

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ  
ANABİLİM DALI

**DENEYSEL HEPATİK İSKEMİ REPERFÜZYON  
HASARININ ÖNLENMESİNDE  
İSKEMİK SONKOŞULLAMA  
VE ETKİNLİĞİ**

DR. BAKİ AYDOĞAN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2006

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ  
ANABİLİM DALI

**DENEYSEL HEPATİK İSKEMİ REPERFÜZYON  
HASARININ ÖNLENMESİNDE  
İSKEMİK SONKOŞULLAMA  
VE ETKİNLİĞİ**

UZMANLIK TEZİ

DR.BAKİ AYDOĞAN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Sedat Karademir

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimi aldığım Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndaengin bilgi ve deneyimleri ile eğitimime katkıda bulunan başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. İbrahim Astarçioğlu olmak üzere saygıdeğer hocalarım Prof.Dr. Ömer Harmancıoğlu, Prof.Dr. Mehmet Füzün, Prof.Dr. Hüseyin Gülay, Prof.Dr. Seymen Bora, Prof.Dr. Serdar Saydam, Prof.Dr. Cem Terzi Prof.Dr. Sedat Karademir, Prof.Dr. Selman Sökmen, Doç.Dr. Mehmet Ali Koçdor ve Doç.Dr. Hüseyin Astarçioğlu 'na;

Cerrahi el becerimin gelişmesinde başrol oynayan değerli uzman arkadaşlarım Uzm. Dr. Koray Atila, Uzm. Dr. Tarkan Ünek, Uzm.Dr. Ali İbrahim Sevinç, Uzm. Dr Ahmet Önal ve Uzm. Dr. Mehmet Köşkderelioğlu'na;

Tezimin hazırlanmasında, öncelikle, her aşamada rehberlik eden ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Sedat Karademir'e, biyokimyasal analizler için çaba gösteren Doç. Dr. Pınar Tuncel'e, patolojik değerlendirmeler için emek sarfeden Prof. Dr. Özgül Sağol'a ve Uzm. Dr. Mehtat Ünlü'ye;

Zor bir sanat olan cerrahi mesleğini birlikte öğrendiğim, stresi ve heyecanı birlikte paylaştığım asistan, hemşire ve personel arkadaşlarıma;

Gerek uzmanlık eğitim süresince gerekse bu sürecin son aşaması olan tezin hazırlanmasında her an yanımda olan, özveri ve sabırla hep destek olan eşim Dr. Öznur Aydoğan'a ve aileme;

Sonsuz teşekkürler

Dr. Baki Aydoğan

Mayıs 2006

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	1
<b>SHORT HEAD AND SUMMARY</b>	2
<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b>	3
<b>GENEL BİLGİLER</b>	4
İskemi	4
Reperfüzyon	4
İskemi Reperfüzyon Hasarı	5
Hepatik İskemi Reperfüzyon Hasarı	6
İskemik Önkoşullama	8
<i>Önkoşullama Mekanizmaları</i>	9
Hepatik İskemik Önkoşullama	11
İskemik Sonkoşullama	16
<i>Sonkoşullama Mekanizmaları</i>	16
Hepatik İskemik Sonkoşullama	18
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	19
Deney Hayvanları ve Cerrahi İşlem	19
Deney Grupları ve Protokol	20
Biyokimyasal ve Patolojik Değerlendirme	22
<i>Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü</i>	22
<i>Karaciğer Dokusunda MDA Ölçümü</i>	22
<i>Karaciğer Hücre Histolojisinin Değerlendirilmesi</i>	22
<i>İmmünohistokimyasal Boyama ve Değerlendirme</i>	24
İstatistiksel Analiz	25
<b>BULGULAR</b>	26
<b>TARTIŞMA</b>	29
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	31
<b>KAYNAKLAR</b>	32

## **TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ**

Tablo 1: Önkoşullama ve sonkoşullamadaki tetikleyiciler, medyatörler ve efektörler	17
Tablo 2: Erken dönemde serum karaciğer enzim ve T.bilirubin düzeyleri	27
Tablo 3: Erken dönemde karaciğer dokusunda MDA düzeyleri	27
Tablo 4: Erken dönemde karaciğer parankim hücre hasarı değerlendirilmesi	27
Tablo 5: Geç dönemde serum karaciğer enzim ve T.bilirubin düzeyleri	28
Tablo 6: Geç dönemde karaciğer dokusunda MDA düzeyleri	28
Tablo 7: Geç dönemde karaciğer parankim hücre hasarı değerlendirilmesi	28
Tablo 8: Geç dönemde rejenerasyonun değerlendirilmesi	28
Şekil 1: Önkoşullamanın kalpte erken ve geç dönem koruma oluşturan ana yolları	11
Şekil 2: İskemik önkoşullamanın erken ve geç dönem korumasında hücre içi ileti yolları	15
Şekil 3: Sonkoşullamanın kardiyak korumada görev alan hücreiçi ileti yolları ve etkileri	18
Şekil 4: Deney gruplarında uygulanan iskemi reperfüzyon periyodları	20
Resim 1: Sıçan karaciğerinde hepatik pedikül diseksiyonu	21
Resim 2: Hepatik pedikülün klempe edilerek parsiyel hepatik iskemi oluşturulması	21
Resim 3: Klempin alınarak karaciğer reperfüzyonunun sağlanması	21
Resim 4: Normal karaciğer parankimi (Hematoksilen Eosin Boyama) X40 büyütme	23
Resim 5: Hafif karaciğer parankim hasarı (Hematoksilen Eosin Boyama) X40 büyütme	23
Resim 6: Orta karaciğer parankim hasarı (Hematoksilen Eosin Boyama) X40 büyütme	23
Resim 7: Şiddetli karaciğer parankim hasarı (Hematoksilen Eosin Boyama) X40 büyütme	23
Resim 8: İmmünohistokimyasal (PCNA) boyama	24

