz ürünlerinden az miktarda alınabilmekle birlikte, doku düzeyleri insanda yaşla birlikte, artan gereksinimlerle, üretim ya da sentez için gerekli kimyasal öncüllerin yetersiz alımı azalmaktadır (3,4).

Daha önce yapılan çalışmalarda çeşitli karaciğer hasarlarında koenzim Q10'un antioksidan, anti-enflamatuvar ve anti-apoptotik etkileri ile terapötik bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (5,6). Yine, koenzim Q10 oksidatif stresi, lipidlerin ve proteinlerin peroksidasyonunu önlemenin yanı sıra adenozin trifosfat sentezinde yararlı bir etki göstermektedir. Bu etkilerin, iskemi ve reperfüzyon sırasında oksidatif stresin neden olduğu hasarı maskelenmesinde önemli bir rol oynadığı da gösterilmiştir (7). Güncel hayvan çalışmaları koenzim Q10'un akut pankreas hasarını anti-enflamatuvar ve anti-oksidan rolü ile iyileştirdiğini (8), akut miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarında ise antioksidan seviyelerini ve oksidan dengesini düzenleyerek, otofajiyi artırdığı, miyokard apoptozunu azalttığı ve kalp fonksiyonunu geliştirdiği gösterilmiştir (9). Ayrıca koenzim Q10'un böbrek taşı tedavisi öncesi kullanımının böbreklerde hasarı azalttığı da gösterilmiştir (10). Koenzim Q10 kullanımını RIR sonrası gelişen karaciğer hasarına etkisi ile ilgili çalışma literatür taramasında bulunmamaktadır.

Biz çalışmamızda klinik olarak renal taş veya tümör ameliyatlarında sıklıkla uygulanan tek taraflı RIR sonrası gelişen karaciğer hasarını azaltmada koenzim Q10'un etkisini inceledik.

## Gereç ve Yöntem

### Deney Hayvanları

200-250 g ağırlığındaki dişi Wistar-Albino sıçanlar kullanıldı. Hayvanların çalışma öncesi laboratuvar koşullarına uyumu için ez an 1 hafta beklendi. Hayvanlar standart ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$  oda sıcaklığı ve %65-70 bağıl nem) laboratuvar koşulları altında 12'şer saatlik karanlık ve ışık döngüleriyle yerleştirildi. Çalışma sırasında, sıçanlara standart yem ve su ad libitum olarak verildi.

### DeneySEL Tasarım

Bu çalışmada kullanılan tüm deney protokolleri, hayvan deneyleri ile ilgili uluslararası düzenlemelere ve beyanlara göre yapılmış olup, çalışmamız için Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (08.10.2018/0049-548). grup 1 sıçanlar Sham grubu olarak alındı ve RIR uygulanmadı ancak sıçanlara ketamin (80 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile anestezi verilerek, abdominal olarak uzunlamasına kesi yapıldı ve sol renal pedikül serbestleştirildi. Grup 2 hayvanlara aynı prosedür uygulandıktan sonra sol renal pedikül izole edildi ve stabilizasyon süresinden sonra 45 dakika boyunca sol böbrek pedikülünün vasküler klemple ile sıkıştırılmasıyla böbrek iskemisi yapıldı. Sıvı ve ısı kaybını önlemek için de batın içerisine 2-3 mL sodyum klorür (NaCl) verilerek abdomen geçici olarak kapatıldı. Kırk beş dakika sonra klemple çıkarıldı ve böbreğin reperfüzyonu vizüel olarak gözlemlendi. Abdominal duvar 3-0 ipek ile kapatılarak cerrahi işlem sonlandırıldı. Grup 3 sıçanlara grup 2 sıçanlara uygulanan deneysel iskemi modeli öncesi 1 hafta boyunca 10 mg/kg dozda koenzim Q10 (Solgar Co., ABD) intraperitoneal olarak uygulandı (11). Tüm sıçanlar RIR'den 24 saat sonrasında 50 mg/kg intraperitoneal propofol (Abbott Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye) yüksek doz anestezi altında sakrifiye edildi ve karaciğer ve böbrek dokuları incelemeler için eksize edildi.

### Histolojik Analiz

Patolojide çalışılacak testler için dokulardan örnekleme alınarak aynı gün serum fizyolojik içinde patoloji laboratuvarına teslim edildi. İzole edilen sol böbrek dokularında iskemi bulguları histopatolojik olarak doğrulandı. Karaciğer dokuları ışık mikroskobu için %10 nötr tamponlu formalin (pH 7,2-7,4) ile sabitlendi ve 4 µm kalınlığında parafin kesitleri hematoksil-eozin ile boyandı. Örnekler, 40-400 kat büyütmede ışık mikroskobu (Olympus BX-50; Olympus, Tokyo, Japonya) kullanılarak kesitler maskelenerek değerlendirildi. Mikroskopik hasarı hiperemi, sitoplazmik vakuolleşme, dejenerasyon ve nekroz açısından 0-3 arası, 4'lü skorlama sistemi (skor 0: yok, skor 1: nadir, skor 2: pozitif, skor 3: güçlü pozitif) ile değerlendirildi.

