

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI**

**RATLARDA KARACİĞER İSKEMİ REPERFÜZYON
MODELİNDE UZAK İSKEMİK ÖN KOŞULLAMA VE UZAK
İSKEMİK ÖN KOŞULLAMAYA EKLENEN N-ASETİL
SİSTEİNİN ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr.ALİ İHSAN UYSAL**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd.Doç.Dr.MERT AKAN**

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan başta Prof. Dr. Zahide Elar olmak üzere tüm hocalarıma;

Tez çalışmamın her aşamasında desteğini ve anlayışını esirgemeyen, büyük bir titizlikle hatalarımı düzelteren danışman hocam Sayın Yrd.Doç.Dr.Mert Akan'a;

Tezimde emeği geçen Doç.Dr.Bekir Ergür , Yrd.Doç.Dr.Tuncay Küme ve Uz.Dr.Elvan Öçmen'e;

Uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalıştığım tüm öğretim üyesi, uzman, asistan, tekniker, hemşire ve diğer hastane çalışanlarına;

Asistanlığın sadece belirli bir alanda uzmanlık eğitimi alınan dönem olmadığını, aynı zamanda hayata dair hedeflerimizi belirlediğimiz yer olduğunu öğreten Dokuz Eylül Üniversitesi'ne;

Çok şey öğrendiğim annem, babam, kardeşlerim ve arkadaşlarıma;

Anlayışını ve sevgisini benden esirgemeyen eşim Demet'e;

Sonsuz saygı , sevgi ve teşekkürler...

ŞEKİL LİSTESİ	i
TABLO LİSTESİ	ii
RESİM LİSTESİ	iii
KISALTMALAR	iv
ÖZET	v
SUMMARY	vi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1 İskemi	2
2.2 Reperfüzyon	5
2.3 Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı	7
2.4 İskemi Reperfüzyon Hasarının Organ Sistemlerine Etkileri	8
2.5 İskemik Ön Koşullama.....	10
2.6 Uzak İskemik Ön Koşullama	12
2.7 Farmakolojik Ön Koşullama.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1 Anestezi Uygulaması.....	15
3.2 Deney Grupları ve Protokol.....	15
3.3 Deneysel Çalışma Modeli	16
3.4 Karaciğer Histopatolojisinin Değerlendirilmesi	18

3.5 Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü	19
3.6 İstatistiksel Değerlendirme	19
4.BULGULAR	20
4.1.Karaciğer Histopatolojik Hasar Skoru (KHHS)	21
4.2. Biyokimyasal Parametreler (AST, ALT, LDH)	27
5.TARTIŞMA	28
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	32
7. KAYNAKLAR.....	33

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının sebepleri ve sonuçları	3
Şekil 2. İskemi reperfüzyon hasarında görülen olaylar dizisi	5
Şekil 3. İskemi reperfüzyon sonrası kapiller damardaki değişiklikler	6
Şekil 4. İskemik ön koşullamanın mekanizması	12
Şekil 5. Deney protokolünün şematik görünümü.....	16

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Ratın karaciğer kan akımının kesilmesi	17
Resim 2. Ratta bacak kan akımının lazer akımölçerle gösterilmesi.....	18
Resim 3. Ratın bacak kan akımının kesildiğinin lazer akımölçerle gösterilmesi	18
Resim 4. <i>Sham</i> Grubuna ait H-E ile boyanmış karaciğer dokusu kesit görüntüleri	23
Resim 5. İskemi Reperfüzyon Grubuna ait H-E ile boyanmış karaciğer dokusu kesit görüntüleri.....	24
Resim 6. Uzak İskemik Ön Koşullama + İskemi Reperfüzyon Grubuna ait H-E ile boyanmış karaciğer dokusu kesit görüntüleri.....	25
Resim 7. Uzak İskemik Ön Koşullama +N-asetilsistein + İskemi Reperfüzyon Grubuna ait H-E ile boyanmış karaciğer dokusu kesit görüntüleri	26

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Gruplara ait AST, ALT, LDH düzeyleri ve histopatolojik hasar skorları.....	20
Tablo 2. Grupların AST, ALT, LDH, histopatolojik hasar skorları açısından p değerlerinin karşılaştırılması	21

KISALTMALAR

İR:	İskemi Reperfüzyon
DİÖK:	Direkt İskemik Ön Koşullama
UIÖK:	Uzak İskemik Ön Koşullama
SOR:	Serbest Oksijen Radikali
İÖK:	İskemik Ön Koşullama
MOF:	<i>Multiple Organ Failure</i> (Çoklu Organ Yetersizliği)
SIRS:	<i>Sistemic İnflammatory Response Syndrome</i> (Sistemik Enflamatuvar Yanıt Sendromu)
ATP:	Adenozin Trifosfat
H₂CO₃:	Karbonik Asit
NO:	Nitrik Oksit
TNF-α:	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
PMNL:	Polimorf Nüveli Lökositler
MPO:	Myeloperoksidaz
H-E:	Hematoksilen Eozin
NAS:	N-Asetilsistein
AST:	Alanin Aminotransferaz
ALT:	Aspartat Aminotransferaz
LDH:	Laktat Dehidrogenaz
NADH:	Nikotin Amid Dinükleotid
PKC:	Protein Kinaz C
NF-κB:	Nükleer Faktör κ B
KHHS:	Karaciğer Histopatolojik Hasar Skoru
cGMP:	Siklik Guanozin Monofosfat
cAMP:	Siklik Adenozin Monofosfat
ARDS:	<i>Akut Respiratory Distres Sendromu</i>

ÖZET

Ratlarda Karaciğer İskemi Reperfüzyon Modelinde Uzak İskemik Ön Koşullama ve Uzak İskemik Ön Koşullamaya Eklenen N-Asetil Sisteinin Etkilerinin Karşılaştırılması

Dr.Ali İhsan UYSAL, DEÜTF Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD, İZMİR

Amaç: Şok, kardiyak arrest, turnike uygulamaları, karaciğerin major cerrahileri ve transplantasyonlar sonrası ortaya çıkabilen iskemi reperfüzyon (İR) hasarı hastada ciddi organ yetersizliklerine neden olabilmektedir. Bu hasarı önlemede uzak iskemik ön koşullama (UİÖK) ve farmakolojik ön koşullama etkinliği kanıtlanmış yöntemlerdendir. Bu çalışmanın amacı deneysel rat karaciğer İR modelinde tek taraflı alt ekstremiteye uygulanan UİÖK ve UİÖK'ye farmakolojik ön koşullama olarak eklenen NAS'ın etkilerinin karşılaştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: DEÜTF Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 28 adet erkek Wistar albino rat yedişerli 4 gruba ayrıldı. Tüm gruplara genel anestezi altında laparotomi uygulandı ve hepatik pedikül diseke edildi. Grup I (*Sham*,n=7) :Laparotomi uygulandıktan ve hepatik pedikül diseke edildikten sonra başka hiçbir işlem yapılmadan batın kapatıldı. Grup II (İR,n=7): Karaciğere 30 dk. total iskemi sonrasında 4 saat reperfüzyon uygulandı. Grup III (UİÖK+İR,n=7): Sol arka bacağa uygulanan 3 döngü iskemik ön koşullama sonrası karaciğerde İR oluşturuldu. Grup IV (UİÖK+NAS+İR,n=7): 3 döngü UİÖK ve ardından intraperitoneal verilen 150 mg/kg NAS sonrası karaciğerde İR oluşturuldu. Tüm gruplarda ratların anestezi süresi eşit tutuldu, histopatolojik değerlendirme için karaciğer çıkarıldıktan ve biyokimyasal değerlendirme (AST,ALT, LDH) için kan alındıktan sonra ratlar sakrifiye edildi.

Bulgular: Karaciğer histopatolojik hasar skoru *Sham* Grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0,01$). İskemi Reperfüzyon Grubundaki histopatolojik hasar skorları UİÖK+İR ve UİÖK+NAS+İR gruplarından anlamlı olarak yüksek saptandı ($p < 0,01$). Uzak İÖK+NAS+İR ve UİÖK+İR grupları arasında hasar skorlarında anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,334$). Biyokimyasal parametrelerin (AST,ALT,LDH) düzeyleri karşılaştırıldığında İR Grubu ile UİÖK ve UİÖK+NAS grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Sonuç: Bu deneysel çalışmada rat karaciğer total İR modelinde UİÖK ve UİÖK+NAS'ın İR hasarını histopatolojik olarak anlamlı düzeyde azalttığı saptanırken UİÖK+NAS ve UİÖK grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Biyokimyasal parametrelere göre karaciğer İR hasarını azaltmada her iki yöntemin de etkinliği gösterilememiştir

Anahtar Kelimeler: Karaciğer, reperfüzyon, uzak iskemik ön koşullama, N-asetil sistein

SUMMARY

The Effects of Remote Ischaemic Preconditioning and N-Acetyl Cysteine with Remote Ischaemic Preconditioning in Rat Hepatic Ischaemia Reperfusion Injury Model

Dr.Ali İhsan UYSAL, Dokuz Eylul University, School of Medicine, Dept. of Anaesthesiology, IZMIR

Background: Ischaemia reperfusion (IR) injury which can develop after shock, cardiac arrest, major hepatic surgeries, liver transplantation and tourniquet application may result in severe organ failures. Remote ischaemic preconditioning (RIP) and pharmacological preconditioning are the effective methods that can be used to prevent IR injury. The aim of this study was to evaluate the effects of RIP and N-acetyl cysteine (NAC) with RIP in the rat hepatic IR injury model.

Materials and Methods: After obtaining approval from the Institutional Ethics Committee, 28 Wistar albino male rats weighing approximately 250-300 g were divided into 4 groups. Laparotomy and hepatic pedicle dissection were performed to all groups under general anaesthesia. Group I (Sham, n=7): Laparotomy and hepatic pedicle dissection were performed but nothing else was done. Group II (IR, n=7): After 30 minutes of hepatic pedicle occlusion, 4 hours of reperfusion was performed. Group III (RIP+IR, n=7): After 3 cycles of ischemic preconditioning applied to left hind leg, hepatic IR was performed. Group IV (RIP+NAC+IR, n=7): After 3 cycles of RIP and intraperitoneal administration of NAC (150 mg/kg), hepatic IR was performed. Durations of anaesthesia were equal in all groups. All the rats were sacrificed after blood samples were taken and liver was processed for conventional histopathology.

Results: The histopathological injury score of liver (HISL) was significantly lower in the sham group compared with the other groups ($p < 0.01$). The injury score of IR group was significantly higher than the RIP+IR and RIP+NAC+IR groups ($p < 0.01$). There was no significant difference in HISL between the RIP+IR and RIP+NAC+IR groups. There were no significant differences in biochemical parameters (AST, ALT, LDH) between the IR, RIP+IR and RIP+NAC+IR groups.

Conclusions: In the present study, it was demonstrated histopathologically that both RIP and RIP+NAC decreased hepatic IR injury significantly but there was no significant difference between RIP+IR and RIP+NAC+IR groups. According to the biochemical parameters, both methods could not prevent IR injury.

Key words: Liver, reperfusion, remote ischaemic preconditioning, N-acetyl cysteine

1. GİRİŞ VE AMAC

İskemi reperfüzyon (İR), doku veya organa giden kan akımında bir süre azalma veya kesilme sonrasında yeniden kanlanma olarak tanımlanır. Kan akımının tekrar başlaması (reperfüzyon) dokulara iskemik hasardan daha fazla zarar verebilmektedir (1). İskemik periyod süresince dokuda toksik serbest oksijen radikalleri (SOR) üretilir. Reperfüzyon sırasında SOR ve süperoksit radikalleri endotelyal hasar, artmış mikrovasküler permeabilite ve doku ödemeine neden olmaktadır (2,3). Ayrıca aktive olan adezyon molekülleri ve sitokinler sistemik enflamatuvar yanıtı başlatabilir. Bu yanıtlar İR hasarı olarak tanımlanır (3). Temel başlatıcı patofizyolojik etken doku iskemisi olmakla birlikte, reperfüzyon, enflamasyona yol açmaktadır (4).

İskemi reperfüzyon hasarından korunmaya yönelik klinik ve laboratuvar çalışmalar sürmekle birlikte iskemik ön koşullama (İÖK) bu yöntemlerin önde gelenlerinden birisidir. Organlar kısa süreli iskemik ve reperfüzyona maruz bırakıldıklarında, ardından gelen uzun süreli iskemiyi oluşan reperfüzyonda hasar daha az olmaktadır. Bu durum direkt İÖK olarak adlandırılmaktadır (5). Bir organa uygulanan iskemik reperfüzyon epizodları başka bir organda iskemiyi karşı dayanıklılık sağlamaktadır; bu yöntem uzak iskemik ön koşullama (UIÖK) olarak adlandırılır (6). Farmakolojik ön koşullama yöntemi de İR hasarından korunma sağlamaktadır ve bu amaçla farklı ilaçların kullanıldığı birçok çalışma yapılmıştır (7-13). N-asetilsistein (NAS) üzerinde en fazla çalışılan ilaçlardandır. Literatürde NAS ile birçok ön koşullama çalışması vardır ve çoğu araştırmada NAS ile organ korunması sağlandığı gösterilmiştir (14-22).

Literatür taramalarımızda karaciğerde İR hasarından korunmak için UIÖK ve farmakolojik ön koşullamanın beraber yapıldığı bir çalışmaya rastlanmadı.

Bu tez çalışmasında, deneysel rat karaciğer İR modelinde tek taraflı alt ekstremiteye uygulanan UIÖK ve UIÖK'ye farmakolojik ön koşullama olarak eklenen NAS'ın etkilerinin karşılaştırılması amaçlandı.

2.GENEL BİLGİLER

Karaciğer cerrahisi anesteziistlerin karşı karşıya olduğu yüksek riskli majör abdominal girişimlerin başında gelmektedir. Karaciğer ile ilgili cerrahi girişimler (karaciğer rezeksiyonlarında kanama kontrolü amacı ile geçici olarak yapılan Pringle manevrası veya total vasküler klempaj) ve karaciğer transplantasyonu (rezeksiyon sonrası reperfüzyon olana kadar geçen soğuk iskemi süresi) gibi birçok durumda geçici olarak kan akımının durması ile iskemi, kan dolaşımının tekrar sağlanması ile de reperfüzyon oluşmaktadır. İskemi reperfüzyon hasarı özellikle yandaş karaciğer hastalığı (yağlanma, fibrozis) olanlarda karaciğer yetersizliğine (23); hatta uzun süreli yoğun bakım izlemi gerektirebilecek çoklu organ yetersizliğine (*MOF*) neden olabilmektedir (24-26).