## KISALTMALAR

ADP	Adenozin difosfat
ALT	Alanin aminotransferaz
AMP	Adenozin monofosfat
AST	Aspartat aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
Ca <sup>+2</sup>	Kalsiyum iyonu
CCPA	2-kloro-N(6)-siklopentil-adenozin
eNOS	Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
ERK	“Ekstracellüler signal regulated kinase”
I/R	İskemi reperfüzyon
ICAM	Hücre İçi Adezyon Molekülü
iNOS	İndüklenebilen nitrik oksit sentaz
JNK	jun N-terminal kinaz
K <sup>+</sup>	Potasyum iyonu
LDH	Laktatdehidrogenaz
MAP	Mitojenle Aktive Protein
MDA	Malondialdehid
MLA	monofosforil lipid A
mPTP	Mitokondrial permeabilite geçiş porları
Na <sup>+</sup>	Sodyum iyonu
NFκB	Nükleer Faktör κB
NO	Nitrik Oksit
O <sup>2</sup>	Oksijen
ONOO-	Peroksinitrit
PAF	Trombosit Aktive edici Faktör
PCNA	Prolifere Hücre Nükleer Antijeni
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	Protein Kinaz-c
Postcon	İskemik Sonkoşullama
Precon	İskemik Önkoşullama
RISK	Reperfusion injury salvage kinase
ROS	Reaktif Oksijen Radikalleri
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü-α
VCAM	Vasküler Adezyon Molekülü

## ÖZET

### **Deneysel Hepatik İskemi Reperfüzyon Hasarının Önlenmesinde İskemik Sonkoşullama ve Etkinliği**

Dr. Baki AYDOĞAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İnciraltı - İZMİR

Major karaciğer cerrahisinde hepatik pedikül klempajı (Pringle manevrası) iskemi ve reperfüzyon (I/R) hasarı ile sonuçlanmaktadır. Bu hasarın önlenmesinde, uzun iskemi öncesinde bir veya birkaç kez uygulanan kısa süreli iskemi ve reperfüzyon periyodları olarak tanımlanan “iskemik önkoşullama” bugün klinikte de uygulama şansı bulmuş etkin bir yöntemdir. İskemi reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik son zamanlarda tarif edilen diğer bir yöntem, “iskemik sonkoşullama”dır. Uzun iskemiye takip eden reperfüzyonun erken döneminde uygulanan kısa süreli iskemi ve reperfüzyon periyodları olarak tanımlanır.

Amacımız, iskemik sonkoşullamanın tek başına ve iskemik önkoşullama ile birlikte uygulandığında hepatik iskemi reperfüzyon hasarını azaltmadaki etkinliğini araştırmaktır.

Dört sıçandan oluşan sham grubu ve 14'er sıçandan oluşan iskemi reperfüzyon grubu, iskemik önkoşullama grubu, iskemik sonkoşullama grubu ve iskemik ön+sonkoşullama grubu oluşturuldu. Sham grubuna sadece hepatik pedikül diseksiyonu uygulandı. İskemi reperfüzyon 60 dakika parsiyel hepatik iskemi sonrası 120 dakika reperfüzyon şeklinde, önkoşullama 60 dakikalık iskemi öncesi 10 dakika iskemi, 10 dakika reperfüzyon şeklinde, sonkoşullama ise 60 dakikalık iskemi sonrası iki dakikalık iskemi periyodları arasında sırayla 2,3,5 ve 7 dakikalık reperfüzyon periyodları şeklinde sağlandı. Gruptaki sıçanların yarısı reperfüzyonun hemen sonrasında erken dönemdeki etkilenmeyi değerlendirmek amacıyla sakrifiye edilirken kalan yarısı da geç dönemdeki etkilenmeyi değerlendirmek amacıyla yedi gün sonra sakrifiye edildi. Serum karaciğer enzimleri, karaciğer dokusunda malondialdehit ve doku örnekleri histopatolojik olarak incelendi.

Çalışmamızda literatürden farklı olarak iskemik sonkoşullama uygulanan grupta iskemi reperfüzyon hasarının öngörüldüğü gibi azalmadığını, aksine arttığını gözledik. Bu hasar artışının, iskemi reperfüzyon hasarını azaltmada altın standart olarak ifade edilen iskemik önkoşullama ile gerilediğini gözledik.

## **SHORT HEAD AND SUMMARY**

### **The Effects of Ischemic Postconditioning on a Rat Model of Hepatic Ischemia and Reperfusion Injury**

Baki AYDOĞAN, MD.