### İmmünohistokimyasal Metotlar

İmmünohistokimyasal boyamalar primer antikoru prospektüsündeki talimatlar doğrultusunda streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile yapıldı. Bu amaçla parafin bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler ile izinli lama alınan kesitler alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek dehidrate ve deparafinize edildi (12). Dokulardaki antijenin geri kazanımı için kesitler cam şalede içerisinde 700 W'da 20 dakika pH 6,0 sitrat buffer ile muamele edildi. Ardından peroksidaz aktivitesini baskılamak amacıyla kesitler 15 dakika oda sıcaklığında %0,3 hidrojen peroksitte bekletildi. Primer antikordan önce ise 20 dakika oda sıcaklığında %5 normal keçi serumunda protein baskılaması yapıldı. Daha sonra kesitler kaspaz-3 (1:200, Invitrogen, PA5-16335) primer antikoru damlatılarak 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Fosfat tamponu tuzlu su (PBS) ile yıkanan kesitler 30 dakika sekonder antikorda bekletildikten sonra reaksiyonun görünürlüğünü sağlamak amacıyla kromojen olarak diaminobenzidine 3 dakika (DAB, TA-012-HDC ve DAB substrate buffer, TA125-HDS; Lab Vision) ve zemin boyaması için Harris hematoksilin (Merck) kullanıldı. İmmünohistokimyasal boyama işlemleri nemli kamerada gerçekleştirildi (13).

Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated Deoxyuridine Triphosphate Nick end Labeling (TUNEL) işaretlemeleri üretici firma katalog prosedürüne [In Situ Cell Death Detection Kit, Peroksidaz (POD), Roche, Germany] uygun olarak yapıldı. Bu amaçla parafin bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler ile izinli lama alınan kesitler alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek dehidrate ve deparafinize edildi. Ardından peroksidaz aktivitesini baskılamak amacıyla kesitler 15 dakika oda sıcaklığında %0,3 hidrojen peroksitte bekletildi. PBS ile yıkanan kesitler protein K (20 mg/mL; Roche, Mannheim, Almanya) ile oda sıcaklığında 15 dakika muamele edildi. Yıkanan kesitler daha sonra taze hazırlanan 50 µL TUNEL reaksiyon karışımı (TdT ve dUTP içeren) solüsyonunda karanlık ortamda 37°C'de 1 saat bekletildi. Ardından kesitler 50 µL of anti-floresan antikor bağlı POD enzim homojen etiyula kaplanarak 30 dakika 37°C'de bekletildi. Son olarak yıkanan kesitler AEC (3-Amino 9-Ethyl

Carbasole, Dako, Glostrup, Danimarka) ile 10 dakika muamele edildikten sonra hematoksilin ile geri boyama yapılarak yapılandırıldı.

İmmünohistokimyasal ve TUNEL boyamaları ışık mikroskopta incelendi. Bu amaçla kesitler x200 büyütmede rastgele 10 sahada pozitif ve negatif hücreler dikkate alınarak yapıldı ve 0-3 arası, 4'lü skorlama sistemi (%1'den az pozitiflik: 0 skor; %1 ile %25 arası pozitiflik: 1 skor; %25 ile %75 arası pozitiflik: 2 skor; %75'ten fazla pozitiflik: 3 skor) ile değerlendirildi (14).

### Serumdaki Ölçümler

RIR'den 24 saat sonrasında, reperfüzyon döneminde, hayvanlar tekrar anestezi etkisine alındı ve aorttan kan ve serum örnekleri elde edildi. Örnekler hepatik enzim ölçümüne kadar -20°C derecede tutuldu. Serumda aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP), laktat dehidrojenaz (LDH) ve gama-glutamil transferaz (GGT) değerlerine Roche Cobas 8000 (Roche Diagnostics, North America) otoanalizöründe, Roche orijinal kitleri kullanılarak çalışıldı.

### Karaciğer Doku Testleri

Dokuda çalışılan tüm testler homojenizasyon sağlandıktan sonra -80°C'de saklandı ve takip eden gün içerisinde çalışıldı.

Malondialdehit (MDA) düzeyleri tiyobarbitürik asit reaktif madde ile reaksiyona girmesi esasına göre ölçülür (15). Doku örnekleri tartılarak soğuk %1,15'lik KCl (potasyum klorür) ile buzlu ortamda homojenize edilerek %10'luk homojenat oluşturuldu. Homojenat 15 dk süre ile 4000 rpm'de, +4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatandan plazma MDA düzeyi için 50 µL alınarak üzerine 1 mL distile su konuldu. Karışıma 1 mL TBA reaktifi (8,75 mol/L asetik asit içinde hazırlanmış 29 mmol/L'lik TBA) eklendi. Vortekle karıştırılarak kaynayan su banyosunda 60 dk bekletildi. Banyodan çıkartılan ve soğutulan numunelerin üzerine 5 mol/L'lik HCl'dan 25 µL ve 3,5 mL n-butanol eklendi. Örnekler 5 dakika ajite edildi. 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst fazdan eksitasyon dalga boyu 525 nm emisyon dalga boyu 547 nm olacak şekilde florometrede ölçüldü. Doku MDA düzeyleri µmol olarak yaş doku gramı başına hesaplandı MDA µmol/gr yaş doku).