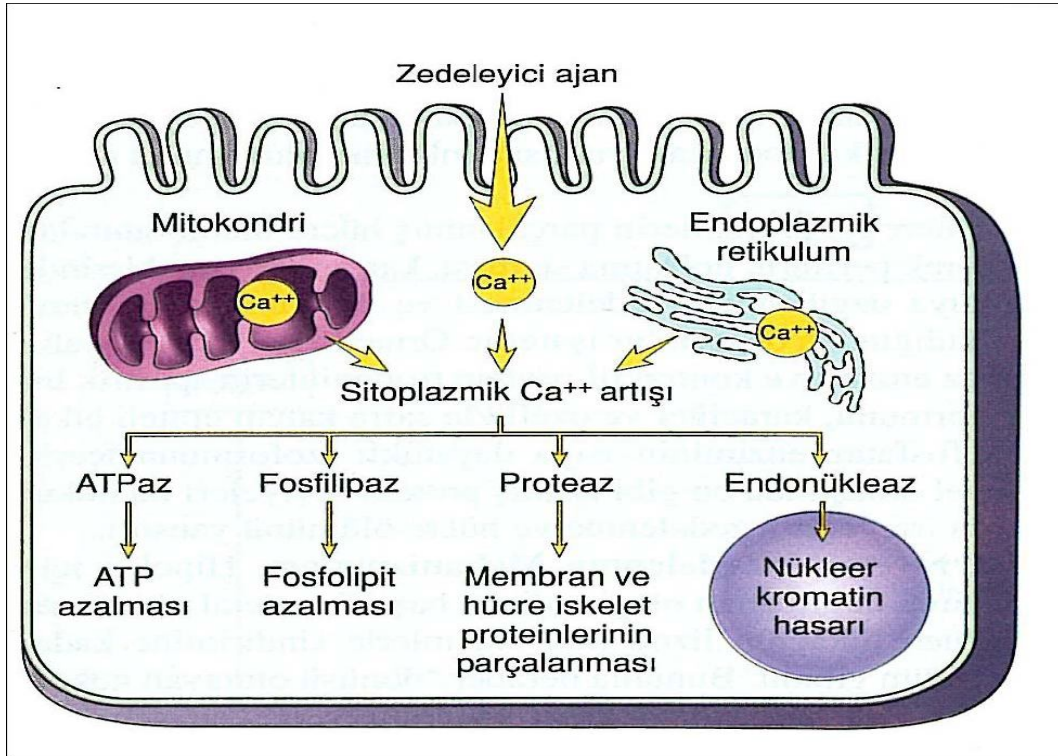
2.1 İskemi

İskemi, organların kanlanmaması yani oksijen ve besin maddelerinin dokulara yeterli düzeyde ulaşamamasıdır. Bu olay, organı perfüze eden kan akımındaki azalmaya bağlı olarak gelişen geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre zedelenmesine yol açar. İskeminin neden olduğu patolojik süreçler sık karşılaşılan ve yaşamı tehdit eden durumlardır (27). İskemi sonrası kan akımının tekrar başlaması (reperfüzyon) paradoksal olarak iskeminin dokuda oluşturduğu hasardan daha fazla hasar oluşturur (2).

İskemi reperfüzyon lokal-uzak etki ve komplikasyonlara neden olabilen bazı mekanizmaları tetikler (3). İskemik periyod süresince dokuda toksik SOR üretilir. Reperfüzyon sırasında SOR ve süperoksit radikalleri endotelial hasar, artmış mikrovasküler permeabilite ve doku ödemeine neden olmaktadır (2,3). Ayrıca aktive olan adezyon molekülleri ve sitokinler sistemik inflamatuvar yanıt sendromunu (*SIRS*) başlatabilir. Bu yanıtlar İR hasarı olarak tanımlanır (3).

İskemi sırasında hücre membranında bulunan Na^+/K^+ pompasının çalışması için gerekli olan enerji sağlanamaz. K^+ iyonları hücre dışına çıkarken Na^+ ve Cl^- iyonları da hücre içine girerler. Anaerobik glikolizle adenin trifosfat (ATP) üretilmeye çalışılır, bu da laktik asit üretimi ile sonuçlanır. Karbondioksitin birikimi karbonik asit (H_2CO_3) üretimi ile sonuçlanır, böylece asidoz artar. İki dakikalık iskemi sonrasında özellikle beyin hücrelerinde ekstrasellüler pH 7.3'ten 6.7'ye kadar düşebilmektedir. Adenin trifosfat bağımlı çalışan diğer

bir pompa ise ekstrasellüler ve intrasellüler Ca^{+2} u dengelemektedir. İntrasellüler Ca^{+2} artışı ile proteolitik enzimler ve fosfolipazlar aktive olurlar. Fosfolipazların aktivasyonu araşidonik asit oluşumu ile sonuçlanır. Araşidonik asit direkt etkiyle mitokondriyal enzimleri inhibe eder ve serbest radikal oluşumunu artırır (28)(Şekil 1).



Şekil 1. Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının sebepleri ve sonuçları (29).

Anoksik veya iskemik koşullarda adenzinin ekstrasellüler düzeyi artmaktadır. Bu artış muhtemelen intrasellüler ATP'nin yıkılmasına bağlıdır. İskemi sırasında meydana gelen ATP yıkımı glikolizisi indüklemektedir. Glikolizis ise laktat oluşumunu hızlandırmaktadır (30). Adenzin, A_1 reseptörleri üzerinden sinaptik transmisyonu ve presinaptik Ca^{+2} geçişini inhibe etmekte, K^+ ilişkili glutamat salınmasını azaltmaktadır (31).

Membran hasarının potansiyel nedenleri:

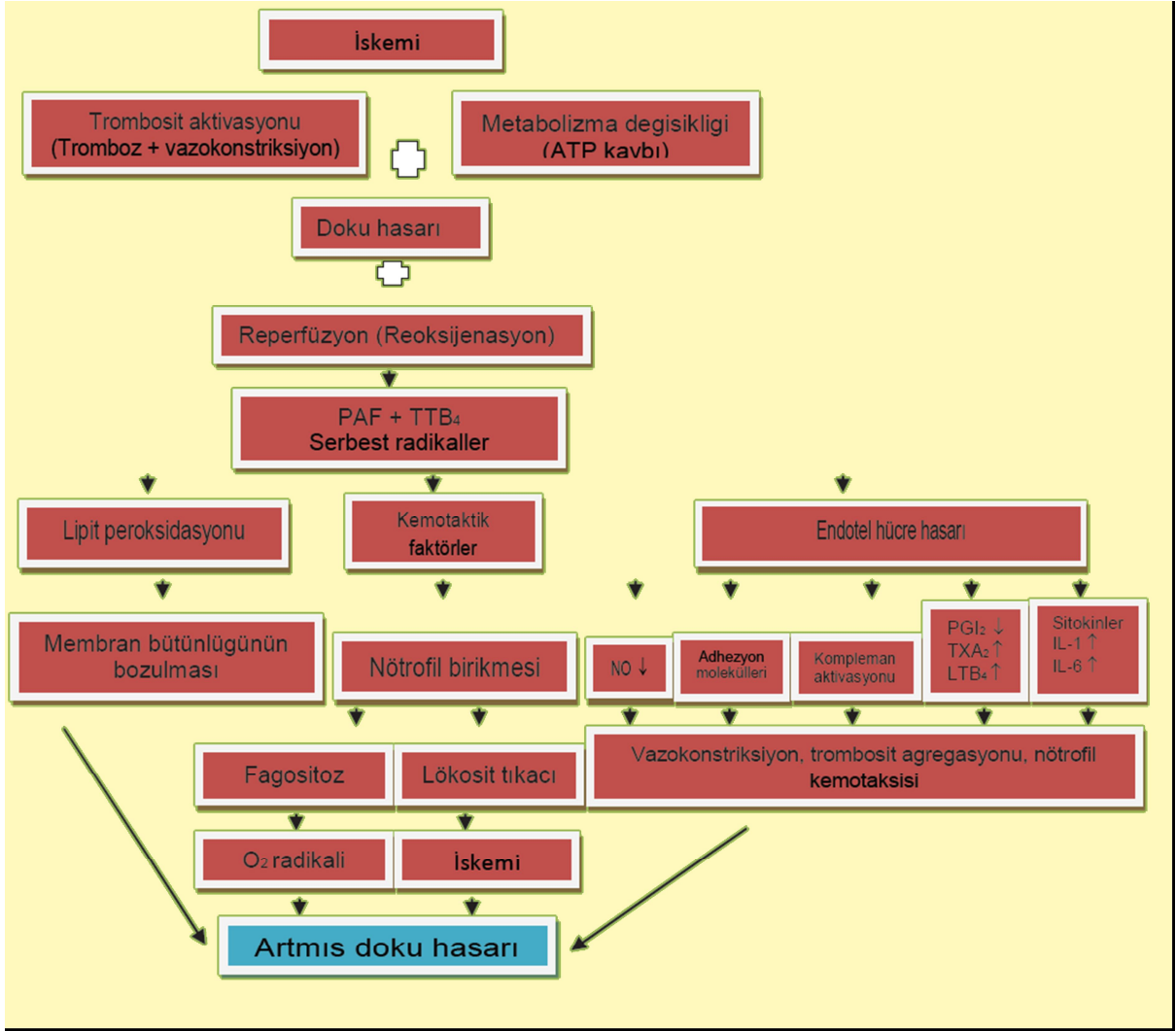
a) Membran fosfolipitlerinin ilerleyici kaybı: İskemiye bağlı Ca^{+2} artışı ile endojen fosfolipazların aktivasyonu yıkımın artmasına yol açabilir.

b) Hücre iskelet anormallikleri: Hücre içi Ca^{++} artması ile aktive olan proteazlar hücre çatısına zarar verebilirler.

c) Serbest oksijen radikalleri: İndirgenmiş oksijen türevleri hücre membranına ve hücre elemanlarına zarar verirler. Özellikle kan akımının düzelmesinden sonra iskemik dokularda artan serbest oksijen radikallerinin büyük ölçüde reperfüzyon sırasında hasarlı alana gelen polimorf nüveli lökositler (PMNL) tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir.

d) Lipid yıkım ürünleri: Fosfolipidlerin parçalanması sonucu iskemik hücrelerde biriken bu ürünler membranlar üzerinde hasar oluşturur (32).

Membran hasarının mekanizmaları ne olursa olsun sonuç, yukarıda tanımlanan olaylarla Ca^{++} 'nın bol miktarda hücre içine girmesidir (32).



Şekil 2. İskemi reperfüzyon hasarında görülen olaylar dizisi (33).

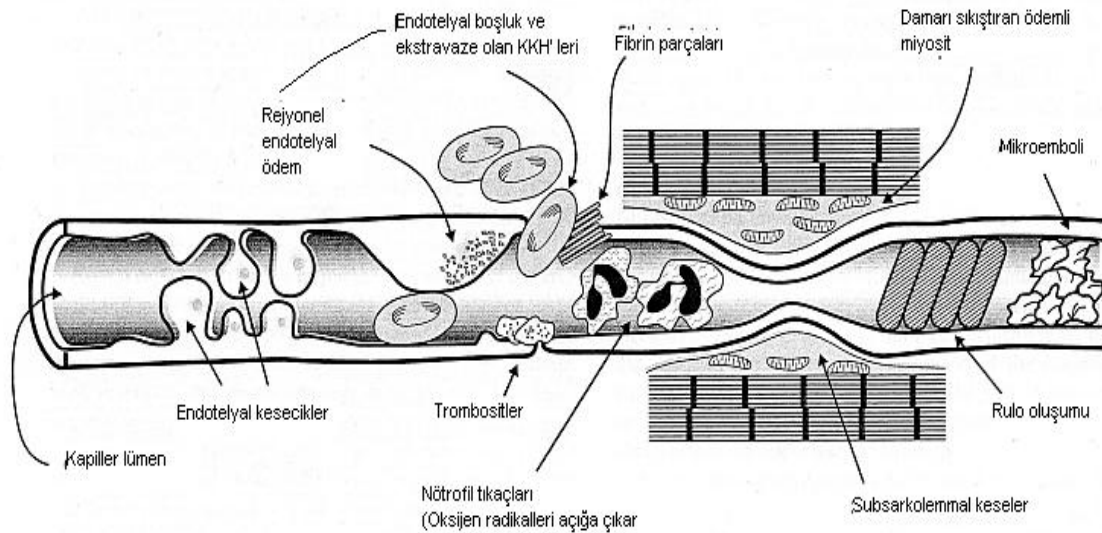
Uzamış hipoksi membran potansiyeli, iyon geçişi ve endotelial hücrelerin iskelet yapısını bozmakta; ayrıca, intrasellüler volümü artırmaktadır. Bu değişiklikler enerji depolarının, prostasiklin ve nitrik oksit (NO) gibi bazı biyoaktif maddelerin yapımının azalması, endotelin ve tromboksan A₂ gibi maddelerin yapımının artması ile birlikte (24). (Şekil 2).

2.2 Reperfüzyon

Klinik olarak İR hasarı sıklıkla transplantasyon, iskemik serebrovasküler olay (*stroke*), miyokard enfarktüsü, şok/resüsitasyon ve turnike uygulamaları sonrasında görülmektedir (34). Dolaşım tekrar başladığında fazla miktardaki nikotin amid dinükleotid (NADH) oksijen ile reaksiyona girerek süperoksit oluşturur. Süperoksitler demir-sülfür proteinlerle reaksiyona

girer ve serbest demir açığa çıkar. Mitokondrideki NO süperoksitle süperoksit dismutazdan üç kat daha hızlı reaksiyona girer. Bu reaksiyon sonucunda potent peroksinitrit serbest radikali meydana gelir. Peroksinitrit, mitokondrideki solunum zincirinde kompleks I, kompleks II ve süperoksit dismutazı inhibe eder (28).

Araşidonik asitten oluşan lökotrienler trombosit ve lökositlerin, süperoksit ise lökositlerin damar duvarına adezyonunu artırır (2,24). Enflamatuvar olaylarda salınan tümör nekrosis faktör alfa (TNF- α), İR hasarında önemli yeri olan mikrovasküler disfonksiyona neden olur. Permeabilitedeki artış proteinlerin interstisyuma ekstravaze olmasına neden olmakta, bu da ödemle sonuçlanmaktadır (25). Şekil bozukluğu olan, adezyona ve migrasyona uğrayan lökosit sayısında, İR sonrası çok büyük artışlar olduğu gösterilmiştir (2,24,34). Ayrıca fonksiyonel kapiller damar sayısında azalma olduğu saptanmıştır (2,28) (Şekil 3).



Şekil 3. İskemi reperfüzyon sonrası kapiller damardaki değişiklikler (KKH:Kırmızı Kan Hücreleri) (28).

Damar duvarındaki moleküler ve biyokimyasal değişikliklerin akut enflamatuvar yanıtın karakteristik özellikleri olduğu gösterilmiştir (24).

Endotel bağımlı olmayan vazodilatatörlere (nitroprussid) yanıtın korunmuş olması arteriyol düz kasında fonksiyon bozukluğu olmadığını göstermektedir. Deneysel çalışmalar, reperfüzyon sonrası endotel bağımlı NO'yu inaktive eden süperoksitin büyük kaynağının

aktive olan lökositler olduğunu göstermektedir. Endotelial hücrelerden ortaya çıkan süperoksit ve hidrojen peroksitin önemli bir kaynağı ksantin oksidazdır. Birçok damar yatağındaki endotel hücresi ksantin oksidazdan zengindir. İskemi sırasında biriken hipoksantin, reperfüzyon sırasında kan damarına tekrar oksijen geldiğinde büyük miktarda süperoksit ve hidrojen peroksit üretimine neden olmaktadır (24,35).