Dokuz Eylul University Department of Surgery, Inciraltı, Izmir - TURKEY

Hepatic pedicle clamping (Pringle maneuver) in major liver surgery results in ischemia and reperfusion (I/R) injury. The method of ischemic preconditioning, which is composed of short periods of ischemia and reperfusion, may be used several times to prevent I/R injury. Recently, to prevent I/R injury, another method, ischemic postconditioning, is proposed, which is the application of short periods of I/R during reperfusion after a period of long-lasting ischemia.

The aim of this study is to evaluate the effects of ischemic preconditioning and postconditioning on preventing hepatic ischemia and reperfusion injury.

The study was designed in five groups: Group 1 (n=4), sham rats; Group 2 (n=14), hepatic ischemia and reperfusion; Group 3 (n=14), ischemic preconditioning and hepatic ischemia group; Group 4 (n=14), hepatic ischemia and ischemic postconditioning group; Group 5 (n=14), ischemic preconditioning, hepatic ischemia and ischemic postconditioning group.

Ischemia and reperfusion was performed by 60 minutes hepatic ischemia following 120 minutes reperfusion; ischemic preconditioning was performed by 10 minutes ischemia and 10 minutes reperfusion before 60 minutes hepatic ischemia; and ischemic postconditioning was performed by 60 minutes hepatic ischemia followed by 2 minutes ischemia periods and between these periods in increasing duration of reperfusion (2, 3, 5 and 7 minutes) periods.

The protective effects on I/R injury were assessed in 2<sup>nd</sup> hour and 7<sup>th</sup> day of hepatic ischemia, and serum liver enzymes, liver tissue malondialdehyde and histopathological analysis were carried out.

In our study, we observed that ischemic postconditioning does not protect hepatic I/R injury; moreover, we observed an increase in I/R injury with ischemic postconditioning. The effect of ischemic preconditioning on hepatic I/R injury is superior to the effects of both ischemic preconditioning and postconditioning.



## GİRİŞ VE AMAC

İskemi reperfüzyon, doku veya organa giden kan akımında bir süre azalma yada kesilme ve sonrasında yeniden kanlanma olarak tanımlanmaktadır. Karaciğer ile ilgili cerrahi girişimler (travma sırasında ve tümör nedeni ile yapılan karaciğer rezeksiyonlarında kanama kontrolü amacı ile geçici olarak yapılan Pringle manevrası veya total vasküler klempaj ) ve karaciğer transplantasyonu (rezeksiyon sonrası reanastomoz yapılanaya kadar geçen soğuk iskemi süresi) gibi bir çok durumda geçici olarak kan akımının durması ile iskemi, kan dolaşımının tekrar sağlanması ile de reperfüzyon oluşmaktadır. Reperfüzyonun gerçekleştirilmesi, iskemik dokularda, iskeminin dokuda oluşturduğu hasardan daha fazla bir hasara yol açabilmektedir. Bu olay iskemi reperfüzyon hasarı olarak bilinir.

İskemi reperfüzyon hasarından dokuyu korumanın çeşitli yöntemleri tarif edilmiştir. Bunlardan ilki, ilk kez 1986 yılında Murry ve arkadaşları tarafından kalpte tarif edilen iskemik önkoşullama. İskemik önkoşullama, uzun süreli iskemi öncesi uygulanan kısa süreli iskemi reperfüzyon periyodları olarak tarif edilir. Amaç, iskemi reperfüzyon hasarına karşı endojen korunma mekanizmalarının harekete geçirildiği topyekün bir korunma refleksinin başlatılmasıdır. İskemi reperfüzyon hasarına karşı güçlü bir endojen korunma oluşturur. İkincisi ise ilk kez 2002 yılında Zhao ve arkadaşları tarafından yine kalpte tarif edilen iskemik sonkoşullama. İskemik sonkoşullama, uzamış iskemi sonrasındaki reperfüzyonun erken dönemlerinde uygulanan kısa süreli iskemi ve reperfüzyon periyodları olarak tarif edilir. İskemik önkoşullama hem iskemi hem de reperfüzyon hasarına karşı koruma sağlarken, iskemik sonkoşullama direkt olarak reperfüzyon hasarına karşı koruma sağlar. Bu iki yöntemin iskemi reperfüzyon hasarındaki koruyucu etkileri karaciğerde de gösterilmiştir. Bulardan iskemik önkoşullama klinik uygulamaya geçmiştir. Her iki yöntemin birlikte uygulandığı durum ise sadece kalpte çalışılmıştır. Çok yeni uygulanan bu durumda iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruma, ayrı ayrı uygulamalara eşdeğer bir koruma sağlanmıştır. Her iki yöntemin birlikte uygulanması karaciğer modelinde çalışılmamıştır. Üstelik iskemik sonkoşullamanın hepatik iskemi reperfüzyon hasarına etkisi ise sadece birkaç çalışmada gösterilmiştir.

Amacımız hem iskemik sonkoşullamanın tek başına, hemde iskemik önkoşullama ile birlikte uygulandığında hepatik iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisini araştırmaktır.