Miyeloperoksidaz (MPO) ölçümü, MPO tarafından oksitlenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin o-dianisidini redüklemesi ve bu redüklenmiş ürünün 460 nm dalga boyunda absorbanasının ölçülmesi esasına dayanır. Yaklaşık 50 mg'lık tartılan doku örnekleri, 50 mmol/L fosfat tamponunda (pH 6) hazırlanan 1 mL soğuk %0,5 heksadesiltrimetilamonyum bromür ile 4 °C'de 30 s için üç kez dondurma/çözülme döngüsüne tabi tutularak homojenize edildi. Homojenat 40.000x gr'de 15 dakika santrifüjlendi. MPO aktivitesi, 2,9 mL 50 mmol/L fosfat tamponuna (167 mg/mL o-dianisidin dihidroklorür ve %0.0005 hidrojen peroksit içeren) 0,1 mL süpernatanın eklenmesiyle belirlendi. Beş dakikalık bir

süre boyunca 460 nm'de absorpsiyon değışimi 25°C de ölçüldü. 1 ünite MPO 1 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi 1 dakikada degradasyona uğratan enzim miktarı olarak tanımlandı. Gram protein başına düşen MPO aktivitesi hesaplanarak sonuçlar spesifik aktivite olarak değerlendirildi ( $\Delta\text{abs./g doku proteini}-1. \text{minimum}-1$ ) (16).

Sedlak ve Lindsay (17) tanımlamış olduğu yöntemle göre dokuda toplam sülfidril (SH) tayini yapıldı. Yöntem SH gruplarının ditiyobis nitrobenzoik asit (DTNB) reaktifi ile alkali ortamda oluşturduğu kromojen bileşiminin 412 nm'de absorpsiyonunun ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Doku örnekleri tartılarak soğuk 0,02 M EDTA içinde buzlu ortamda homojenize edildi. Homojenizat 15 dk süre ile 4000 rpm'de, +4 °C'de santrifüj edildi. 0,25 mL süpernatant alınarak üstüne 0,75 mL Tris tampon (0,2 M), 0,05 mL DTNB, 0,01 M etanol içinde çözündürülmüş ve 3,95 mL metanol ilave edildi. Tüpler vortekslenildikten sonra 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Tüpler 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede 412 nm'de okundu. Doku total SH düzeyleri nmol olarak mg protein başına hesaplandı. Protein içeriği, Roche Hitachi Cobas C501 otoanalizörü kullanılarak orijinal TPUC3 total protein kiti kullanılarak ölçüldü.

Nitrit düzeylerinin ölçümü için Smarason et al. (18) tarafından modifiye edilen kolorimetrik yöntem kullanıldı. Buradaki temel prensip nitrat'ın nitrat redüktaz enzimi ile nitrite çevrilmesine dayanır. Total nitrit düzeyleri Griess reaksiyonuyla ölçülür. Oluşan reaksiyon ürünü pembe renk verir ve absorpsiyon ölçümleri 548 nm'de spektrofotometrik olarak yapılır. Çalışmada standart olarak 1000  $\mu\text{mol/L}$  konsantrasyonundaki stok sodyum nitrit çözeltisinden 12,5, 5, 25, 50, 100  $\mu\text{mol/L}$  konsantrasyonda çalışma standartları hazırlanılarak kullanıldı. Doku total nitrit düzeyleri  $\mu\text{mol/mg}$  yaş doku başına hesaplandı.

### İstatistiksel Analiz

Sayısal değişkenlerin normal dağılıp dağılmadığını incelemek için Kolmogorov-Smirnov testi kullanılmıştır. Normal dağılım gösteren sayısal değişkenler için ortalama  $\pm$  standart sapma, normal dağılmayan değişkenler için ortanca (minimum-maksimum) değerler tanımlayıcı istatistik olarak verilmiştir. Normal dağılım gösteren sayısal değişkenleri üç grupta karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi, normal dağılmayanlar için Kruskal-Wallis yöntemi kullanılmıştır. Karşılaştırmalarda  $p < 0,05$  olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Analizler IBM SPSS Statistics 23.0 programında yapılmıştır.

### Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

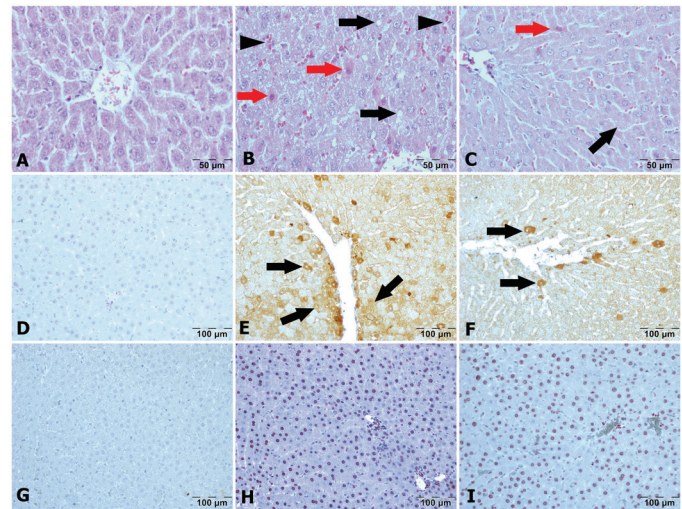
Histopatolojik olarak Sham grubun sıçanların dokularında belirgin patolojik bulgu gözlenmezken, grup 2'de belirgin hiperemi, sitoplazmik vakuolleşme, dejenerasyon ve nekroz gözlemlendi. gruplar arası farklılık Tablo 1'de gösterilmiştir. Grup 1 ve grup 2 tüm değerlendirme skorlamaları arası istatistiksel fark  $p < 0,01$  bulunurken; grup 1 ve grup 3 tüm değerlendirmelerde skorlamaları arası anlamlı istatistiksel fark yoktu ( $p > 0,05$ ).