2.3 Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı

Normotermik iskemi, iskeminin süresine bağlı olarak, oksijenize kan akımının başlaması ile hepatosellüler hasara neden olur. Miyokardiyal, intestinal, renal ve hepatik İR modellerinde komplemanın da İR hasarında rol oynadığı gösterilmiştir. Anaflatoksinler ve *membran attack complex* gibi kompleman aktivasyonu sonucu ortaya çıkan ürünler; karaciğerde nötrofil aktivasyonu, vazokonstriksiyon, mikrosirkülasyonda bozulma, vasküler permeabilitede artma ve hücre lizisi ile ilişkilidir. Komplemanın klasik yolunu aktive edenlerin başlıcaları IgG ve IgM antikor-antijen kompleksidir. Ayrıca sitokinler, intrasellüler proteinlerin serbestleşmesi ve reaktif oksijen ürünleri kompleman aktivasyonunda rol oynuyor olabilir (36).

Serbest radikaller hücrede sarkolemma, sarkoplazmik retikulum, ekstrasellüler kollajen matriks veya kontraktıl proteinler gibi organellerde ve bunları takiben kalsiyuma bağlı mekanizmalarda bozukluklar oluşturur. Serbest sitozolik kalsiyumun artışı protein kinazları, fosfolipazları ve diğer yıkıcı enzimleri aktive ederek subsellüler hasarın artmasına yol açmaktadır. Aşırı Ca^{++} yüklenmesi, oksijen radikalleri ile başlayan hasarı artırmaktadır (37).

Hücre membranlarının hasarlanması, hepatositlerin homeostazını bozarak apoptoz veya nekroza neden olmaktadır (38). Mikrodolaşımdaki bozukluğun sinuzoidal endotelial hücre hasarı, endotelin ve NO gibi vazodilatatör-vazokonstriktör moleküller arasındaki dengesizliğe bağlı olduğu düşünülmektedir (24,38).

Karaciğerde İR hasarı iki fazda meydana gelmektedir: 1) Erken Faz (0–2 saat): Ca^{++} artışı ve SOR oluşumu etkilidir. İntrasellüler Ca^{++} düzeyi normal hepatosit fonksiyonunun devamı için önemlidir. Hücre içinde Ca^{++} artışı, hepatosit hasarını başlatan erken mekanizmalardan birisidir. Ayrıca apoptoz ve nekroz yollarını da aktive etmektedir. İskeminin ardından reperfüzyonun hepatositlerdeki Ca^{++} miktarını artırdığı gösterilmiştir. İskemi boyunca hücrede

Ca⁺⁺ artışı saptanmazken reperfüzyon sırasında hızlı bir Ca⁺⁺ artışı (reperfüzyonun birinci dakikasında Ca⁺⁺ miktarı iki katına çıkmaktadır) gözlenmektedir.

2) Geç Faz (6–48 saat): Nötrofillerin, makrofajların, lenfositlerin ve trombositlerin karaciğere göçü ile enflamasyon yanıtı uyarılmakta ve sinuzoidal kan akımında değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Hepatositlerdeki hasar SOR ve ekstrasellüler sitokinler ile meydana gelmektedir (38).

Karaciğer iskemisini takiben sinuzoidal hücre apoptozu reperfüzyon sonrasında hızla ortaya çıktığı (30 dk.), hepatosit apoptozunun ise 240 dk. reperfüzyon sonrasında olduğu gösterilmiştir (39).

Karaciğerde İR hasarı, akımın geçici olarak kesildiği karaciğer rezeksiyonlarında, karaciğer cerrahisinde intraoperatif kan kaybını azaltmada ve karaciğer transplantasyonunda ortaya çıkmaktadır (40). Karaciğer transplantasyonunda, greft fonksiyon kaybının en önemli nedenlerinden biri İR hasarıdır (25).

Karaciğerdeki İR hasarı kolestazi indüklemekte, bu da erken ve genellikle geçici olarak safra sekresyonunda azalmaya neden olmaktadır. Safra akımındaki bu değişiklikler artmış alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri, karaciğer miyeloperoksidaz aktivitesi ve serum bilirubin değerleri ile beraberdir. Bu değişikliklerin 1–3 gün içinde geri dönüşümlü olabileceği bulunmuştur (38).

Karaciğer reperfüzyonu sırasında meydana gelen splanknik konjesyon sonucu barsak ve dalaktan salınan proenflamatuvar maddelerin sistemik dolaşıma karışması ile karaciğer ve akciğer hasarı tetiklendiği gösterilmiştir (39).

2.4 İskemi Reperfüzyon Hasarının Organ Sistemlerine Etkileri

İskemik dokuda reperfüzyona yanıt olarak ortaya çıkan hasar, diğer organları da etkileyecek kadar ciddi olabilmektedir. İskemi reperfüzyonun uzak organ etkileri sıklıkla akciğer ve kardiyovasküler sistemde görülmekte; ayrıca, *SIRS* veya *MOF* ile sonuçlanabilmektedir. Barsak, karaciğer ve iskelet kası reperfüzyonu sonrası ortaya çıkan *MOF*'un ölüme neden olabileceği gösterilmiştir (24). İskemi reperfüzyon sonrası görülebilen *MOF*, iskemik olaydan 24–72 saat sonra ortaya çıkan akciğer yetersizliği ile başlamaktadır. Akciğer yetersizliğinin akut akciğer hasarı gibi ılımlı bir tablodan akut respiratuvar distres sendromu (ARDS) gibi ciddi bir tabloya kadar değişkenlik gösterebileceği belirtilmiştir (24).

Kardiyak cerrahi sırasındaki İR hasarı sistemik enflamatuvar yanıt, miyokard ve akciğer endotel disfonksiyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (41). Alt ekstremitenin İR' sinden sonra ARDS'nin ortaya çıkabileceği (42) ve solunum yetersizliğini takiben hepatik, renal, gastrointestinal, santral sinir sistemi ve kalp yetersizliği gelişebileceği saptanmıştır (24).

Transplantasyon sonrası karaciğerin fonksiyonel olamamasının başlıca nedenlerinden birinin hızlı gelişen akciğer yetersizliği olduğu saptanmıştır (43). Karaciğer İR'si sonrası görülen akciğer yetersizliğinin nedeninin karaciğerden salınan sitokinler olduğu düşünülmektedir. TNF- α 'nın hem karaciğer hem de akciğerde hasar oluşturduğu gösterilmiştir (25,38). Ratlarda oluşturulan normotermik karaciğer İR modelinde akciğerlerde interstisyel incelleme ve lökosit infiltrasyonu ile karakterize değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Vücudun en büyük sabit makrofaj kaynağı olan Kupffer hücreleri, İR sırasında artan TNF- α 'nın en önemli kaynağıdır (25). Ciddi hepatik İR hasarında artmış Kupffer hücre aktivasyonuna bağlı NO inhibisyonunun, akut akciğer hasarına neden olduğu saptanmıştır (32).

Karaciğer İR'si sonrası pankreasta orta-ciddi düzeyde PMNL infiltrasyonu ve ciddi interstisyel ödem, barsakta epitelyal villuslarda bozulma, hemoraji ve mukozada nötrofil infiltrasyonu saptanmıştır (26) Barsakta perfüzyonun bozulmasının endotelin ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (44). Enteral iskeminin intestinal mukoza bariyer bütünlüğünü bozarak enterik bakterilerin ve lipopolisakkaridlerin barsak lümeninden mezenterik lenf nodlarına ve portal kan akımına geçmesine neden olduğu bulunmuştur (24). Alt ekstremitte İR' si barsak mukozasındaki bağlantıları bozarak endotoksemiye neden olabilmektedir. Endotoksinlerin koagülasyon kaskatını, nötrofilleri ve proenflamatuvar sitokinlerin üretimini aktive ettiği gösterilmiştir (38).

Ekstremitte cerrahisinde kansız alan sağlamak için kullanılan turnike, iskelet kasında uzamış iskemiye neden olmaktadır. İskemik hasar kas disfonksiyonu, nekrozu, ciddi asidoz, hiperkalemi ve miyoglobüri gibi birçok lokal ve sistemik postoperatif komplikasyonlara yol açabileceği gösterilmiştir (18,45,46). Kas iskemisi sonrası aktive olan adezyon molekülleri ve sitokinler *SIRS*' ı başlatabilmektedir. Aktive olan lökosit ve sitokinlerin ana hedeflerinden biri akciğerdir (3).

2.5 İskemik Ön Koşullama

Uzun bir iskemi döneminde oluşan hücre hasarını azaltmak amacıyla iskemi öncesinde uygulanan kısa iskemi reperfüzyon periyodları İÖK olarak tanımlanır (38). İlk olarak, dört kısa iskemi reperfüzyon periyodunun köpek miyokardında meydana gelen iskemik hasarı azalttığı gösterilmiştir (47).

İskemik ön koşullamanın ilk olarak tanımlandığı kalpte 40 dk.lık tek bir iskemiye takiben ciddi bir ATP düşüşü ve hücre ölümü olduğu halde dört kez tekrarlanan 10 dk.lık iskemi reperfüzyon periyodunun İR hasarını azalttığı gösterilmiştir. Bu koruyucu etkinin mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte takip eden iskemi periyodlarında ilk iskemi dönemine göre ATP düşüşünde azalma olduğu ayrıca laktat, H⁺ ve NH₃ gibi zararlı maddelerin her perfüzyonla birlikte ortamdan uzaklaştırıldığı gösterilmiştir (47).

İskemik ön koşullamanın koruyucu etkileri iskemi süresi ve kaç döngü İR yapıldığı ile de ilişkilidir. Kalpte 60 dk.ya kadar iskemide İÖK'nin etkili olduğu, 90 dk. üzerindeki iskemide etkisinin sınırlandığı gösterilmiştir (48). Döngü sayısı, İÖK'nin oluşturduğu korumanın etkinliği ile ilişkili bulunmuştur. İskelet kasında yapılan çalışmalarda üç döngü ile en iyi sonuç alınmıştır (45).

Başta kalp (47) olmak üzere akciğer (3,25), karaciğer (40,49), kas (45,46), böbrek (50), medulla spinalis (51), beyin (31,52) ve barsaklarda (53) İR hasarının azaltılmasında İÖK araştırılmış ve etkili olduğu saptanmıştır.

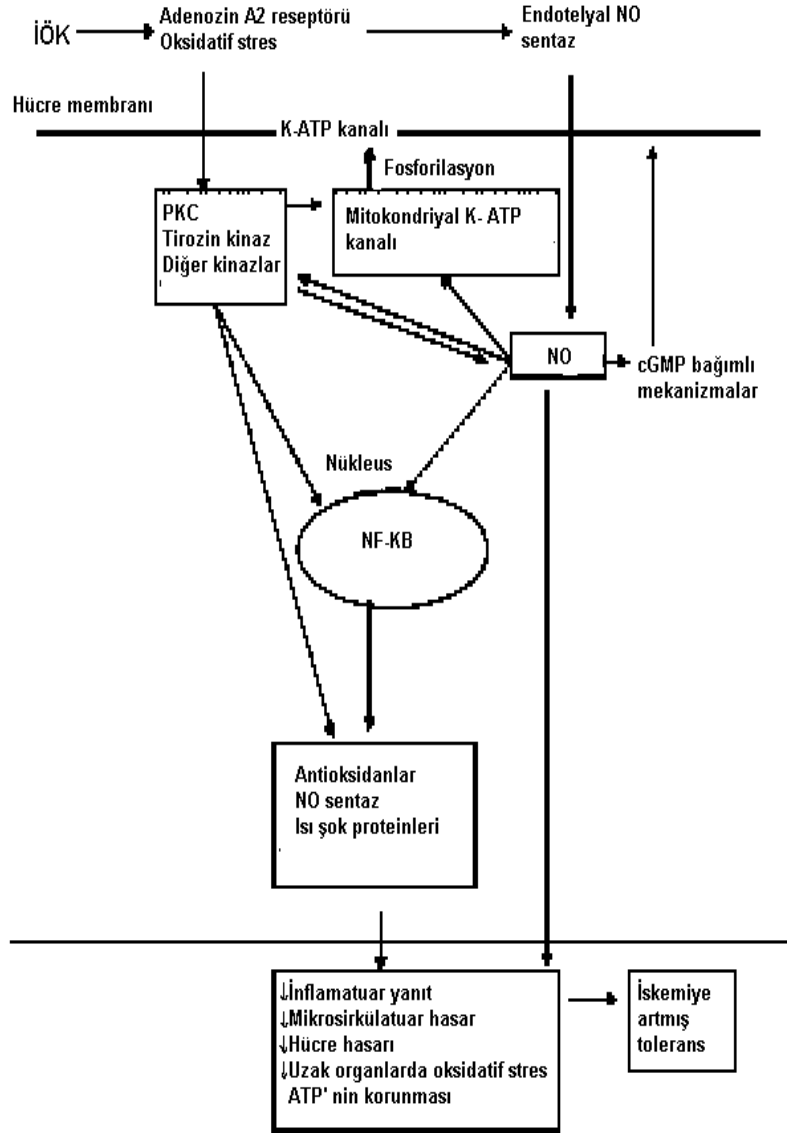
Hepatik İÖK ilk olarak 1993'te Lloris-Carsi ve ark.(54) tarafından rat karaciğerinde uygulanmıştır. Koti RS ve ark. (40) portal triadın beş dakika klemplenmesinden sonra uygulanan 10 dk.lık reperfüzyon sonrası 90 dk.lık iskemiye takiben yaşam sürelerinde artış ve karaciğer enzim düzeylerinde azalma gösterdiğini bildirmişlerdir. Takip eden çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur (55). Hepatik İÖK'nin hepatosellüler hasarda (35,49), TNF- α (25,56) ve interlökin-6 (IL-6) salınımında (56), lökosit-endotel hücre etkileşiminde (35), endotel hücre hasarında, hepatosellüler apoptozda (57), uzak organ hasarında (26) azalma ve doku ATP düzeyinde (30,54), periferik karaciğer kan akımında, mikrosirkülasyonda (58), hepatic intrasellüler oksijenizasyonda artma sağladığı gösterilmiştir.

Karaciğerde 90 dk.ya kadar uzayan iskemi öncesinde 10 dk. iskemi 10 dk. reperfüzyon şeklinde uygulanan tek döngü İÖK'nin etkili olduğu hasar göstergesi olarak AST, ALT düzeyleri ve histopatolojik inceleme kullanılarak gösterilmiştir (29). Klinik bir çalışmada ise klasik olarak 60 dk. kabul edilen güvenli maksimal karaciğer normotermik iskemi süresinin İÖK ile 120 dk.ya kadar uzatılabileceği gösterilmiştir (59).