## **GENEL BİLGİLER**

### **İskemi**

İskemi organların kanlanamaması yani oksijen ve besin maddelerinin dokulara yeterince ulaşamaması demektir. İskemi, organı perfüze eden kan akımındaki yetersizliğe bağlı olarak gelişen geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre zedelenmesine yol açar(8). İskemi sonrasında hücrelerde pek çok metabolik ve yapısal değişiklikler oluşmaktadır. İskemi süresince dokunun oksijensiz kalışı ile oksidatif fosforilasyon ve mitokondriyal fonksiyonlar bozulur. Enerji kaynağı olan adenozin trifosfat (ATP) tüketilir. Enerji eksikliği ile ATP' ye bağımlı iyonik pompa fonksiyonları bozulur. H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> ve Ca<sup>+2</sup> gibi iyonların hücre içi ve dışı dengeleri bozulur. Hücre hacminin ve bütünlüğünün korunması giderek zorlaşır. İskemi sırasında adenin nükleotidinin yıkımı da artar. Bu durum ise reaktif oksijen radikallerinin (ROS) prekürsörü hipoksantin'in hücre içi birikimini artırır (9,10,11,12). İskemi aynı zamanda endotel hücrelerinde bazı proinflamatuvar gen ürünlerinin (lökosit adezyon molekülü, sitokinler vb) ve biyoaktif bileşiklerin (endotelin, tromboksan A2 vb) sentezini artırırken, bazı koruyucu gen ürünlerinin (yapısal nitrik oksit sentaz (eNOS), siklooksijenaz-2 (COX-2) ve bu enzimlerin ürünlerinin (nitrik oksit (NO), prostasiklin)) ekspresyon ve sentezini baskılar (13,14).

### **Reperfüzyon**

Geri dönüşümsüz hücre hasarını önleyebilmek için yeniden kan akımının sağlanması gerekmektedir. Ancak iskemik dokunun tekrar kanlanması olarak adlandırılan reperfüzyonun gerçekleştirilmesi, iskemik dokularda, iskeminin dokuda oluşturduğu hasardan daha fazla bir hasara yol açabilmektedir (15).Reperfüzyonla birlikte ortam oksijenlenirken, hızla artan reaktif oksijen radikalleri hücredeki oksidatif stresi artırır (16). Başta makrofajlar olmak üzere dolaşım ve parankimdeki diğer inflamatuvar hücrelerden reaktif oksijen radikallerinin yanı sıra TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12 ve CXC kemokinler gibi proinflamatuvar sitokinler de ortama salınır (17). Sitokinlerin de etkisi ile vasküler yatağı döşeyen endotel hücrelerinde adezyon moleküllerinin ( ICAM-1, VCAM-1 ve E-selektin) ekspresyonu ve buna koşut olarak nötrofillerin endotel yüzeyine karşı olan ilgisi de artar. Endotele yapışan nötrofiller daha sonra hücre aralıklarından parankime doğru ilerleyerek fagositoz ve lizozomal enzimlerin de yardımı ile hasarın ilerlemesine yardımcı olurlar (17). Reperfüzyon hasarı lokal olduğu kadar,

sitokinler yoluyla uzak organlarda da inflamatuvar yanıtı indükleyerek organ yetmezliklerine neden olabilirler (17). Son yıllarda T lenfositlerin de iskemi reperfüzyon hasarında rol aldığı ve T hücre aktivitesinin engellenmesi ile (örn. kalsinürin inhibitörleri) iskemiye takip eden parankim hasarının azaltılabildiği gösterilmiştir (18). Ayrıca stres ile aktive olan protein kinazlardan c-jun N-terminal kinaz-1 (JNK-1), iskemi ve reperfüzyon sırasında transkripsiyon faktörlerini etkileyerek değişik proinflamatuvar sitokinlerin indüklenmesine ve hücrede apoptozun başlamasına neden olabilmektedir (19).

Karaciğer ile ilgili cerrahi girişimler (travma sırasında kanama kontrolü amacıyla geçici olarak yapılan Pringle manevrası veya total vasküler eksklüzyon, tümör nedeni ile yapılan karaciğer rezeksiyonlarında uygulanan geçici vasküler klempler) ve karaciğer transplantasyonu (rezeksiyon sonrası reanastomoz yapılan kadar geçen soğuk iskemi süresi) gibi bir çok durumda geçici olarak kan akımının durması ile iskemi, kan dolaşımının tekrar sağlanması ile de reperfüzyon oluşmaktadır. Ameliyat esnasında kan kayıplarını ve ameliyat sonrası komplikasyonları azaltmada karaciğerdeki farklı damarlara ait kan dolaşımının geçici olarak engellenmesi gerekebilmektedir (20,21). Kan akımının geri dönmesi karaciğer fonksiyonlarında hafif bozulmadan organ yetmezliğine kadar değişen aralıkta reperfüzyon hasarına yol açar.

### **İskemi Reperfüzyon Hasarı**

İskemi reperfüzyon hasarı kompleks, multifaktöriyel bir patofizyolojik mekanizma sonucu ortaya çıkmaktadır. Doku hasarı hem iskemi hem de reperfüzyon döneminde oluşmaktadır. İskemi ile ortaya çıkan enerji yetmezliği; oksidatif stresin artmasına, lokal ve sistemik bir inflamatuvar yanıtın tetiklenmesine neden olmaktadır. İskemi ve reperfüzyon, hücreler ve dokularda iskeminin süresine bağlı olarak önemli görevsel bozukluklara yol açabilmektedir (22). Dokuya gelen kan akımı kesildiğinde hücresel fonksiyon bozuklukları, hücresel ve intersitisyel ödem ve son olarak da hücrenin ölümüyle karakterize bir dizi kimyasal olay tetiklenmektedir (23). Reperfüzyon ile enerji ihtiyacı tekrar sağlanmakta ve toksik metabolitler bölgeden uzaklaştırılmaktadır. Bununla birlikte bu toksik metabolitlerin tekrar genel dolaşıma karışması metabolik asidoz, hiperkalemi, myoglobinemi gibi ciddi problemlere neden olmakta ve bölgesel doku hasarının daha da şiddetlenmesine yol açabilmektedir (24,25).