Grup 2 ve grup 3 histopatolojik skorlamaları arası farklılık hiperemi, sitoplazmik vakuolleşme, dejenerasyon ve nekroz için  $p < 0,01$  olarak bulundu. Grup 2'de gözlenen histopatolojik değişiklikler grup 3'te anlamlı olarak iyileşmiştir (Şekil 1A, 1B, 1C). Kaspaz-3 boyanmasında grup 1 ile grup 3 arasında anlamlı fark bulunmazken, grup 1 ve grup 2 istatistiksel olarak anlamlı fark ( $p < 0,001$ ) saptandı. Benzer şekilde kaspaz-3 boyanmasında grup 2 ve grup 3 arasında da istatistiksel anlamlı fark ( $p < 0,05$ ) bulundu (Şekil 1D, 1E, 1F).

TUNEL boyama skorlanmasında ise grup 1 ve grup 3 arasında anlamlı fark bulunmazken ( $p > 0,05$ ), grup 1 ve grup 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0,001$ ). Grup 2 ve grup 3 arasında TUNEL skorlama medyan değerler grup 3'te daha düşük bulundu ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 1G, 1H, 1I). Ayrıca tüm sıçanların sol böbrek dokuları histopatolojik olarak incelenmiş olup, grup 2 ve grup 3'ün sol böbrekleri iskemiden zarar görmüş, grup 1 sol böbrekleri ise normal olarak değerlendirilmiştir.

### Biyokimyasal Serum ve Doku Değerlendirme Sonuçları

Tablo 2'de biyokimyasal serum değerlerinin gruplar arası karşılaştırması mevcuttur. Serum üre ve kreatinin değerleri tüm gruplar arası anlamlı farklılık bulunmuştur. Gruplar arası farklılıklar değerlendirildiğinde, serum üre ve kreatinin değerleri grup 1 ile grup 2 arasında da anlamlı olarak artmış bulunmuştur.



**Şekil 1:** A) 50x büyütmede hematoksilen-eozin ile boyanmış kesitlerde Grup 1 normal karaciğer histolojisi, B) Grup 2 dokularında siyah oklar sitoplazmik vakuolleşme, kırmızı oklarla nekroz ve dejenerasyon alanları, ok başları ile hiperemi, C) Grup 3, koenzim Q10 ile modellenmiş sıçanlarda siyah ok sitoplazmik vakuolleşme, kırmızı ok ile nekroz ve dejenerasyon alanlarını göstermektedir. 100x büyütmede kaspaz-3 boyanması D) Grup 1 ratlarda gözlenmezken, E) Grup 2 sıçanlarda oklar Kaspaz-3 pozitifliği, F) Koenzim Q10 ile modellenmiş sıçanlarda rölatif olarak maskelenmiş kaspaz-3 pozitifliği gözlenmektedir. 100x büyütmede TUNEL boyanması, G) Grup 1 sıçanlarda gözlenmemekte, H) Grup 2'de belirgin pozitif olarak, I) Grup 3 dokularında grup 2'ye göre boyanmanın maskelendiği gözlenmektedir.

(üre ve kreatinin için sırasıyla,  $p<0,01$ ,  $p<0,01$ ). Grup 3 serum üre ve kreatinin değerlerinde ise Grup 2 ile karşılaştırıldığında anlamlı azalma bulunmuştur (üre ve kreatinin için sırasıyla,  $p<0,01$ ,  $p<0,05$ ). Grup 1 ve grup 3 serum üre ve kreatinin değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmamıştır (her iki parametre için  $p>0,05$ ).

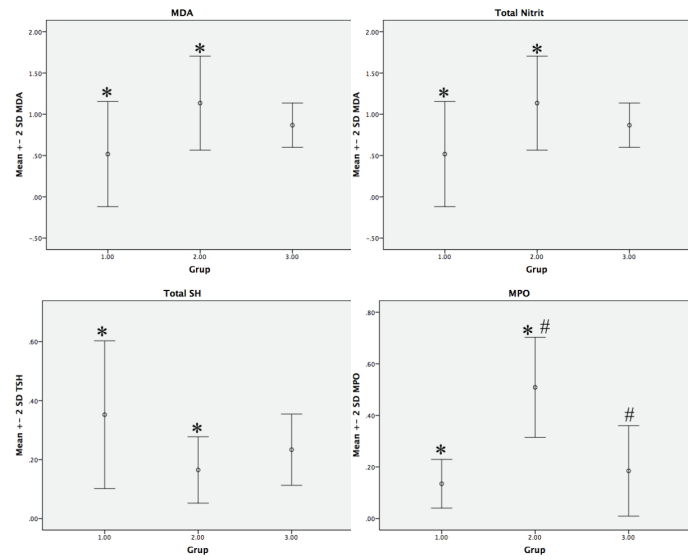
Serum AST, ALT, LDH, GGT ve ALP değerleri için tüm gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur. Grup 2'de AST, ALT, LDH, GGT ve ALP değerleri grup 1'e oranla artmış olarak izlenmekte, bu fark tüm parametreler için istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,01$ ) bulunmuştur. Bu değerler grup 3'te grup 2'ye göre azalma göstermekle olup bu azalma tüm değerler için anlamlı olarak saptandı ( $p<0,05$ ). Ayrıca grup 1 ve grup 3 arası AST, ALP, ALT, GGT ve LDH değerleri için anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Dokuda değerlendirilen MDA, nitrit, SH ve MPO değerleri için tüm gruplar arası istatistiksel farklılık saptanmıştır. Bu fark grup 1 ve grup 2 arası tüm değerler için anlamlı bulunmuştur (tüm değerler için  $p<0,01$ ). Ayrıca grup 2 ile karşılaştırıldığında grup 3 MPO değerlerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Şekil 2). Grup 2 MDA ve nitrit değerleri grup 3 ile karşılaştırıldığında MPO değerlerinde sayısal olarak azalma görülmekle birlikte bu fark anlamlı bulunmamıştır. Yine doku SH değerleri ise grup 3'te grup 2'ye göre sayısal değerleri artmakla birlikte, bu fark anlamlı tespit edilmemiştir ( $p>0,05$ ). MPO, MDA ve nitrit değerleri için grup 1 ve grup 3 arası anlamlı fark bulunmamıştır.