Karaciğerdeki İÖK'nin adenosin (34,48,49,60), protein kinaz C (PKC) (61,62), NO (49,50,58), ısı şok proteinleri (63), tirozin kinazlar (64), mitojen-aktive protein kinazlar (62), oksidatif stres (65,66), nükleer faktör κ B (NF- κ B) (67) ve apoptoz kaskadının düzenlenmesi (57,68) ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Adenosin gibi çeşitli mediyatörler ve ikincil mesajcı sistemlerin aktivasyonu ile İÖK etkili olduğu gösterilmiştir (69). Bu hemen başlayan etki birkaç saat içinde sona ermekte, ancak 24 saat sonra koruyucu proteinlerin uyarılması ile (70) yeni bir koruma sistemi ortaya çıkmakta ve etkisi 48–72 saat sürmektedir (71). Ön koşullamanın hem siklik guanozin monofosfat (cGMP) hem de siklik adenosin monofosfat (cAMP) düzeylerinde artışa neden olduğu gösterilmiş, bu nedenle de İÖK'de tetikleyici bir rolleri olabileceği düşünülmüştür (72).

Dokuda İÖK sonrası ATP'nin stabil kaldığı, adenosin, ksantin ve inozinin ise arttığı bulunmuştur (35). Başka bir deneysel çalışmada ise İÖK grubunda reperfüzyon sonrası ATP' de hızlı bir artış olduğu saptanmıştır (55). Glikolizis ve ATP yıkımının, bunun sonucunda da laktat oluşumunun İÖK ile azaldığı bulunmuştur. ATP miktarının korunması azalmış ATP kullanımı ile ilgilidir, bu da İÖK'nin enerji koruyucu mekanizmaları tetiklediğini düşündürmektedir (30).

Tam olarak netleşmemekle birlikte İÖK etki mekanizmasında en çok adenosin, PKC, ısı şok proteinleri ve NO üzerinde durulmuştur (4) (Şekil 4).



Şekil 4. İskemik ön koşullamanın mekanizması (PKC: Protein kinaz C, NO: Nitrik oksit, NF-κB: Nükleer Faktör κB) (4).

2.6 Uzak İskemik Ön Koşullama

Bir organa uygulanan iskemi reperfüzyon epizodları başka bir organda iskemiye karşı dayanıklılık sağlamaktadır; bu yöntem UİÖK olarak adlandırılır (6). Uzak İÖK ilk olarak 1993' te kalpte gösterilmiştir (73). Deneysel ve klinik araştırmalar kalbe uygulanan İÖK'nin kalp dışında akciğer ve diğer organlarda İR hasarını azalttığını göstermiştir (74,75)

Cheung ve ark. (41) kardiyak cerrahi geçiren çocuklarda, alt ekstremiteye uygulanan İÖK'nin (beşer dk.lık dört döngü) miyokard fonksiyonuna etkilerini araştırmışlar ve UİÖK grubunda miyokard fonksiyonunun daha iyi, miyokard hasarının ise daha az olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada kısa periyodlar halindeki ekstremitte iskemisinin miyokarddaki enfarkt alanını %50 oranında azalttığı gösterilmiştir (74).

Renal arter İÖK'si ile miyokarddaki koruyucu etkinin araştırıldığı bir çalışmada oluşan koruyucu etkinin adozin reseptör antagonisti ile ortadan kalktığı bulunmuştur (2). Uzak İÖK'nin mekanizmasında adozin, bradikinin, norepinefrin ve ATP bağımlı K⁺ kanallarının rol oynadığı düşünülmektedir (74).

Kharbanda ve ark. (74) yaptıkları deneysel çalışmada alt ekstremiteye uygulanan beşer dk.lık dört döngü İÖK'nin, miyokard iskemisi sonrası ejeksiyon fraksiyonundaki azalmayı belirgin olarak önlediği ve miyokard enfarkt alanını anlamlı olarak küçülttüğünü bulmuşlardır.

Harkin ve ark.(76) bilateral, Olguner ve ark. (3) ise tek taraflı uygulanan alt ekstremitte İÖK'nin akciğerde oluşan İR hasarını engellediğini göstermişlerdir.

Karaciğer İÖK'sinin böbrek iskemisi üzerine etkileri araştıran deneysel araştırmada, İÖK uygulanan hayvanlarda lipid peroksidasyonunun uygulanmayanlara göre daha düşük olduğu bulunmuştur (50). Bu olumlu etkinin NO ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (32). Uzak İÖK'nin miyokard koruyucu etkisinin muhtemelen otonom sinir sistemi ve/veya hormonal faktörler ile olduğu belirtilmiştir (69). İskelet kasının İÖK'sinde salınan opioidler tüm iskelet kaslarını koruyan bir etkiyi tetiklemektedir. İskelet kasına benzer şekilde, mezenter arter oklüzyonu ile sağlanan miyokarddaki koruyucu etkinin naloksan ile ortadan kalktığı gösterilmiştir (46).

Kanoria ve ark.(32) rat bacağına uygulanan üç döngü 10 dk. iskemi 10 dk. reperfüzyon şeklinde yaptıkları UİÖK'nin karaciğer İR hasarına etkisini inceledikleri çalışmalarında iki saat reperfüzyon sonunda İR grubunun ortalama arter basınçları ve periferik oksijen saturasyonlarının (FiO₂ arttırılmış olmasına rağmen) UİÖK grubuna kıyasla anlamlı olarak daha düşük olduğunu bulmuşlardır.

2.7 Farmakolojik Ön Koşullama

Farklı birçok farmakolojik ajanın farklı noktalarda sinyal yollarını aktive ettiği ve böylece İÖK'yi taklit ettiği gözlemlenmiştir (77). Bu gözlemler İÖK'nin sağladığı etkileyici korumanın terapötik ajanlarla da sağlanabileceği düşüncesini oluşturmuştur (78,79).

İR hasarında amlodipin (7), verapamil (8) gibi Ca^{++} kanal blokerleri, mannitol, anjiyotensin dönüştürücü enzim (*ACE*) inhibitörleri, E-vit, propranolol, NAS gibi antioksidanlar, prednizolon (9), aspirin, prostaglandin E2 gibi antiinflamatuvarlar ve allopürinol (10), adenozin, antiproteazlar gibi serbest radikal inhibitörleri, eritropoetin (11) gibi çok sayıda koruyucu ajan farmakolojik ön koşullamada denenmiştir (12,13).

N-asetilsistein üzerinde en fazla çalışılan ilaçlardandır. N-asetil sistein doğal bir aminoasit olan L- Sisteinin N-asetillenmiş türevidir. Asetil sistein mukolitik bir ajan ve sistein proglutatan yapısında olan serbest radikal tutucu endojen bir antioksidandır (80). Oksidatif strese glutatyon havuzunu bir glutatyon prekürsörü olarak besler, glutatyon redoks siklusu, endoteli korumada iyi bir defans sistemi sağlar (81). N-asetil sistein glutatyon içeren bir asetillenmiş sülfidril grubudur. Antioksidan ısı koruyucu ve mikrodolaşımı iyileştirici etkileri çalışmalarda gösterilmiştir (81). Asetilsistein, akciğer ve karaciğerde glutatyon sentezine sistein verici olarak katılır ve glutatyon sentezini artırır, bununla beraber SOR'yi bağlayarak hücre koruyucu görev yapar (82). Parasetamol (asetaminofen) zehirlenmelerinde karaciğer harabiyetini azaltıcı etkisi vardır. Parasetamol karaciğerde metabolize edilirken az bir bölümü sitokrom P₄₅₀ enzim sistemi ile reaktif ara metabolite dönüşür ve glutatyonla bağlanarak idrarla atılır. %50 oranında plazma proteinlerine bağlanır. Eliminasyon yarı ömrü 6,25 saattir (82). Solunum yoluna ait enfeksiyon hastalıklarında koyu kıvamlı mukusun atılmasını kolaylaştırması nedeniyle akciğerde oksidatif hasarın önlenmesinde kullanılmaktadır (82).

Literatürde NAS ile yapılan birçok ön koşullama çalışmasında organ korunması sağlandığı gösterilmiştir (16-22). Smyrniotis ve ark.nın (19) 28 rat üzerinde yaptığı çalışmada NAS'ın karaciğer İR hasarını azalttığı karaciğer fonksiyon testleri ve histopatolojisi ile gösterilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmada ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 28 adet Wistar albino cinsi erişkin erkek rat kullanıldı. Ratlar araştırma başlangıcına kadar oda sıcaklığında (21-22 °C) % 40-60 nisbi nemde 12 saat aydınlık - 12 saat karanlık ortamda tutulup standart pellet yemi ve suyla beslendi. Cerrahi işlemden 12 saat öncesinden itibaren sadece su içmelerine izin verildi.

3.1 Anestezi Uygulaması

Anestezi intraperitoneal (i.p.) 50 mg/kg ketamin (Ketalar flk., Pfizer Pharma GMBH, Germany) ve 10 mg/kg ksilazin hidroklorid (Alfazyne % 2, Alfasan International, Holland) ile sağlandı. Gerektiğinde ratların anestezi derinliğini sabit tutmak için ketamin (yarı dozda, 25 mg/kg) refleks yanıtına (pensetle ayağa ağırlı uyaran verilmesi-pedal refleks,palpebral ve korneal refleksler) bakılarak tekrarlandı.

3.2 Deney Grupları ve Protokol

Grup I (Sham, n=7) : Laparotomi sonrası anestezinin 65.dk.sında hepatik pedikül diseke edilip başka bir girişim yapılmadan ratlar 270 dk. daha anestezi altında bekletildi.Böylelikle en uzun çalışma grubu süresi kadar (335 dk., Grup IV) anestezi süresi sağlanmış oldu.

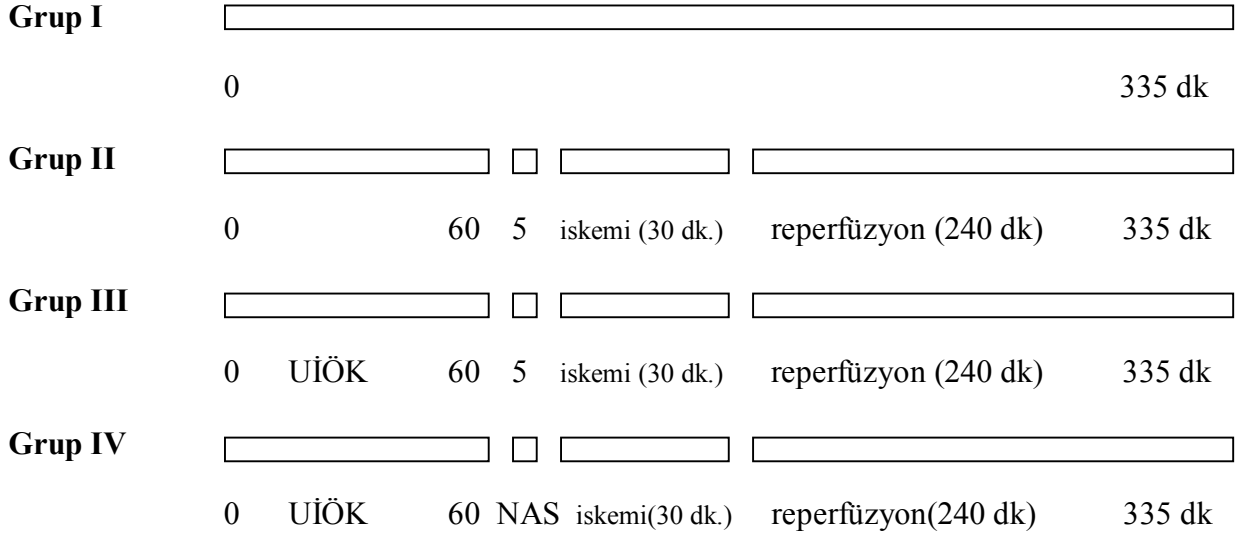
Grup II (İR, n=7): Laparotomi sonrası anestezinin 65.dk.sında karaciğere 30 dk. total iskemi ve sonrasında dört saat reperfüzyon uygulandı.

Grup III (UIÖK + İR, n=7): Laparotomi sonrasında sol arka bacağa 10 dk. iskemi ve 10 dk. reperfüzyon üç döngü uygulandıktan 5 dk. sonra Grup II'deki işlemler tekrarlandı.

Grup IV (UIÖK + NAS + İR, n=7): Laparotomi sonrasında sol arka bacağa 10 dk. iskemi ve 10 dk. reperfüzyon üç döngü uygulandıktan sonra anestezinin 60.dk.sında 150 mg/kg NAS (Asist amp 300 mg/3 ml amp, Hüsnü Arsan İlaç Sanayi, Türkiye) i.p. verildikten 5 dk. sonra Grup II'deki işlemler tekrarlandı.

Grup I'de hepatik pedikülün diseksiyonuna, Grup II'de iskemiye 65.dakikada başlamadaki amaç; Grup III ve IV'deki ön koşullama süresine eşitlemek ve böylelikle tüm gruplarda

anestezi süresinin (335 dk.) aynı olmasını sağlamaktı. Kan ve doku örnekleri reperfüzyon sonunda alındı.



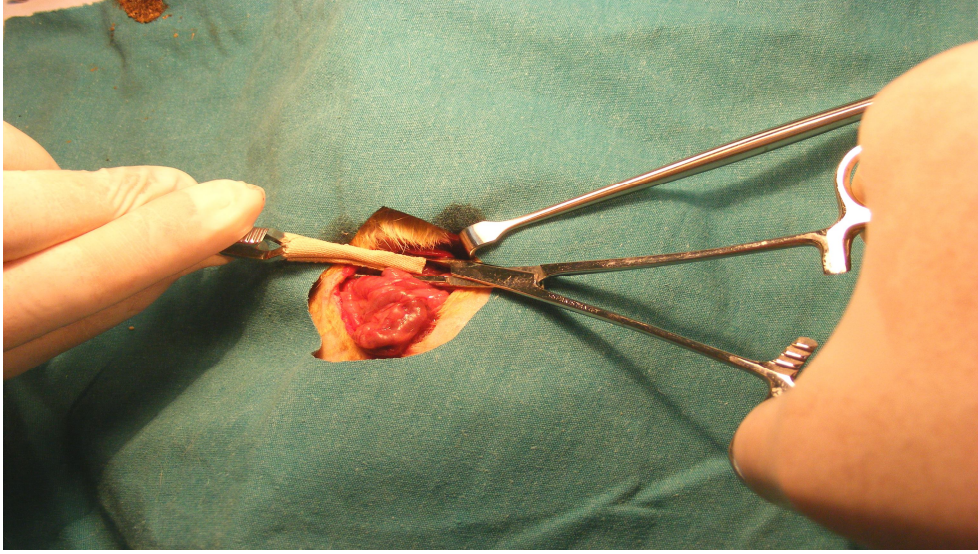
Şekil 5. Deneysel protokolün şematik görünümü.