İskemi reperfüzyon hasarının hipotermik koşullarda (+4°C) normotermik koşullara göre daha az oluştuğu bilinmektedir (26). Hipotermi, doku/organ metabolik hızını düşürmekte ve enerji ihtiyacını azaltmaktadır. Klinikte deneysel bulgular eşliğinde, transplantasyon için seçilen karaciğerlerin alıcıya implante edilene kadar geçen süre içerisinde hipotermik bir solüsyon içerisinde bekletilmesi rutin olarak uygulanmaktadır. Hipotermi, transplantasyonda karaciğer saklanması için gerekli olmakla birlikte reperfüzyon sırasında ortaya çıkan ve organ için zararlı olayların devam etmesini ise engelleyememektedir. Sıcak ve soğuk iskeminin karaciğerde hasar oluşturma mekanizmaları ve hedefleri farklılık gösterir. Soğuk iskemiye duyarlı olan sinüzoidal endotel hücreleri, reperfüzyonla birlikte endotel duvarından ayrılarak lökosit ve trombositlerin sinerjistik saldırısı altında apoptoza giderken mikrosirkülasyonun da bozulmasına neden olurlar (27). Soğuk iskeminin aksine, sıcak iskemi daha zor tolere edilebilmekte ve hızla ilerleyen hepatosit nekrozuna neden olmaktadır (28,29).

### **Hepatik İskemi Reperfüzyon Hasarı**

Hepatik iskemi reperfüzyon hasarında bifazik bir gidiş söz konusudur. Hasarın erken dönemlerinde endotelin kaynaklı bir vazokonstriksiyon ortaya çıkarken daha sonra NO kaynaklı bir vazodilatasyon gelişmektedir. Reperfüzyonun erken safhasında endotel hücre şişmesi, vazokonstriksiyon, sinüzoidler içinde trombosit agregasyonu gelişmekte ve hepatik mikrosirkülasyon bozulmaktadır. Endotelial ve Kupffer hücre şişmesi; hücreler arası ödem sonucu, vazokonstriksiyon ise NO ve endotelin arasındaki balansın bozulması sonucu ortaya çıkmaktadır. Sinüzoidal lümeninde oluşan daralma lökosit akımındaki azalmaya, lökosit endotelial yapışmanın artmasına ve lökostaza yol açmaktadır. Yapışkan lökositler sinüzoidal akımı bozmaktadır. Sonrasında hipoksi artmakta, Kupffer hücreleri ve nötrofil aktivasyonu oluşmakta, sitokin ve serbest oksijen radikalleri (SOR) açığa çıkmakta, hepatik hasar daha da artmaktadır. NO ile SOR arasındaki reaksiyon çok zararlı peroksinitrit (ONOO-) anyonlarının oluşmasına, lipid peroksidasyonunda artışa, hücrel harabiyet ve apoptozise yol açmaktadır. Reperfüzyonun erken döneminde kan ve dokuda endotelin konsantrasyonu artmakta ve karaciğer kan akımı azalmaktadır. Erken dönemde NADPH seviyesinin düşüklüğüne ve fazla miktarda arjinaz salınımına bağlı NO düzeyleri düşük seyretmektedir. Bu mekanizmada rol alan mediyatörlerin arasındaki ilişki bu mediyatörlerin transkripsiyonel regülasyonu

aşamasında olmaktadır. iNOS'ın aktivitesi endotoksin ve sitokinler tarafından düzenlenmektedir. Bu sitokinlerin bazıları tek başlarına ya da birlikte enzimi uyarmaktadır.