## Tartışma

RIR sonrası akut böbrek hasarı perioperatif dönemde önemli bir klinik sorun olup, bu hasar ile ilişkili ekstra-renal

disfonksiyon, hastane içi mortaliteyi arttırmaktadır. İskemi ve reperfüzyon hasarında bilinen temel mekanizma, iskemik dokuların reperfüzyonu sonrası mikrovasküler fonksiyonda bozulma olup, arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyonun bozulması, kapillerlerde sıvı filtrasyonunda artma, postkapiller venüllerde ve plazma proteinlerinde ekstravazasyon olarak kendini göstermektedir. İskemi reperfüzyon sonrası doku yaralanmasının derecesi, sadece lokal değişikliklerle değil, aynı zamanda sistemik değişikliklerle de ilişkili olan reperfüzyonun ve hipoksinin neden olduğu endotel hücre yanıtı ile hasarın



Şekil 2: Grupların doku Malondialdehit, miyeloperoksidaz, total nitrit ve toplam sülfidril değerleri ortalama  $\pm 2$  standart sapma olarak gösterilmiş olup, \* $p<0,01$ , ve # $p<0,05$  olarak belirtilmiştir

MDA: Malondialdehit, MPO: Miyeloperoksidaz, SH: Toplam sülfidril, SS: Standart sapma

Tablo 1: Gruplarda izlenen histopatolojik değişiklikler medyan değerler olarak verilmiştir

	Hiperemi	Sitoplazmik vakuolleşme	Dejenerasyon	Nekroz	Kaspaz-3	TUNEL
Grup 1	0	0	0	0	0	0
Grup 2	2	2,5	2	2	3	3
Grup 3	0,5	0,5	0	0	1	1
Gruplar arası fark	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

TUNEL: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated Deoxyuridine Triphosphate Nick end Labeling

Tablo 2: Tüm grupta serum üre, kreatinin, alkalen fosfataz, alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, gama-glutamil transferaz ve laktat dehidrojenaz düzeyleri karşılaştırılmıştır

	Üre	Kreatinin	ALP	ALT	AST	GGT	LDH
Grup 1	39,0 (31-47)	0,29 $\pm$ 0,1	62,50 $\pm$ 15,84	65,50 (58-90)	369,00 $\pm$ 130,6	1,50 (1-3)	484 (413-615)
Grup 2	72,0 (51-85)	0,56 $\pm$ 0,1	100,50 $\pm$ 23,15	120,00 (76-255)	693,13 $\pm$ 196,8	4,00 (2-12)	1170,5 (796-2009)
Grup 3	37,5 (34-7)	0,40 $\pm$ 0	69,63 $\pm$ 12,19	84,00 (54-92)	378,88 $\pm$ 127,1	2,00 (1-3)	540,00 (383-706)
p	<0,01*	<0,001**	<0,01**	<0,01*	<0,001**	<0,01*	<0,001*

Gruplarda grup içi dağılımlarına göre serum üre, ALT, GGT ve LDH değerleri ortanca (minimum-maksimum) değerleri verilmiş ve \*Kruskal-Wallis testi ile, kreatinin, ALP ve AST değerleri ortalama  $\pm$  SD olarak, \*\*ANOVA testi ile değerlendirilmiştir.

ALP: Alkalen fosfataz, ALT: Alanin aminotransferaz, AST: Aspartat aminotransferaz, GGT: Gama-glutamil transferaz, LDH: Laktat dehidrojenaz, SS: Standart sapma

artarak devamına neden olmaktadır. Mikrosirkülasyondaki endotel hücreleri reperfüzyon sonrası erken dönemde daha fazla oksijen radikali fakat daha az nitrik oksit üretmektedir ve bu durum endotel hücrelerindeki süperoksit ile nitrik oksit arasındaki dengesizliğe ve enflamatuvar faktörlerin üretim ve salınımına yol açmakta ve lökosit-endotel hücre adezyonuna aracılık eden adezyon moleküllerinin salınımını arttırmaktadır. Reperfüzyon sonucunda salınan enflamatuvar mediyatörler ise iskemik hasara maruz kalmamış uzak organ endotel hücrelerini de aktive ederek lökosit bağımlı mikrovasküler hasar sonrası etkilenen dokulara iskemik yaralanmadan daha ciddi şekilde zarar verebilmektedir ve çoklu organ yetmezliğine neden olabilmektedir (19). Dokudaki enflamatuvar yanıtın şiddeti, uzak organlarda da benzer şiddette görülebilmektedir (20). Bizim çalışmamızda da grup 2 sıçanlarda RIR sonrası karaciğer hasarı grup 1 ile karşılaştırıldığında gerek histopatolojik gerekse serum ve doku enflamatuvar yanıt parametrelerinde belirgin şekilde artış gözlenmiştir.