3.3 Deneysel Çalışma Modeli

Tüm ratlar anestezi uygulamasından sonra operasyon masasına sabitlenerek supin pozisyonda abdomen orta hat insizyonu ile açıldı, karaciğer açığa çıkarıldı ve hepatik pedikül diseke edildi. Ratları hipotermiden korumak için çalışma süresince operasyon masası ısıtıcı bir lamba ile ısıtıldı ve rektal vücut sıcaklığı 37-37,5 °C arasında tutuldu. Dehidratasyonu önlemek amacıyla subkutan serum fizyolojik solüsyonu 3 ml/kg/sa uygulandı. Bekleme süreleri boyunca batın ıslak steril tamponlar ve cerrahi pens ile kapatıldı. (Resim 1)

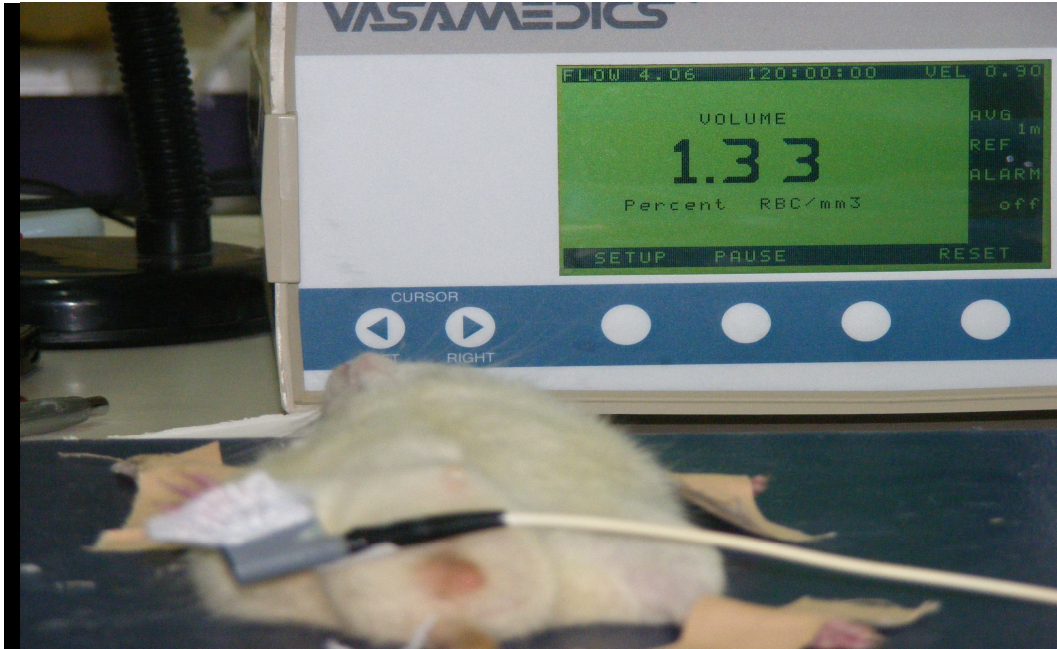
Deneysel karaciğer iskemi reperfüzyonu ve uzak iskemik ön koşullama yöntemi

Total karaciğer iskemisi, atravmatik mikrovasküler klemp ile hepatik pedikül sıkıştırılarak karaciğere giden portal ven ve arter akımı engellenerek sağlandı (Resim 1). Yeterli oklüzyon karaciğerde solukluk oluşması ile doğrulandı .

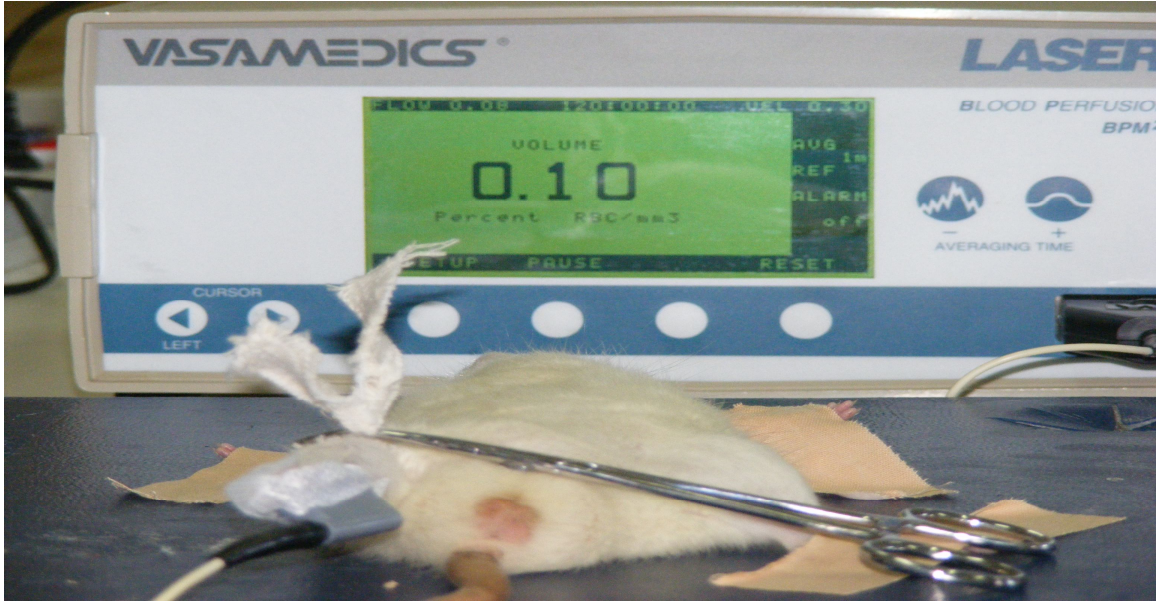


Resim 1. Ratın karaciğer kan akımının kesilmesi.

Uzak İÖK amacıyla turnike etkisi için, etkinliği perfüzyon sintigrafisi ve lazer akım ölçerle gösterilmiş olan yöntem kullanıldı (11,80). Bu amaçla ratın sol arka bacağı kasık bölgesinden elastik bandaj (1 cm eninde ve 30 cm uzunluğunda) ile üç kez çepeçevre dolanarak sıkıldı. Üç döngü halinde 10 dk. iskemi oluşturulup takiben 10 dk. reperfüzyon sağlandı. Kan akımının kesilmesi lazer akımölçer (*Laser Flo BPM2, Vasamedic, USA*) ile doğrulandı. (Resim 2,3)



Resim 2. Ratta bacak kan akımının lazer akımölçerle gösterilmesi



Resim 3. Ratın bacak kan akımının kesildiğinin lazer akımölçerle gösterilmesi.

Tüm gruplarda total çalışma süresi sonunda biyokimyasal çalışmalar için anestezi altındaki ratlara sternotomi yapıp sağ atriyumundan enjektör ile kan örneği alındı, daha sonra histopatolojik inceleme için karaciğer çıkarıldı ve ratlar eksanguinasyon ile (kardiyak *puncture*) sakrifiye edildi. Doku örnekleri % 10'luk tamponlu formaldehid içinde fikse edilip karaciğer hasarı histolojik olarak değerlendirildi.

3.4 Karaciğer Histopatolojisinin Değerlendirilmesi

Karaciğer doku örnekleri DEÜTF Histoloji AD Laboratuvarında incelendi. Işık mikroskopik inceleme için %10'luk tamponlu formaldehid solüsyonunda 24-48 saat fikse edildikten sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla bir gece akarsu altında yıkandı. Doku örnekleri dehidratasyon için sırasıyla % 70, % 80 ve % 96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika ve ardından üç farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki farklı ksilene tabi tutulduktan sonra iki kez birer saatlik parafin ile immersiyonu sağlandı. Daha sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2225, Leica,Köln,Almanya) aracılığı ile 5µm'lik (Feather S35) kesitler alındı. Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 30 dk. 60°C'lık etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dk. (etüvde) diğer ikisi onar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Kesitler daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve % 96'dan % 70'e azalan alkol serilerinden geçirilip distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dk. Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından,

boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dk akarsuda yıkanan kesitler, 2 dk. Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla % 70, % 80, % 96 ve 2 seri absolü alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dk. üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

Boyama işleminden sonra elde edilen kesitler ışık mikroskopik olarak incelendi (Olympus BX-50, Tokyo, Japonya) ve kesitlerden elde edilen görüntüler yüksek rezolüsyonlu bir kamera (Olympus DP-70, Tokyo, Japonya) içeren bilgisayara aktararak digital olarak fotoğrafları çekildi. Çekilen digital fotoğraflar digital görüntü analiz programı (*UTSCSA; Image tool version 3,0*) ile değerlendirildi. Karaciğer doku örnekleri hepatosit hasarı yönünden incelendi. Hücre histolojisindeki değişimler; konjesyon, nekroz, sitoplazmik vakuolizasyon ve eozinofili, nükleer piknozis ve enflamatuvar hücre yoğunluğu yönünden ışık mikroskopunda değerlendirildi. Değerlendirmede karaciğer histopatolojik hasar skoru (KHHS) kullanıldı (83). Skorlama KHHS'ye göre;

- 0: Hasar yok ya da minimal hasar,
- 1: Hafif hasar,
- 2: Orta hasar,
- 3: Şiddetli hasar şeklinde derecelendirildi

3.5 Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Reperfüzyon sonunda kan alımını takiben Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında, serum örnekleri kan pıhtılaştıktan sonra 3000 *rpm*'de 10 dk. santrifüj edilmesiyle elde edildi ve ölçümler yapılana kadar -20 C°'de saklandı. Serum AST, ALT, laktik dehidrogenaz (LDH) seviyeleri, DEÜTF Hastanesi Merkez Biyokimya Laboratuvarında "Cobos İntegra 800, Roche, USA" cihazı kullanılarak ölçüldü.

3.6 İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme için *Statistical Package of Social Sciences 15* (SPSS 15.0, *Chicago, IL, USA*) programı kullanıldı. Verilerin analizinde Kruskal-Wallis varyans analizi uygulandı. Grupların ikili karşılaştırmaları için Mann-Whitney U testi kullanılarak tüm veriler ortalama \pm standart sapma (ort \pm ss) olarak gösterildi. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirilen çalışmaya toplam 28 rat dahil edildi ve tüm denekler çalışmayı tamamladı. Çalışma gruplarının serum AST, ALT, LDH düzeyleri ile KHHS değerleri Tablo 1’de; istatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırılması Tablo 2’de sunulmuştur.

Tablo 1. Gruplara ait AST, ALT, LDH düzeyleri ve histopatolojik hasar skorları

	AST	ALT	LDH	Histopatolojik Hasar Skoru
Grup I (n=7) (Sham)	138,4±30,0	50,0±9,7	775,1±110,5	0,00±0,00
Grup II (n=7) (İR)	1034,7±521,0	834,2±427,6	1840,4±1144,0	2,28±0,48
Grup III (n=7) (UIÖK+İR)	1081,8±227,5	1203,6±297,8	2035,0±352,7	1,28±0,48
Grup IV (n=7) (UIÖK+NAS+İR)	1703,8±1145,3	1237,4±540,5	3147,7±1556,8	1,00±0,57
p ^a	0,005*	0,001*	0,005*	<0.001*

*p< 0,05: Gruplar arasında anlamlı fark

^aKruskal Wallis testi.

Tablo 2.Grupların AST, ALT, LDH, histopatolojik hasar skoru değerlerinin istatistiksel anlamlılıklarının (p^a değeri) karşılaştırılması.

		İR	UIÖK+İR	UIÖK+NAS+İR
AST	<i>Sham</i>	0.018*	0,0003*	0,002*
	İR		0,886	0,406
	UIÖK+İR			0,775
ALT	<i>Sham</i>	0,018*	0,003*	0,002*
	İR		0,086	0,064
	UIÖK+İR			0,475
LDH	<i>Sham</i>	0.11	0,003*	0,003*
	İR		0,775	0,085
	UIÖK+İR			0,153
Histopatolojik Hasar Skoru	<i>Sham</i>	0.001*	0.001*	0,002*
	İR		0,006*	0,003*
	UIÖK+İR			0,334

*p< 0,05: Gruplar arasında anlamlı fark.

^aMann Whitney U testi.

4.1.Karaciğer Histopatolojik Hasar Skoru (KHHS)

Sham (0,00±0,00), İR (2,28±0,48), UIÖK+İR (1,28±0,48) ve UIÖK+NAS+İR (1,00±0,57) grupları incelendiğinde *Sham* Grubu histopatolojik hasar skorları İR, UIÖK+İR, UIÖK+NAS+İR gruplarından anlamlı olarak düşük bulundu (p< 0,01) (Tablo 1). İskemi reperfüzyon grubu ile UIÖK+İR ve UIÖK+NAS+İR gruplarının skorları karşılaştırıldığında İR grubunda anlamlı yükseklik saptanırken (p< 0,01) , UIÖK+İR ve UIÖK+NAS+İR grupları arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,334) (Tablo2).

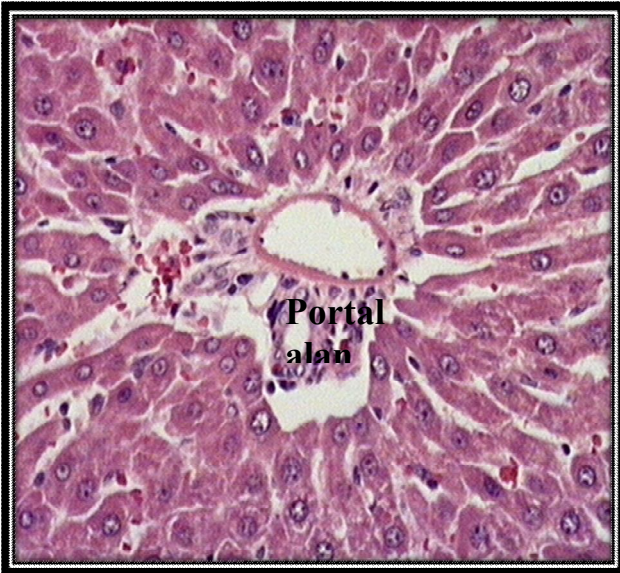
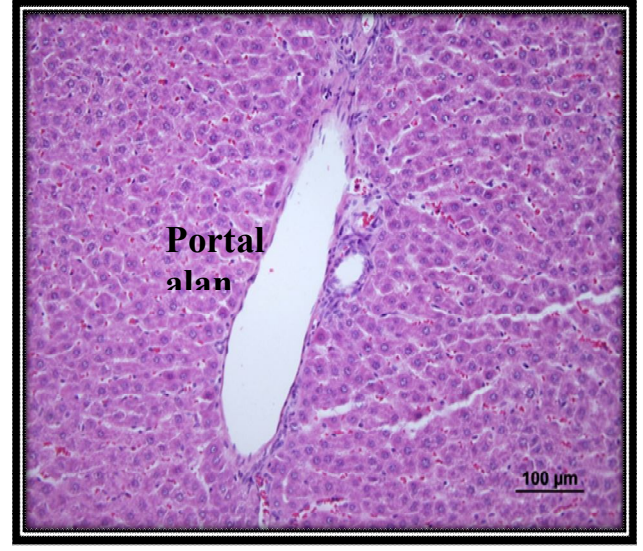
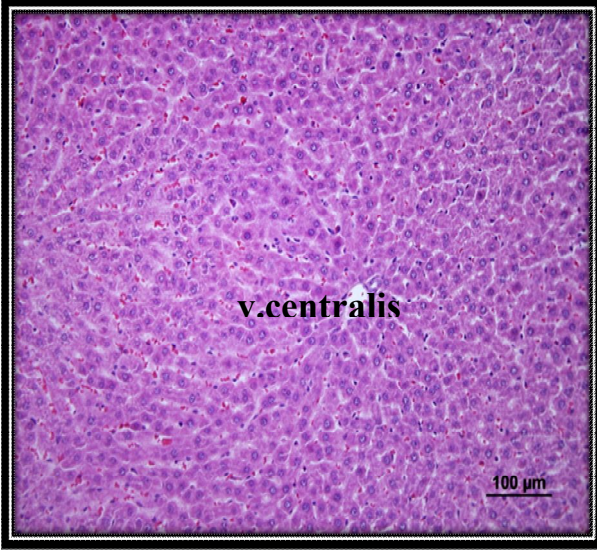
Karaciğer dokusunun H-E boyasıyla boyanmış kesitlerinin incelenmesi ile gruplar arasında farklı hücresel değişikliklerin olduğu gözlemlendi. *Sham* grubuna ait karaciğer kesitleri incelendiğinde, klasik karaciğer lobülünün ortasında vena sentralis, vena sentralisden ışınal biçimde periferde doğru uzanan hepatosit kordonları ve bu kordonların arasında yer alan sinüzoidler dikkati çekti. Sinüzoidler normal yapıda ve genişlikte gözlemlendi. Hepatositlerde nükleus yuvarlak ve çoğunlukla ökromatik, sitoplazma ise eozinofilik boyandı. Sinüzoidlerde

endotel hücrelerinin nükleusları ise yassı ve koyu boyanmış olarak izlendi. Endotel hücrelerinin arasında ya da lümeneye bakan yüzünde tutunmuş olarak endotel hücrelerinden daha büyük, nükleusları oval ve soluk boyanan Kupffer hücrelerine rastlandı. Portal alanlarda, vena porta, arteria hepatica, safra duktusu ve lenfatik damar normal olarak gözlemlendi. *Sham* grubuna ait kesitlerde herhangi bir hücre infiltrasyonu gözlemlenmedi (Resim 4).