iNOS, sitokinler (TNF- $\alpha$ ), kemokinler (epitelyal nötrofil aktive edici protein) ve adezyon molekülleri (ICAM-1) kısmen NF- $\kappa$ B ile kontrol edilmektedir. Karaciğerde NF- $\kappa$ B aktivasyonu proinflamatuvar sitokinler ve adezyon moleküllerinin sentezini artırmaktadır. Karaciğerde iskemi-reperfüzyon hasarı olduğu zaman p50/p65 heterodimer ve p50 homodimer NF- $\kappa$ B kompleksi 1 saat içinde hızlı bir şekilde aktive olmakta, 3 saat sonunda düzeyi yükselmekte ve reperfüzyonun 5. saatinin sonunda azalmaktadır. Aynı zamanda iNOS mRNA ekspresyonu reperfüzyondan sonraki 1 saatte aktive olmakta ve 5. saatin sonuna kadar artış göstermektedir. Hepatik iskemi reperfüzyon hasarında güncel görüş olarak oksidatif stres sonucu NF- $\kappa$ B aktive olmakta bunun sonucu olarak iNOS gen aktivasyonu oluşmaktadır. Hepatik iskemi reperfüzyon hasarında gelişen LPS endotoksemisinin yaptığı önemli bir etkide, hücrel bir mediyatör ve transkripsiyon faktörü olan NF- $\kappa$ B aktivasyonuna yol açmasıdır. NF- $\kappa$ B başta LPS olmak üzere bazı inflamatuvar sitokinler, serbest oksijen radikalleri ve virüsler tarafından aktive olabilmektedir. Hepatik iskemi reperfüzyon hasarında LPS stimülasyonuna bağlı artan TNF- $\alpha$  ekspresyonu, serbest oksijen radikalleri, PAF; bir transkripsiyon faktörü olan NF- $\kappa$ B ve iNOS için aktive edici bir uyarıdır. TNF- $\alpha$ 'nın tüm hücrelerde ve immünoisitlerde yüzeyde bağlanabileceği 15'e yakın hücre membran reseptörleri vardır. Bu reseptörlere bağlanıp aktive olunca spesifik hücrel cevap oluşmakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir. TNF- $\alpha$ 'nın esas olarak 2 tane spesifik transmembran reseptörü bulunmaktadır. TNF-rI ve TNF-rII. TNF-rI apoptozisi, sitotoksisiteyi, adhezyon molekül ekspresyonunu ve NF- $\kappa$ B aktivasyonunu sağlamaktadır. Bir çok hücrede NF- $\kappa$ B hücre sitoplazmasında inhibitör alt ünitesi olan I $\kappa$ B şeklinde bulunmakta bu şekilde NF- $\kappa$ B'nin hücre nükleusuna geçişini ve gen ekspresyonu yapmasını önlemektedir. Bazı stimuluslar özellikle LPS; I $\kappa$ B nin fosforilasyonuna ve degradasyonuna yol açmakta böylece NF- $\kappa$ B hücre nükleusuna geçerek gen ekspresyonunu başlatmaktadır.

İskemi ve buna paralel olarak gelişen reperfüzyon hasarının karaciğerde, hücrel düzeyde ne ölçüde etki yaptığının en iyi göstergeleri serum aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrojenaz (LDH) gibi enzim aktiviteleri ve histopatolojik değişimlerdir. İskemi reperfüzyon hasarı, hastalarda ve deney hayvanlarında oldukça karmaşık mekanizmalarla sistemik ve hemodinamik bozukluklara yol açmaktadır.

Bugüne kadar farklı cerrahi, farmakolojik ve genetik metodlar kullanarak iskemi ve reperfüzyon hasarına karşı organların korunmasını amaçlayan yüzlerce deneysel çalışma planlanmıştır. Deneysel ortamda başarılı gibi görünen çalışmaların çok azı klinikte uygulanma şansı bulmuştur. Bunda iskemi reperfüzyon hasarının tek bir basamak veya mediatörün bloke edilmesi ile önlenemeyecek kadar karmaşık olmasının rolü büyüktür. Bu türden bir yaklaşımın karşısında organizma kendisine kolaylıkla yan yollar yaratmakta ve reperfüzyonla gelen oksidatif yüklenmenin yanısıra proinflamatuvarsitokinlerin ve kan hücrelerinin aktivasyonu ile giderek büyüyen iskemi reperfüzyon dizinini durdurma çabaları başarısız kalmaktadır.

### **İskemik Önkoşullama**

İskemik önkoşullama hücre veya dokuların iskemi ve reperfüzyona kısa süreli maruz kalması ve sonrasında daha uzun süreli iskemi ile oluşan doku hasarında belirgin olarak azalma oluşturan bir fenomendir(30). İskemik önkoşullama ilk kez 1986 yılında Murry ve arkadaşları tarafından köpek miyokardında gösterilmiştir. Araştırmacılar, köpek miyokardında daha geniş bir infarkt alanı oluşturmayı hedeflemişler ancak bu amaçla uzun süreli iskemi öncesi ekledikleri birkaç kısa iskemi ve reperfüzyon epizotunun, infarktı genişletmediği, aksine % 75 geriletliğini gözlemlemişlerdir(30). İskemik önkoşullama, deneysel ve takip eden klinik çalışmalarda iskemi reperfüzyon hasarına karşı doku direncini artırdığı gösterilmiş az sayıdaki yöntemlerden biridir. Önkoşullamadaki biyolojik kural, yaklaşan bir tehlikeye karşı hücre savunma mekanizmalarının doğal bir akış içinde, önceden ve topyekün harekete geçirilmesidir(31,32). Bu da asıl tehditte önce, tehdit unsuruna benzer veya ondan farklı bir örnek stresin uygulanması ile sağlanmaktadır. Bu örnek stres, hücredeki mekanizmaları tetikleyecek ancak yaralamayacak kadar olmalıdır. Tek bir hücreden, geniş canlı topluluklarına kadar doğada milyonlarca yıldır uygulanmakta olan bu adaptasyon mekanizması, canlı türlerinin dünyadaki varlıklarını sürdürme yada sürdürememe nedenlerinden de biri olmuştur.