Çeşitli nedenlerle karaciğer fonksiyonlarındaki düşüş ve buna eşlik eden nekroenflamatuvar hasar, karaciğer tarafından sentezlenen ve metabolize edilen AST, ALT, GGT ve LDH ile tanımlanabilir. Bunlardan AST ve ALT hepatik hasarı gösteren en duyarlı belirteçleri olup (21), daha önceki çalışmalarda RIR sonrası ALT ve AST gibi hepatik enzimlerin böbrek fonksiyonlarının bozulmasının ardından arttığı gösterilmiştir (22,23). Serum ALP düzeyi ise farklı dokulardan karaciğer, kemik, ince barsak ve plasenta gibi çeşitli dokuların enzimlerin faaliyetlerinin toplamını temsil etmekte olup, GGT ile eş zamanlı artış göstermesi pratikte karaciğer kaynaklı olaya işaret ettiğini düşündürmektedir (21). Benzer şekilde RIR sonrası karaciğer enzimlerinde artış bildirilmiştir (23,24). Bizim çalışmamızda da literatürü destekler nitelikte, AST, ALT, LDH, GGT ve ALP değerleri, RIR sonrası anlamlı artış gözlenmiştir. Dahası koenzim Q10 grubunun hepatik enzim değerleri grup 2 ile karşılaştırıldığında belirgin düşük olarak bulunmuştur ki bu da koenzim Q10'un serum karaciğer fonksiyon testi değerleri üzerindeki olumlu etkisini göstermektedir.

Ayrıca, koenzim Q10'un böbrekler üzerine olumlu etkileri bilinmektedir (10,11). Nitekim çalışmamızda RIR sonrası serum üre ve kreatinin düzeyleri grup 2'de Sham grubuna göre anlamlı olarak artmaktadır. Koenzim Q10 grubunun serum üre ve kreatinin değerleri grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur, bu değerler Sham grubunun serum üre ve kreatinin değerleri ile karşılaştırıldığında ise belirgin fark bulunmamıştır.

Histopatolojik olarak karaciğer dokusunda RIR sonrası belirgin sitoplazmik vakuolleşme artışı, vasküler permeabilite artışı (23,25), dejeneratif değişiklikler, lökosit infiltrasyon artışı ve hiperemiye sekonder konjesyonda artış bildirilmiştir (23). Çalışmamızda da histopatolojik olarak grup 2'de belirgin

hiperemi, sitoplazmik vakuolleşme, dejenerasyon ve nekroz izlenmesi ve grup 2 skorlama değerlerinin grup 1'e oranla anlamlı farklılık göstermesi RIR sonrası karaciğer hasarının geliştiğini ve modellememizin başarıya ulaştığını göstermektedir. Ayrıca grup 3'te gözlenen histopatolojik değişikliklerin grup 2'ye göre anlamlı olarak azalması koenzim Q10 kullanımının sitoprotektif etkinliğini göstermiştir.

İskemik akut böbrek hasarı sonrası karaciğerde apopitoz artışı kaspaz-3 yöntemiyle ile bildirilmiştir (23). Biz de çalışmamızda apopitoz değerlendirmesinde gerek TUNEL boyama gerek ise kaspaz-3 metoduyla grup 2'de uygulanan modellemenin apopitozu arttırdığını gösterdik. Bunun yanı sıra her iki yöntemde de koenzim Q10 grubunda skorlamada istatistiksel olarak anlamlı azalma bulunması, koenzim Q10 kullanımının karaciğer dokusunda apopitozu anlamlı olarak azalttığını göstermiştir. Ayrıca RIR sonrası meydana gelen apopitozun engellendiği durumlarda renal inflamasyonunda azaldığı belirtilmiş ve RIR sonrası etkilenen diğer organlarda da bunun potansiyel olarak gösterilebileceği düşünülmüştür (26). Çalışmamızda da koenzim Q10 kullanımının apopitozu ve enflamasyonu azalttığı gösterilmiş olup, bulgularımız bu düşüncenin doğru olduğunu immünohistokimyasal ve histopatolojik bulgularla kanıtlamaktadır.