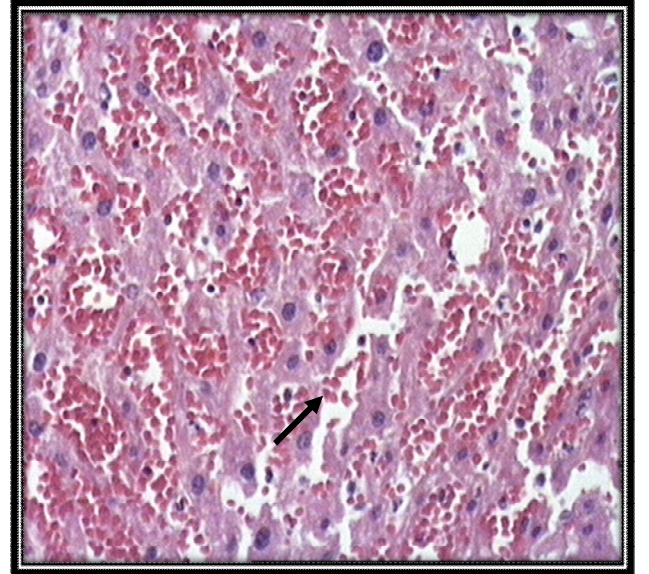
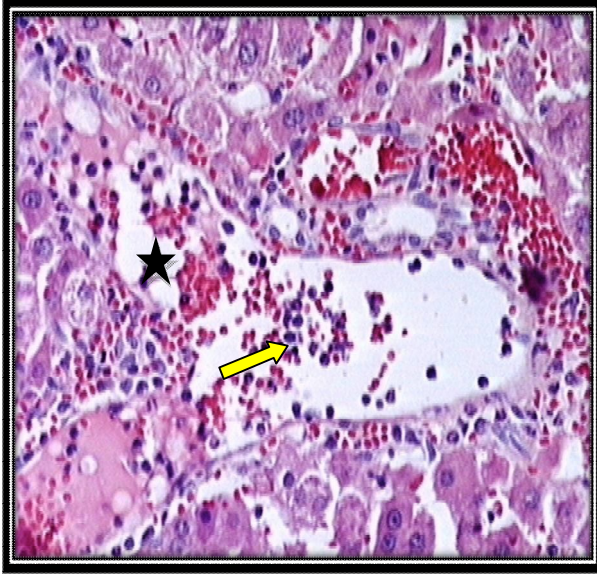
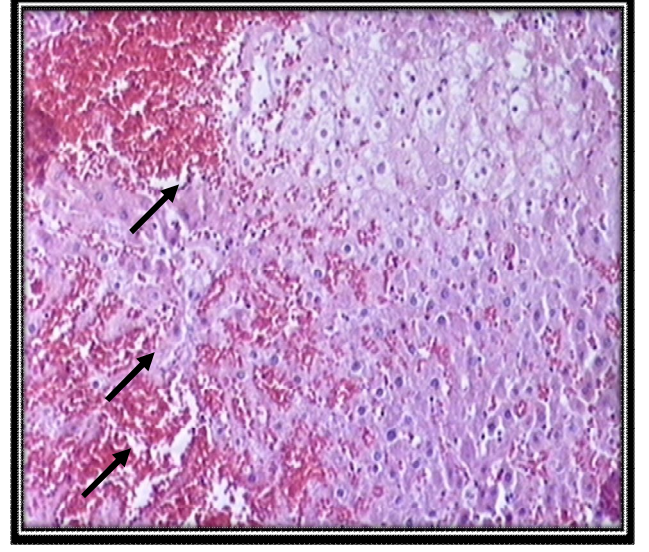
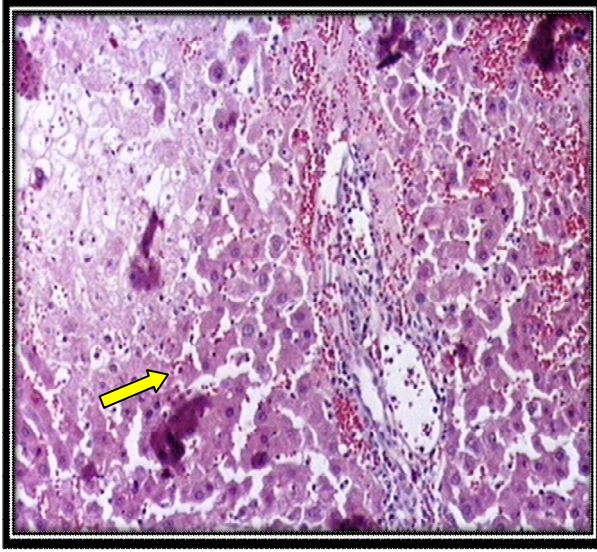
İskemi reperfüzyon grubunda ise hepatosit hücre kordonlarının bütünlüğü bozulmuş, sinüzoidlerde dilatasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu ve portal alanda dilatasyon görüldü. Ayrıca bazı bölgelerde yaygın fokal nekroz gözlemlendi (Resim 5).

Uzak İÖK + İR Grubunda hepatosit hücre kordonlarının bütünlüğü İR'ye göre daha düzenli, sinüzoidlerde daha az derecede dilatasyon, daha az mononükleer hücre infiltrasyonu ve hepatositlerde daha az dejenerasyon görüldü. Ayrıca bazı bölgelerde nadir olarak fokal nekroz gözlemlendi (Resim 6).

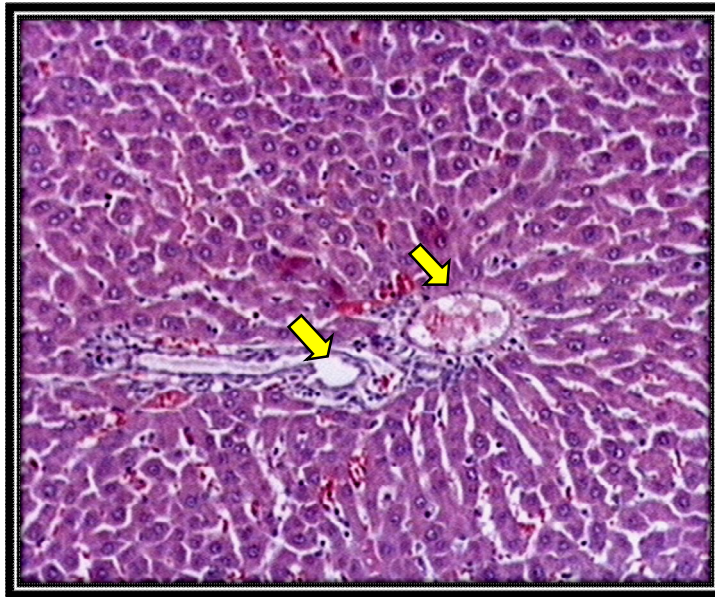
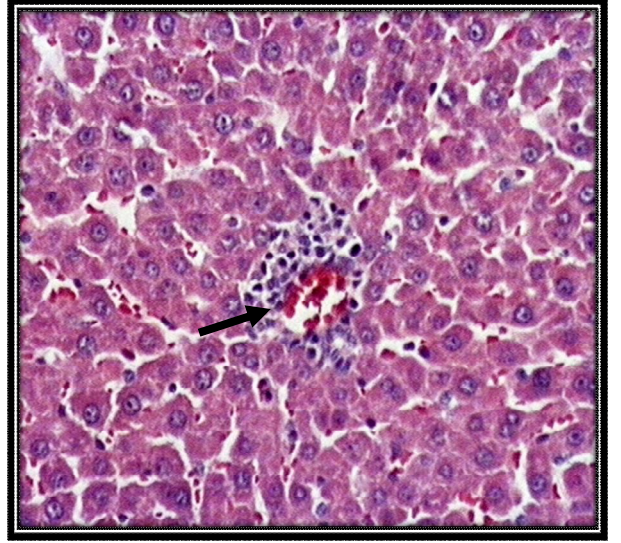
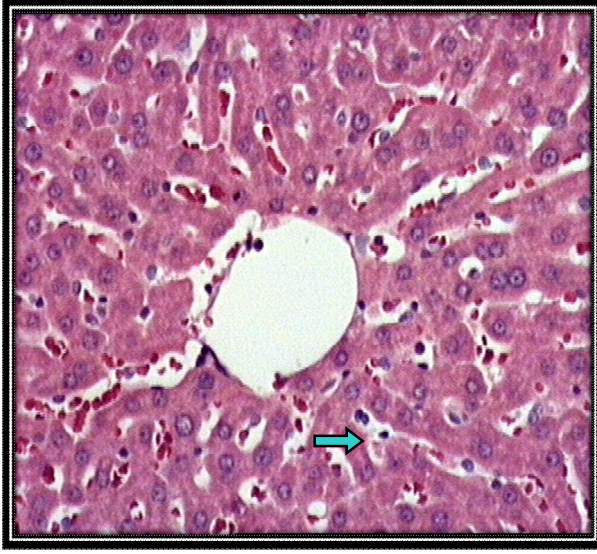
Uzak İÖK + NAS + İR Grubunda hepatosit hücre kordonlarının bütünlüğü İR'ye göre daha düzenli, sinüzoidlerde daha az derecede dilatasyon, daha az mononükleer hücre infiltrasyonu ve hepatositlerde daha az dejenerasyon görüldü. Ayrıca bazı bölgelerde nadir olarak fokal nekroz gözlemlendi. Uzak İÖK + İR Grubuna göre karaciğer dokusu daha iyi korunduğu görüldü (Resim 7).



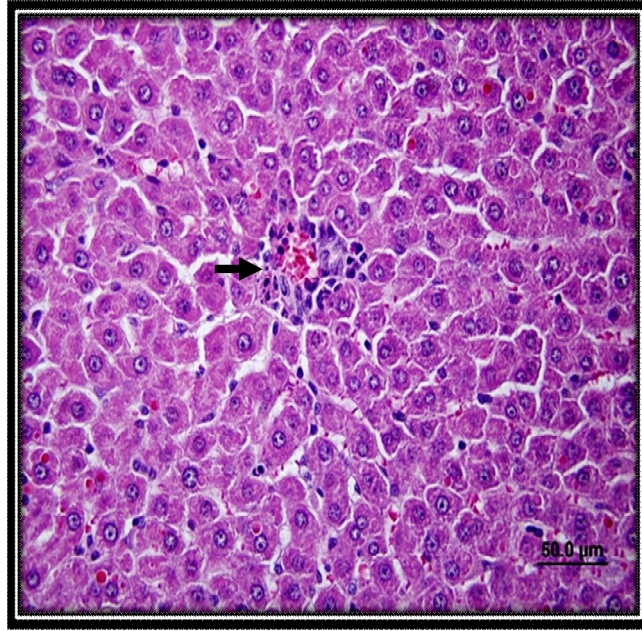
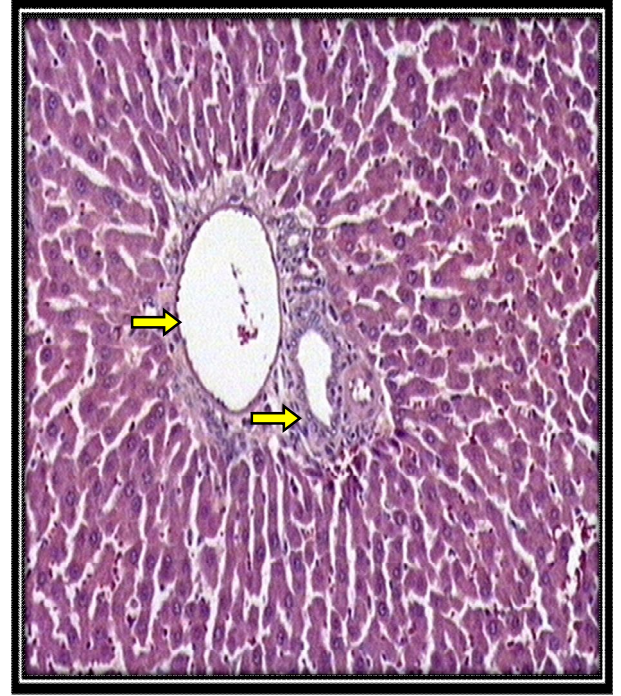
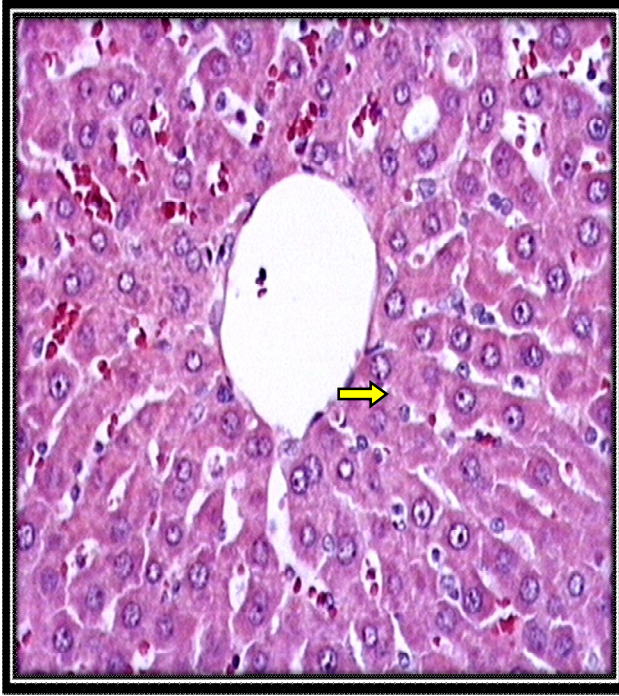
Resim 4. *Sham* Grubuna ait H-E ile boyanmış karaciğer dokusu kesit görüntüleri (X20,X40).