Miyokardiyal iskemik önkoşullamanın gösterilmesinden sonra yapılan çalışmalar bu fenomenin beyin, spinal kord, iskelet kası ve karaciğer gibi organlarda da oluşabileceğini bildirmektedir (33-36). İskemik önkoşullamayı indükleyebilmek için gereken iskemik tekrarlar türe ve organ sistemine özgüllük göstermektedir(37). Sıçan, tavşan, köpek ve insan

kalbi için literatürde iskemik önkoşullama oluşturan farklı sayıda iskemik tekrar protokolleri bulunmaktadır (30,38,39). İskemik önkoşullamanın erken döneminde oluşan koruyucu etkinin süresi de türe özgü olarak değişiklik göstermektedir. Kalpteki bu koruyucu etki tavşanda 30 dakikalık reperfüzyondan sonra sonlanırken(40) bu sürenin sıçanda bir saat(41), köpekte ise iki saat olduğu bildirilmiştir(42). İskemik önkoşullamanın geç dönemdeki koruyucu etkisinin ortaya çıkması için gereken zamanın da türler arasında farklılık gösterdiği düşünülmektedir(43,44). Genel olarak erken dönemdeki koruma, önkoşullamanın indüklenmesinden itibaren 3 saatlik bir koruma dönemini takiben 12-24 saatlik korumasız bir dönem şeklinde tanımlanırken geç dönem korumanın ise, önkoşullamanın indüklenmesinden 12-24 saat sonra başlayıp 3-4 gün sonra sona erdiği bildirilmektedir(45).

### *Önkoşullama Mekanizmaları*

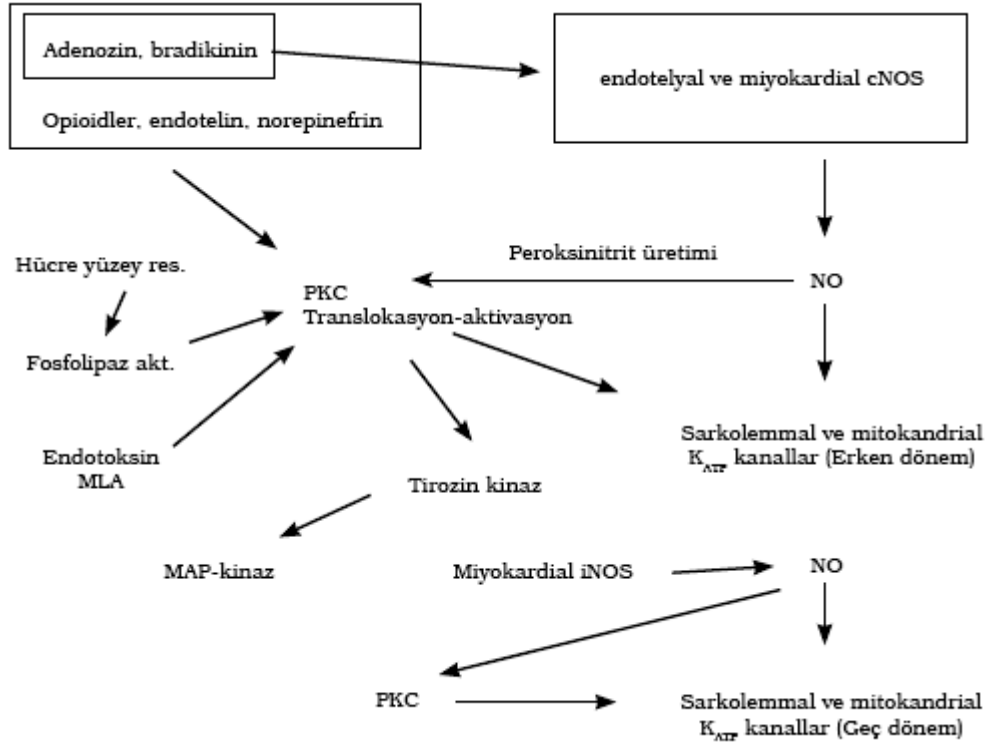
İskemik önkoşullamanın deneysel olarak gösterilmesini takiben mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. İskemik önkoşullamada temel miyokardial koruma yollarından birinin artmış adenosin üretimi ile beraber A1 reseptörlerinin aktivasyonu olduğu gösterilmiştir(46-48). Tavşan kalbinde tekrarlanan dozlarda (100 µg.kg-1) spesifik A1 agonisti 2-kloro-N(6)-siklopentil-adenozin (CCPA) ile önkoşullama oluşturulan bir çalışmada iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan infarkt alanında %42' lik bir azalma olduğu bildirilmiştir(49). Kalpte önkoşullama fenomeninin oluşumu sırasında rol aldığı düşünülen mediyatörler Şekil 1' de gösterilmiştir. Kalpte, iskemi sırasında endojen •NO üretiminin arttığı bilinmektedir(50). •NO'nun kalbi reperfüzyon hasarından koruduğu(51-53) ya da iskemik önkoşullamanın geç fazında infarktüs veya sersemleme'ye (stunning) karşı korumada önemli rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır(54-56). •NO'nun iskemik önkoşullamada miyokardın korunmasında önemli bir rol oynayabileceği deneysel olarak sentezinin engellenmesi yoluyla da araştırılmıştır. İskemik önkoşullamanın köpek kalbinde oluşturduğu antiaritmik etkisinin •NO sentaz (NOS) enzim inhibitörü NG-nitro-L-arjinin-metil esteri (L-NAME) uygulaması ile azaldığı gösterilmiştir(57). Artmış adenosin ve •NO üretimi, miyokardial korumada önemli role sahip protein kinaz C (PKC) translokasyon ve aktivasyonuna da neden olmaktadır(47,58-60). PKC ve •NO'nun ATP'ye bağımlı K<sup>+</sup> kanallarını (K<sub>ATP</sub>) aktive ettiği gösterilmiştir (61-63). Bu kanallar sarkolemmal ve mitokondrial olmak üzere iki tiptir(64). İskemi veya sonrasında sarkolemmal K<sub>ATP</sub> 'lerin aktivasyonunun kalp kasında aksiyon potansiyeli süresinde kısalma ile birlikte hücre içine Ca<sup>+2</sup> girişinde ve intraselüler Ca<sup>+2</sup> aşırı yüklenmesinde azalmaya neden olduğu