Karaciğer hasarının gelişimine katkıda bulunan önemli bir faktör oksidatif stres ve bununla birlikte reaktif oksijen türlerinin artışı olduğu gösterilmiş olup, bu olaylar, lipid peroksidasyonunda artışa ve karaciğer antioksidanlarında azalmaya neden olmaktadır (27). MDA oksidatif stresin önemli göstergelerinden olup, lipid peroksidasyonunun en önemli ürünüdür. Daha önceki çalışmalarla RIR sonrası karaciğer MDA seviyesinde belirgin arttığı (23,24,28) ve RIR sonrası karaciğer lipid peroksidasyon ürünlerinin, MPO'nun arttığı ancak glutatyon gibi anti-oksidanların, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi enzim aktivitelerinin azaldığı gösterilmiştir (24,29). Bizim çalışmamızda da grup 2'de MDA ve MPO değerleri grup 1'e oranla artış göstermiş olup bu artış anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,01$ ). Bu bulgu çalışmamızda uygulanan iskemik modellemenin oksidatif stresi arttırdığını göstermiştir. Ayrıca grup 3 MDA düzeylerinin grup 2'ye göre azalması ve grup 3 MPO düzeylerinin grup 2'ye göre anlamlı olarak azalması koenzim Q10'un gerek lipid peroksidasyonunu azaltarak gerekse antioksidan etki göstermesi ile açıklanabilir.

Doku nitrit düzeyleri iskemik reperfüzyon sonrası endotelial disfonksiyona ve endotelial nitrik oksit sentaz aktivitesinin azalmasına bağlı olarak azaldığı (30,31) bildirilmiş olmakla birlikte çalışmamızda doku nitrit düzeylerinde grup 2'de Sham grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde artış gözlenmiştir. Nitrik oksit oksidasyonla nitrit ve nitrat anyonlarına dönüştürmektedir ve çalışmamızdaki nitrit düzeyleri nitrik oksit ve reaktif ürünlerinin seviyesini yansıtır niteliktedir. İskemiyeye yanıt olarak

nitrik oksit sentezi artar. Nitrik oksit sentaz inhibitörleri ise iskemi reperfüzyonun meydana getirdiği mikrovasküler değişikliklerin çoğunu taklit edebilmesi nedeni ile iskemi sonrası dokularda, doku nitrik oksit düzeylerini yeniden arttırabilir. Dolayısıyla nitrik oksit salınımını arttıran nitrik oksit sentaz inhibitörlerinin de iskemi reperfüzyona bağlı mikrovasküler hasara karşı koruma sağlayabileceği bildirilmiştir (32). Literatürde de bizim çalışmamızla paralel şekilde iskemi reperfüzyon sonrası doku nitrit düzeylerinde artış bildirilmiştir (33). Çalışmamızda koenzim Q10 verilen grup, grup 2 ile karşılaştırıldığında anlamlı olmamakla birlikte nitrit seviyelerinde azalma gözlenmiştir. Koenzim Q10'un fazla nitrik oksit salınımını suprese ettiği ve dokuyu nitrat stresinden koruyucu özelliği olduğu bilinmektedir (34). Çalışmamızda da grup 1 ve grup 3 nitrit düzeyleri arasında anlamlı farklılık bulunamamış olup, bu da koenzim Q10 etkisini desteklemektedir.

İskemi reperfüzyon sonrası doku SH seviyelerindeki azalma literatürde SH sentezinde durma veya daha yüksek tüketimi ile ilişkilendirilmiştir (35,36). Bu bulgularla uyumlu olarak çalışmamızda da doku SH düzeyleri ile RIR gruplarında anlamlı azalma gözlenmektedir. Koenzim Q10 grubunda ise grup 2'ye göre SH düzeylerinde artış gözlenmektedir ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuçlar çalışmamızdaki ana sınırlama olan, hayvan deneylerinde azaltma ilkesine uymak için sınırlı sayıda sıçan ile çalışılması ile ilgili olabileceği düşünülmüştür.

## Sonuç

RIR karaciğerde belirgin hasara neden olmaktadır. Bu hasar koenzim Q10 kullanımı ile, gerek oksidatif stresi azaltarak hücre yaralanmasını azaltmakta, gerekse anti-enflamatuvar ve anti-apoptotik etkisiyle karaciğerde doku yenilenmesine de katkı sağlayarak iyileşmektedir.

### Etik

**Etik Kurul Onayı:** Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (08.10.2018/0049-548).

**Hasta Onayı:** Hasta onayı alınmamıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

### Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: B.B.K., C.N.Y., B.C.Ö., Konsept: A.A., G.K., Dizayn: A.A., M.K., Veri Toplama veya İşleme: H.S., E.Ö., N.Y., Analiz veya Yorumlama: J.K., Literatür Arama: A.A., G.K., Yazan: A.A.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar arası çıkar çatışması bulunmamaktadır.