Resim 5. İskemi Reperfüzyon Grubuna ait H-E ile boyanmış karaciğer dokusu kesit görüntüleri (X20,X40). Hücre kordonlarının bütünlüğü bozulmuş, sinüzoidlerde dilatasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu (★), eritrosit ekstravazasyonu(→) ve hepatositlerde fokal nekroz (⇨) görüldü.



Resim 6.Uzak İskemik Ön Koşullama + İskemi Reperfüzyon Grubuna ait H-E ile boyanmış karaciğer dokusu kesit görüntüleri (X20,X40).Hepatosit hücre kordonlarının bütünlüğü İR göre daha düzenli, sinüzoidlerde daha az derecede dilatasyon (→),; portal alan normale yakın görünümde (→), azalmış hepatositlerde fokal nekroz (→) gözlemlendi



Resim 7. Uzak İskemik Ön Koşullama +NAS+ İskemi Reperfüzyon Grubuna ait H-E ile boyanmış karaciğer dokusu kesit görüntüleri (X20,X40). Sinüzoidlerde daha az derecede dilatasyon; portal alan normale yakın görünümde (→), nadir hepatositlerde fokal nekroz (→).

4.2. Biyokimyasal Parametreler (AST, ALT, LDH)

Sham Grubunda **AST** değerleri diğer üç grupla karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük saptandı ($p < 0,05$). İskemi Reperfüzyon Grubu **AST** değerleri ile UIÖK+İR ve UIÖK+NAS+İR grupları **AST** değerleri arasında anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=0,886$; $p=0,406$). Uzak İÖK Grubu ve UIÖK+NAS+İR Grubu **AST** değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,775$).

Sham Grubunda **ALT** değerleri diğer üç grupla karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük saptandı ($p < 0,05$). İskemi Reperfüzyon Grubu **ALT** değerleri ile UIÖK+İR ve UIÖK+NAS+İR grupları **ALT** değerleri arasında anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=0,086$; $p=0,064$). Uzak İÖK Grubu ve UIÖK+NAS+İR Grubu **ALT** değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,475$).

Sham Grubunda **LDH** değerleri UIÖK+İR ve UIÖK+NAS+İR grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük saptanırken ($p < 0,01$) İR Grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,11$). İskemi Reperfüzyon Grubu **LDH** değerleri ile UIÖK+İR ve UIÖK+NAS+İR grupları **LDH** değerleri arasında anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=0,775$; $p=0,085$). Uzak İÖK grubu ve UIÖK+NAS+İR grubu **LDH** değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,153$).

5.TARTIŞMA

Bu deneysel çalışmada rat karaciğer total İR modelinde UIÖK ve UIÖK'ye eklenen NAS'ın karaciğer İR hasarını histopatolojik olarak anlamlı düzeyde azalttığı gösterildi. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, KHHS'nin UIÖK+NAS+İR grubunda UIÖK+İR grubuna göre daha düşük olduğu saptandı.

İskemi reperfüzyon hasarı karaciğer travmaları, rezeksiyonu ve transplantasyonu sonrası ortaya çıkabilen klinik bir problemdir. Dokuya reperfüzyonla enerji temini sağlanır ve toksik metabolitler uzaklaştırılır. Ancak toksik metabolitlerin sistemik dolaşıma dönmesi ciddi metabolik sonuçlara yol açar ve reperfüzyon lokal doku hasarını artırır. Reperfüzyonla aktive olan birçok mekanizma ile ortaya çıkan toksik ürünler, başta akciğer olmak üzere kalp, beyin, böbrek gibi uzak organlarda hasar oluşturur ve uzun süreli yoğun bakım izlemi gerektirebilecek *MOF*'a neden olabilmektedir (24,84).

Bu çalışmada kolay temin edilebilmesi, deneysel İR ve UIÖK modellerinin kullanıldığı ve NAS'ın doku koruyucu etkinliğinin incelendiği çalışmalarda daha çok rat kullanılmış olması nedeniyle deney hayvanı olarak rat seçildi (19,84-86).

Karaciğerdeki İR hasarı kolestazi indükleyerek safra sekresyonunda geçici azalmaya neden olmaktadır. Safra akımındaki değişiklikler ALT-AST düzeyleri, karaciğer miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ve serum bilirubin değerlerinde artmayla sonuçlanmakta; 1-3 gün içinde normale dönmektedir (38). Hepatik İR hasarının, hücresel etkilerinin en iyi göstergeleri serum AST, ALT, LDH gibi enzim aktiviteleri ve histopatolojik değişimlerdir (24,87). Bu nedenle çalışmamızda İR hasarı göstergeleri olarak ALT, AST, LDH ve histopatolojik hasar skoru kullanılmıştır.

Deneysel karaciğer İR modellerinde, total (30) veya parsiyel iskemi (25) yöntemleri kullanılabilir. Parsiyel iskeminin daha az mezenterik konjesyona neden olduğu ancak bu yöntemin uygulama zorluğunun yanı sıra klinik koşulları tam yansıtmadığı öne sürülmektedir. Hemodinamik stabilite bozulmadan hasar oluşturulan total karaciğer iskemi süresi en az 25 dk. olarak saptanmıştır (32,84). Bu çalışmada klinik uygulamalara (Pringle manevrası) yakınlığı nedeniyle 30 dk. total iskemi süresi seçildi.

Bu çalışmada 30 dk. total iskemi sonrasında karaciğer hasarının olduğu biyokimyasal ve histopatolojik yöntemlerle gösterilmiştir. İskemi reperfüzyon grubundaki histopatolojik ve biyokimyasal (AST-ALT) değişikliklerin *Sham* Grubundan anlamlı olarak farklı oluşu İR modelinin doğru uygulandığını göstermektedir. Çalışmamızda; Şahin ve ark.nın (84)

sonuçlarına benzer şekilde UIÖK uygulanan gruplarda İR grubuna göre KHHS'nin daha düşük bulunması UIÖK modelinin doğru uygulandığını düşündürmektedir.

İlk olarak Pryzklenk ve ark. (73) tarafından uygulanan UIÖK' nin koroner arterlerin perfüzyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir. Uzak İÖK' nin miyokard dışında akciğer (25), böbrek (50), iskelet kası (45) ve barsaklarda (53) da etkin olduğu bulunmuştur. Olguner ve ark. (3) tek taraflı arka bacak İR'si öncesinde turnike yöntemiyle uygulanan UIÖK'nin akciğerde lökosit infiltrasyonu ve lipid peroksidasyonunu engellediğini göstermişlerdir. Harkin ve ark. (76) domuzlarda bilateral alt ekstremite iskemisi öncesinde gerçekleştirilen İÖK'nin İL-6 düzeyi, dolaşımdaki lökosit sayısı, pulmoner ödem ve solunum yetersizliği bulgularını azaltarak akciğer hasarını engellediğini saptamışlardır.

Uzak İÖK' nin İR hasarını azaltmaktaki etkisini gösteren çalışmalar karaciğer İR hasarından korunmada noninvaziv bir yöntem arayışını gündeme getirmiştir. Uzak İÖK' nin karaciğere direkt bir stres uygulamadan İR hasarından korunmada etkili ve kolay bir yöntem olabileceği savunulmuştur (32,88). Lai ve ark. (88) rat karaciğerinin parsiyel iskemisi öncesinde femoral arter kan akımını mikrovasküler klemple keserek alt ekstremiteye uyguladıkları 4 döngü İÖK' nin karaciğer hasarını azaltmada etkili olduğunu bulmuşlardır. Küntscher ve ark (75) geçici iskemi oluştururken damar kan akımını direkt kesmek yerine noninvaziv turnike uygulamasının UIÖK' de alternatif yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Saita ve ark. (45) İR hasarını engelleyen en etkili İÖK yönteminin üç kez 10 dk. iskemi ve 10 dk. reperfüzyon şeklinde olduğunu bildirmişlerdir. Kanoria ve ark. (32) klinik uygulamaya daha yakın olduğunu düşündükleri total karaciğer iskemi modelinde UIÖK' nin etkinliğini araştırmışlar ve üç döngü uygulanan UIÖK' nin serum transaminaz değerlerini düşürdüğünü, hepatik kan akımını arttırdığını ve periferik oksijen saturasyonunu yükselttiğini saptamışlardır. Bu çalışmada, literatürde (32,45) ve kliniğimizde daha önce yapılan tez çalışmalarında (84,86) etkinliği gösterilmiş olan alt ekstremiteye üç döngü şeklinde turnike uygulaması ile yapılan UIÖK yöntemi kullanıldı.

Abu-Amara ve ark. (89) karaciğer iskemisi öncesinde alt ekstremiteye altı kez dörder dakika uyguladıkları UIÖK' nin karaciğer hasarını azalttığını göstermişlerdir. Şahin ve ark. (84) on dakikalık üç döngü alt ekstremite UIÖK' nin karaciğeri İR hasarından biyokimyasal ve histopatolojik olarak koruduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda da bu araştırmacıların

sonuçlarına benzer şekilde UIÖK' nin karaciğer İR'si sonrası KHHS'yi anlamlı olarak azalttığını saptadık.

N-asetilsistein, akciğer ve karaciğerde glutasyon sentezine sistein verici olarak katılır ve glutasyon sentezini artırmakta, bununla beraber serbest oksijen radikallerini bağlamakta ve muhtemel hücre hasarını önleyerek, koruyucu görev yapmaktadır (82). Bu çalışmanın hipotezinde UIÖK ile beraber NAS kullanımının daha iyi organ koruması sağlayacağı düşünüldü. Bu uygulama karaciğer rezeksiyonu ve karaciğer transplantasyonu öncesinde kolay uygulanabilmesi ve kliniğe katkı sağlayabileceği için tercih edildi.

Tek başına NAS uygulaması ile organ korunması sağlandığı bilinmektedir (16-22). Smyrniotis ve ark.'nın (19) yaptığı çalışmaya göre NAS'ın (0,3 mg/g i.v.) karaciğer İR hasarını azalttığı karaciğer fonksiyon testleri ve histolojisi ile gösterilmiştir. Galhardo ve ark (17) hepatic iskemi öncesi NAS (150 mg/kg, i.v.) uyguladıkları ratlarda karaciğer dokusunda nekroz, apopitoz ve mikroveziküler yağlanmanın İR grubuna göre azaldığını bulmuşlardır. Sehirli ve ark.(22) renal iskemi öncesi NAS (150 mg/kg, i.p.) uyguladıkları ratlarda oksidatif hasarın azaldığını göstermişlerdir. Ancak bu çalışmacılardan farklı olarak Ghosh ve ark. (14) ile Bauman ve ark. (15) köpeklerde yaptıkları çalışmalarda iskemi öncesi verilen NAS' ın (150 mg/kg, i.v) karaciğer İR hasarını azalttığını saptayamamışlardır.

Çalışmamızda karaciğer total iskemisi öncesi UIÖK uygulanmasını takiben NAS (150 mg/kg, i.p.) verilen grubun KHHS'si İR grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu. Uzak İÖK+NAS grubunun hasar skoru UIÖK grubu ile karşılaştırıldığında daha düşük olmakla birlikte bu fark anlamlı bulunmadı. Denek sayısının daha fazla olması durumunda bu farkın anlamlılık kazanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız biyokimyasal parametrelerden AST ve ALT düzeyleri tüm gruplarda *Sham* Grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. LDH düzeylerinde *Sham* Grubuna göre UIÖK ve UIÖK+NAS gruplarında anlamlı, İR Grubunda ise anlamlı olmayan bir yükseklik saptandı. Biyokimyasal parametrelerin (AST,ALT,LDH) düzeyleri açısından İR Grubu ile UIÖK ve UIÖK+NAS Grupları arasında anlamlı bir fark bulunmaması koruyucu etkinliğin biyokimyasal olarak gösterilemediğine işaret etmektedir.

Çalıştığımız biyokimyasal parametrelerin karaciğere sensitif olmakla birlikte spesifik olmayıp kas hasarı gibi çeşitli organ hasarlarında da yükselebildiği gösterilmiştir (90-92).

Histopatolojik olarak İR Grubu ile UIÖK ve UIÖK+NAS grupları arasında saptanan anlamlı farkın biyokimyasal sonuçlarla desteklenememesinin nedeni kullanılan turnike ile meydana gelen kas hasarına bağlı olabilir. Ayrıca biyokimyasal parametreler deney sonunda aldığımız serum örneklerinde çalışılması yerine karaciğer hasarına daha spesifik olan karaciğer dokusunda çalışılırdı gruplar arası farkın daha doğru bir göstergesi olabilirdi (93). Biyokimyasal analizlerin serum örneklerinden yapılması bu çalışmanın kısıtlılığıdır.

Uzak İÖK karaciğerde ek stres oluşturmadan , operasyon sırasında cerrahi süre ve kan kaybını arttırmaksızın kolaylıkla uygulanabilen noninvaziv bir yöntem olabilir. Ulaşabildiğimiz kaynaklar ve literatür taramasında, karaciğer İR modellerinde daha iyi organ korunması sağlayacağını düşündüğümüz UIÖK ile birlikte NAS uygulamasıyla ilgili bir çalışmaya rastlamadık. Bu çalışma modeli, karaciğer rezeksiyonu ve karaciğer transplantasyonu öncesinde kolay uygulanabileceği ve kliniğe katkı sağlayabileceği nedeniyle tercih edildi.

Bu çalışmada UIÖK ve UIÖK ile birlikte uygulanan NAS'ın karaciğer İR hasarını anlamlı olarak azalttığı histopatolojik olarak gösterildi. Her iki yöntem arasında histopatolojik olarak anlamlı bir fark saptanmamakla beraber UIÖK+NAS grubunda KHHS daha düşük bulundu. Karaciğer İR hasarını azaltmada her iki yöntem arasında biyokimyasal parametreler (AST,ALT,LDH) açısından fark gösterilemedi.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak; bu deneysel çalışmada rat karaciğer total İR modelinde UIÖK ve UIÖK+NAS' ın İR hasarını histopatolojik olarak anlamlı düzeyde azalttığı saptanırken UIÖK+NAS ve UIÖK grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Biyokimyasal parametreler (AST,ALT,LDH) açısından karaciğer İR hasarını azaltmada her iki yöntemin de etkinliği gösterilemedi.

Major karaciğer ameliyatlarında, cerrahi süreyi uzatmadan ve organa ek hasar oluşturmadan İR hasarını önlemek için UIÖK' nin ve UIÖK+NAS' ın uygulanabilir yöntemler olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu iki yöntemin etki mekanizmaları ve etkinlikleri açısından farklarının ortaya konacağı deneysel ve klinik çalışmalara gereksinim olduğu sonucuna varıldı.

7. KAYNAKLAR

1. Collard C, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations and preventations of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*, 2001;94:1133-8.
2. Huang SS, Wei FC, Hung LM. Ischemic preconditioning attenuates postischemic leukocyte endothelial cell interactions role of nitric oxide and protein kinase C. *Circ J*, 2006;70:1070-5.
3. Olguner C, Koca U, Kar A, Karci A ve ark. Ischemic preconditioning attenuates the lipidperoxidation and remote lung injury in the rat model of unilateral lower limb ischemia reperfusion. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2006;50:150-5.
4. Gueler F, Park JK, Rong S. Statins attenuate ischemia-reperfusion injury by inducing heme oxygenase-1 in infiltrating macrophages. *Am J Pathol*, 2007;170:192-9.
- 5- Laurikka J, Zhong-Kai W, Lisalo P, Kaukinen L et al. Regional Ischemic Preconditioning Enhances Myocardial Performance in Off-Pump Coronary Artery Bypass Grafting. *Chest*, 2002;121:1183-9.
6. Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, Yabe T et al. Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: effects of “remote preconditioning”. *J Am Coll Cardiol*, 1999;33:556-64.
7. Pronobesh C, Dagagi A, Pallab C, Kumar W. Protective role of the calcium channel blocker amlodipine against mitochondrial injury in ischemia and reperfusion injury of rat liver. *Acta Pharm*, 2008;58:421-28.
8. Erdoğan O, Yıldız S, Başaran A, Demirbaş A ve ark. Effect of intraportal verapamil infusion on hepatic ischemia-reperfusion injury. *Pol J Pharmacology*, 2001;53:137-41
9. Meng W, Feng S, Le-Hua S, Tao X et al. Protective effects of prednisolone on ischaemia - induced liver injury in rats. *World J Gastroenterology*, 2008; 14(27): 4332-37.
10. Ping-Guo L, Song-Qing H, Yan-Hong Z, Jian W. Protective effects of apocynin and allopurinol on ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice. *World J Gastroenterol*, 2008; 14(18):2832-7.
11. Yılmaz S, Ateş E, Tokyol Ç. The protective effect of erythropoetin on ischemia/reperfusion injury liver. *HPB*, 2004; 6(3): 169-73.
12. Grace P. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*, 1994;81:637-47.

13. Holger E, Charles C. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *British Medical B*, 2004;70:71-86.
14. Ghosh S, Baumann J, Falusi B, Bogár L et al. Hemodynamic effects of N-acetylcysteine and ischemic preconditioning in a liver ischemia-reperfusion model. *Orv Hetil* 2008;149(47): 2245-9.
15. Baumann J, Ghosh S, Szakmany T, Jancso G et al. Short-term effects of N-acetylcysteine and ischemic preconditioning in a canine model of hepatic ischemia-reperfusion injury. *Eur Surg Res*, 2008;41(2): 226-30.
16. Khanna G, Diwan V, Singh M, Singh N et al. Reduction of ischemic, pharmacological and remote preconditioning effects by an antioxidant N-acetyl cysteine pretreatment in isolated rat heart. *Yakugaku Zasshi*, 2008;128(3):469-77.
17. Galhardo M, Júnior C, Riboli Navarro P, Morello RJ et al. Liver and lung late alterations following hepatic reperfusion associated to ischemic preconditioning or N-acetylcysteine. *Microsurgery*, 2007;27(4):295-9.
18. Orban J, Levraut J, Gindre S, Deroche D et al. Effects of acetylcysteine and ischaemic preconditioning on muscular function and postoperative pain after orthopaedic surgery using a pneumatic tourniquet. *Eur J Anaesthesiol*, 2006;23(12):1025-30.
19. Smyrniotis V, Arkadopoulos N, Kostopanagiotou G, Theodoropoulos T et al. Attenuation of ischemic injury by N-acetylcysteine preconditioning of the liver. *J Surg Res*, 2005;129:31-7.
20. Montero E, Quireze C. Bile duct exclusion from selective vascular inflow occlusion in rat liver: role of ischemic preconditioning and N-acetylcysteine on hepatic reperfusion injury. *Transplant Proc*, 2005;37(1):425-7
21. Glantzounis GK, Yang W, Koti RS, Mikhailidis DP et al. Continuous infusion of N-acetylcysteine reduces liver warm ischaemia-reperfusion injury. *Br JSurg*, 2004;91(10):1330-9.
22. Sehirli AO, Sener G, Satiroglu H, Ayanoğlu-Dülger G. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Nephrol*, 2003;16(1):75-80.
23. Clavien P, Selzner M, Rudiger H, Graf R et al. Prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg*, 2003;238: 843-52.
24. Carden D, Granger D. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol*, 2000;190:255-66.

25. Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpí E et al. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology*, 1999;30:1481-9.
26. Peralta C, Fernández L, Panés J, Prats N et al. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of Tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology*, 2001;33:100-13.
27. Atila K, Çöker A, Sagol O, Çöker I ve ark. Protective effects of carnitine in an experimental ischemia-reperfusion injury. *Clinical Nutrition*, 2002;4:309-13.
28. The Cryonics Institute.(2008) Ischemia and reperfusion injury in cryonics. The web site: <http://www.benbest.com/cryonicsischemia.html>.
29. Kumar V, Cotran R, Robbins SL. *Basic Pathology*, 8th ed. WB Saunders; 2007. P:13-18
30. Peralta C, Bartrons R, Serafin A, Blázquez C et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Hepatology*, 2001;34:1164-73.
31. Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning (forebrain ischemia/gene expression). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995;92:4666-70.
32. Kanoria S, Jalan R, Davies N, Seifalian A et al. Remote ischaemic preconditioning of the hind limb reduces experimental liver warm ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*, 2006;93:762-68.
33. Göksel Ş, Yeğen BÇ. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim*, 2009;22(3):5-13.
34. Howell J, Zibari G, Brown M, Burney DL et al. Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions. *Transplantation* 2000;69:300-6.
35. Peralta C, Closa D, Xaus C, Gelpí E et al. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology*, 1998;28:768-73.
36. Heijnen B, Straatsburg I, Padilla N, Van Mierlo G et al. Inhibition of classical complement activation attenuates liver ischaemia and reperfusion injury in a rat model. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology*, 2005;143:15-23
37. Birincioğlu M. Türk Farmakoloji Derneği.(2004) İskemi-reperfüzyon tekniklerine genel giriş. <http://www.tfd.org.tr/gaziantep.html>.

38. Nieuwenhuijs V, De Bruijn M, Padbury R, Barritt G. Hepatic ischemia-reperfusion injury: roles of Ca^{2+} and other intracellular mediators of impaired bile flow and hepatocyte damage. *Digestive Diseases and Sciences*, 2006;51:1087-102 .
39. Quireze C, Souza Montero E, Leitão E, Juliano Y et al. Ischemic preconditioning prevents apoptotic cell death and necrosis in early and intermediate phases of liver ischemia-reperfusion injury in rats. *J Investigative Surg*, 2006;19:229-36.
40. Koti R, Seifalian A, Davidson B. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg*, 2003;20:383-96.
41. Cheung M, Kharbanda R, Konstantinov I, Shimizu M et al. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery. First clinical application in humans. *J Am Coll Cardiol*, 2006;47:2277-82.
42. Soreide O, Grimsgaard C, Solheim K, Trippestad A. Time and cause of death for 301 patients operated on for abdominal aortic aneurysm. *Age Ageing*, 1982;11:256-60.
43. Fernández L, Heredia N, Peralta C, Xaus C et al. Role of ischemic preconditioning and the portosystemic shunt in the prevention of liver and lung damage after rat liver transplantation. *Transplantation*, 2003;76:282-89.
44. Kaszaki J, Wolfárd A, Szalay L, Boros M. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc*, 2006;38:826-28.
45. Saita Y, Yokoyama K, Nakamura K, Itoman M. Protective effect of ischaemic preconditioning against ischaemia-induced reperfusion injury of skeletal muscle: how many preconditioning cycles are appropriate? *Br J Plast Surg*, 2002;55:241-45.
46. Addison D, Neligan P, Ashrafpour H, Khan A et al. Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003;285:H1435-H43.
47. Murry C, Jennings R, Reimer K. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986;74:1124-36.
48. Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology*, 1999;29:126-32.
49. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpí E et al. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology*, 1997;25:934-7.

50. Ates E, Genc E, Erkasap N, Erkasap S ve ark. Renal protection by brief liver ischemia in rats. *Transplantation*, 2002;74:1247-51.
51. Gurcun U, Discigil B, Boga M, Ozkisacik E ve ark. Is remote preconditioning as effective as direct ischemic preconditioning in preventing spinal cord ischemic injury? *J Surg Res*, 2006;135:1-9.
52. Dave K, Saul I, Prado R, Busto R et al. Remote organ ischemic preconditioning protect brain from ischemic damage following asphyxial cardiac arrest. *Neuroscience Letters*, 2006;404:170-5.
53. Davis J, Gute DC, Jones S, Krsmanovic A et al. Ischemic preconditioning prevents postischemic P-selectin expression in the rat small intestine. *Am J Physiol*, 1999;277:H2476-H81.
54. Lloris-Carsi J, Cejalvo D, Toledo-Pereyra L, Calvo M et al. Preconditioning: Effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc*, 1993;25:3303-4.
55. Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, Maeda T et al. Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning. *Br J Surg*, 1998; 85:1636-40.
56. Tsuyama H, Shimizu K, Yoshimoto K, Nezuka H et al. Protective effect of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Transplant Proc*, 2000;32:2310-13.
57. Yadav S, Sindram D, Perry D, Clavien P. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 1999;30:1223-31.
58. Koti R, Yang W, Dashwood M, Davidson B et al. Effect of ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Liver Transpl*, 2002;8:1182-91.
59. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P et al. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection a controlled study. *Ann Surg*, 1999;229:369-75.
60. Arai M, Thurman R, Lemasters J. Contribution of adenosine A2 receptors and cyclic adenosine monophosphate to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cells against storage/reperfusion injury in rat livers. *Hepatology*, 2000;32:297-302.
61. Ricciardi R, Meyers W, Schaffer B, Kim R et al. Protein kinase C inhibition abrogates hepatic ischemic preconditioning responses. *J Surg Res*, 2001;97:144-49.
62. Carini R, Grazia De Cesaris M, Splendore R, Vay D et al. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology*, 2001;33:131-39.

63. Ishikawa Y, Yamamoto Y, Kume M, Yamagami K et al. Heat shock preconditioning on mitochondria during warm ischemia in rat livers. *J Surg Res*, 1999;87:178-84.
64. Ricciardi R, Schaffer B, Kim R, Shah S et al. Protective effects of ischemic preconditioning on the cold-preserved liver are tyrosine kinase dependent. *Transplantation* 2001;72:406-12.
65. Peralta C, Bulbena O, Xaus C, Prats N et al. Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation*, 2002;73:1203-11.
66. Sindram D, Rüdiger H, Upadhyaya A, Strasberg S et al. Ischemic preconditioning protects against cold ischemic injury through an oxidative stress dependent mechanism. *Journal of Hepatology*, 2002;36:78-84.
67. Funaki H, Shimizu K, Harada S, Tsuyama H et al. Essential role for nuclear factor κ B in ischemic preconditioning for ischemia- reperfusion injury of the mouse liver. *Transplantation*, 2002;74:551-56.
68. Peralta C, Perales J, Bartrons R, Mitchell C. The combination of ischemic preconditioning and liver Bcl-2 overexpression is a suitable strategy to prevent liver and lung damage after hepatic ischemia-reperfusion. *Am J Pathol*, 2002;160:2111-22.
69. Loukogeorgakis S, Panagiotidou A, Broadhead M, Donald A et al. Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans. Role of the autonomic nervous system. *J Am Coll Cardiol*, 2005;46:450-6
70. Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res*, 2000;87:972-83.
71. Baxter G, Goma E, Yellon D. Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium. *Basic Res Cardio*, 1997;192:159-67.
72. Lochner A, Marais E, Genade S, Moolman J. Nitric oxide: a trigger for classic preconditioning? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000;279: H2752-65.
73. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner R et al. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*, 1993;87:893-99.
74. Kharbanda R, Mortensen U, White P, Kristiansen S et al. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation*, 2002;106:2881-3.
75. Küntscher M, Kastell T, Sauerbier M, Nobileling R et al. Acute remote ischemic preconditioning on a rat cremasteric muscle flap model. *Microsurgery*, 2002;22:221-6.

76. Harkin D,Barros D,McCallion K, Hoper M et al. Ischemic preconditioning before lower limb ischemia-reperfusion protects against acute lung injury. *Vasc Surg*, 2002;35:1264–73.
77. Kloner RA,Bolli R,Marban E et al. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation*, 1998;97:1848-67.
78. Kloner R,Rezkalla S. Preconditioning, postconditioning and their application to clinical cardiology. *Cardiovasc Res*, 2006;70:297-307.
79. Yellon M,Downey M. Preconditioning the myocardium: fromcellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev*, 2003;83:1113-51.
80. Kim J,Yu B, Roger J, Lee S et al. Exercise and diet modulate cardiac lipid peroxidation and antioxidant defenses. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996;20(1): 83-8
81. Martínez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* 1995;77(3):147-61.
82. Anfossi G,Russo I et all. N-acetyl L- cysteine exerts direct antiaggregating effect on human platelets. *Eur J Clin Investigation*, 2001;31:452-61
83. Darılmaz G, Topaloglu S, Topaloglu E, Ozel H ve ark. Evaluation of liver damage after application of TVE in the rat model. *Transplant Proc* 2005;37:4550–52
84. Şahin E,Olguner Ç,Bodur H,Koca U ve ark. Uzak ve doğrudan iskemik önkoşullamanın karaciğerin reperfüzyon hasarı üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 2009;29(2):381-7.
85. Küçükebe B. Ratlarda deneysel alt ekstremitte iskemi reperfüzyon modelinde dekstetomidinin akciğer hasarı üzerine etkileri. (Uzmanlık tezi). İzmir, DEÜTF Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD, 2010.
86. Oral K. Ratlarda direkt ve uzak iskemik ön koşullamanın renal iskemi reperfüzyon hasarı üzerine etkileri. (Uzmanlık Tezi). İzmir, DEÜTF Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD, 2010.
87. Clavien PA,Yadav S,Sindram D,Bentley R. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg* 2000;232:155–62.
88. Lai R, Chang K, Chen C, Tsai H. Transient limb ischemia induces remote preconditioning in liver among rats: The protective role of heme oxygenase-1. *Transplantation*, 2006;81: 1311-31.

89. Abu-Amara M, Yang S, Quaglia A, Rowley P et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in remote ischemic preconditioning of the mouse liver. *Liver Transpl* 2011;17(5):610-9
90. Hazar S. Egzersize bağlı iskelet ve kalp kas hasarı. *Beden Eğitimi ve Spor Bilimleri Dergisi Spormetre*, 2004, II (3) 119-126.
91. Menzel C, Pfeifer R, Darwiche S, Kobbe P. Models of lower extremity damage in mice: time course of organ damage and immune response. *J Surg Res*, 2011;166(2):149-56.
92. Kim H, Lee Y, Kim C. Biomarkers of muscle and cartilage damage and inflammation during a 200 km run. *Eur J Appl Physiol*, 2007;99(4):443-7.
93. Bolter C, Critz J. Plasma enzyme activities in rats with diet-induced alterations in liver enzyme activities. *Experientia*, 1974;30(11):1241-3.