**Finansal Destek:** Bu araştırma için, Ankara Uygulama ve Araştırma Hastanesinden fon desteği alınmıştır.

## Kaynaklar

1. Kelly KJ. Distant effects of experimental renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:1549-1558.
2. Elapavaluru S, Kellum JA. Why do patients die of acute kidney injury? *Acta Clin Belg.* 2007;62:326-331.
3. Ernster L, Forsmark-Andrée P. Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin Investig.* 1993;71:S60-S65.
4. Folkers K. The potential of coenzyme Q 10 (NSC-140865) in cancer treatment. *Cancer Chemother Rep 2.* 1974;4:19-22.
5. Fouad AA, Jresat I. Hepatoprotective effect of coenzyme Q10 in rats with acetaminophen toxicity. *Environmental toxicology and pharmacology. Environ Toxicol Pharmacol.* 2012;33:158-167.
6. Vasiliev AV, Martinova EA, Sharanova NV, et al. Effects of coenzyme Q10 on rat liver cells under conditions of metabolic stress. *Bulletin of experimental biology and medicine. Bull Exp Biol Med.* 2011;150:416-419.
7. Yokoyama H, Lingle DM, Crestanello JA, et al. Coenzyme Q10 protects coronary endothelial function from ischemia reperfusion injury via an antioxidant effect. *Surgery.* 1996;120:189-196.
8. Mirmalek SA, Gholamrezaei Boushehrinejad A, Yavari H, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of coenzyme Q10 on L-arginine-induced acute pancreatitis in rat. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:5818479.
9. Liang S, Ping Z, Ge J. Coenzyme Q10 Regulates Antioxidative Stress and Autophagy in Acute Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:9863181.
10. Carrasco J, Anglada FJ, Campos JP, et al. The protective role of coenzyme Q 10 in renal injury associated with extracorporeal shockwave lithotripsy: a randomised, placebo-controlled clinical trial. *BJU Int.* 2014;113:942-950.
11. Fouad AA, Al-Sultan AI, Refaie SM, et al. Coenzyme Q10 treatment ameliorates acute cisplatin nephrotoxicity in mice. *Toxicology.* 2010;274:49-56.
12. Fatemikia H, Ketabchi F, Karimi Z, et al. Distant effects of unilateral renal ischemia/reperfusion on contralateral kidney but not lung in rats: the roles of ROS and iNOS. *Can J Physiol Pharmacol.* 2016;94:477-487.
13. Detre S, Jotti GS, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol.* 1995;48:876-878.
14. Turbin DA, Leung S, Cheang MC, et al. Automated quantitative analysis of estrogen receptor expression in breast carcinoma does not differ from expert pathologist scoring: a tissue microarray study of 3,484 cases. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;110:417-426.
15. Wasowicz W, Nève J, Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem.* 1993;39:2522-2526.
16. Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982;78:206-209.
17. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968;25:192-205.
18. Smárason Jr A, Allman KG, Young D, et al. Elevated levels of serum nitrate, a stable end product of nitric oxide, in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol.* 1997;104:538-543.
19. Lemasters JJ, Thurman RG. Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:327-338.
20. Neary P, Redmond H. Ischaemia-reperfusion injury and the systemic inflammatory response syndrome. *Ischemia-Reperfusion Injury London:* Blackwell Science. 1999:123-136.

21. Dancygier H. Basic Laboratory Parameters. Clinical Hepatology. Principles and Practice of Hepatobiliary Diseases: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010;p.319-331.
22. Askaripour M, Fatemi-Tabatabaei SR, Hosseini F, et al. Effects of aqueous extract of purslane (*Portulaca oleracea*) on hepatic enzymes in Two models of renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Zahedan J Res Med Sci.* 2016;18:1-4.
23. Golab F, Kadkhodaei M, Zahmatkesh M, et al. Ischemic and non-ischemic acute kidney injury cause hepatic damage. *Kidney Int.* 2009;75:783-792.
24. Wang B, Bai M, Bai Y, Li Q. Liver injury following renal ischemia reperfusion in rats. *Transplant Proc.* 2010;42:3422-3426.
25. Kim M, Park SW, Kim M, et al. Isoflurane Activates Intestinal Sphingosine Kinase to Protect against Renal Ischemia-Reperfusion-induced Liver and Intestine Injury. *Anesthesiology.* 2011;114:363-373.
26. Daemen MA, van't Veer C, Denecker G, et al. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J Clin Invest.* 1999;104:541-549.
27. Yap SC, Lee HT. Acute Kidney Injury and Extrarenal Organ Dysfunction New Concepts and Experimental Evidence. *Anesthesiology.* 2012;116:1139-1148.
28. Tas Hekimoglu A, Toprak G, Akkoc H, et al. Oxytocin ameliorates remote liver injury induced by renal ischemia-reperfusion in rats. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2013;17:169-173.
29. Serteser M, Koken T, Kahraman A, et al. Changes in hepatic TNF- $\alpha$  levels, antioxidant status, and oxidation products after renal ischemia/reperfusion injury in mice. *J Surg Res.* 2002;107:234-240.
30. Bae EH, Kim SW. Alteration of nitric oxide synthase and guanylyl cyclase activity in rats with ischemia/reperfusion renal injury. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2006;10:337-341.
31. Uhlmann D, Uhlmann S, Spiegel HU. Endothelin/nitric oxide balance influences hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;36:S212-214.
32. Grisham MB, Granger DN, Lefer DJ. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radic Biol Med.* 1998;25:404-433.
33. Shen SQ, Zhang Y, Xiang JJ, et al. Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes. *World J Gastroenterol.* 2007;13:1953-1961.
34. Jung HJ, Park EH, Lim CJ. Evaluation of anti-angiogenic, anti-inflammatory and antinociceptive activity of coenzyme Q(10) in experimental animals. *J Pharm Pharmacol.* 2009;61:1391-1395.
35. Ajamieh H, Merino N, Candelario-Jalil E, et al. Similar protective effect of ischaemic and ozone oxidative preconditionings in liver ischaemia/reperfusion injury. *Pharmacol Res.* 2002;45:333-339.
36. Peralta C, Leon O, Xaus C, et al. Protective effect of ozone treatment on the injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: antioxidant-prooxidant balance. *Free Radic Res.* 1999;31:191-196.