bildirilmiştir(63). Ancak kalpteki koruyucu fonksiyonun genel olarak mitokondrideki  $Ca^{+2}$  aşırı yüklenmesini önleyen mitokondriyal  $K_{ATP}$  kanalları üzerinden olduğu görüşü ağırlık kazanmaktadır(63,66-68). Bu kanalların aktivasyonu ile gelişen koruyucu mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır(69,70). PKC'nin aynı zamanda tirozin kinaz, mitojenle aktive olan kinazlar (MAP- kinazlar) ve indüklenebilen NO sentaz (iNOS) yolları üzerinden de sarkolemmal ve mitokondriyal  $K_{ATP}$  kanallarının geç dönemde açılmasına neden olduğu da öne sürülmüştür(71). Kalpte serbest oksijen radikallerinin erken ve geç dönem önkoşullamadaki koruyucu rolleri de araştırılmıştır.

İzole sıçan miyositlerinde 2 kez 5' er dakikalık anoksi ve reperfüzyon ile oluşturulan önkoşullamanın  $O_2$  - üretiminde ani bir artışa yol açtığı daha sonrada erken ve geç dönem korumanın olduğu gösterilmiştir (72). Kısa süreli miyokardial iskemiye yanıt olarak bradikinin salınmasında artış olduğu bildirilmiştir (73-75). Bradikinin'in endotel hücreleri üzerindeki B2 reseptörler aracılığı ile iskemi reperfüzyon ile oluşan aritmilere karşı koruyucu etki oluşturduğu düşünülmektedir.(76) Ancak bu korumanın B1 reseptörü aracılığıyla olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (77).

İzole sıçan kalbinde endotelin-1'in PKC ve  $K_{ATP}$  kanal aktivasyonu ile enfarktüs alanında azalma oluşturduğu bildirilmiştir(78). Sıçan ve tavşan kalbinde ufak dozda lipopolisakkarit, endotoksin, monofosforil lipid A (MLA) ön-muamelesi ile erken ve geç dönem koruma sağlandığı bildirilmiştir(79-82). Tavşan ve sıçan iskemi modellerinde ise hiperterminin iskemi reperfüzyon hasarına karşı 24 saat sonra geç dönem miyokardial koruma sağladığı gösterilmiştir (83,84).





Şekil 1: Önkoşullamanın kalpte erken ve geç dönem koruma oluşturan ana yolları

## Hepatik İskemik Önkoşullama

Majör hepatik cerrahi, travma, şok ve transplantasyon esnasında karaciğerde oluşan soğuk veya sıcak iskemi reperfüzyon hasarı ciddi morbidite ve mortalite nedeni olmaktadır. Karaciğerin uzun iskemiye olan duyarlılığı parankim kalitesi ve rezervine göre farklılıklar gösterebilmektedir. Bu nedenle, karaciğerin sikemi reperfüzyon hasarından korunmasını sağlamak için farmakolojik ajanların yanında cerrahi teknikler de denenmiştir. Rutin klinik uygulamalarda karaciğerin kansızlaştırılması Pringle manevrası ile kolaylıkla sağlanabilmektedir. Bu işlem, hepatoduodenal pedikül etrafının dönülerek karaciğere giren portal ve arteriyel kanın total oklüzyonudur (total klempaj). Ayrıca, karaciğerin segmenter anatomisi nedeni ile iskemiye, total yerine karaciğerin bir yarısında yada, daha selektif davranarak segmental düzeyde bile oluşturmak mümkündür (parsiyel klempaj). Parsiyel

klempaj, geride kalan parankimin korunması için büyük avantaj sağlar. Ancak total klempajın uygulanım kolaylığına karşın, parsiyel klempaj işlemleri teknik olarak zor ve zaman alıcıdır. Karaciğerin iskemi reperfüzyon hasarına karşı korunmasını sağlayan cerrahi yöntemlerden biri de, tek ve uzun iskemi (sürekli klempaj) yerine aralıklı iskemi ve reperfüzyon uygulanması işlemidir (aralıklı klempaj). Bu zamanlamada, dönüşümlü olarak 15 dk iskemi ve 5 dk reperfüzyonun en iyi korunmayı sağladığı bildirilmiştir(85).Aralıklı klempaj yöntemi, hem parankim hasarını azaltabilme, hem de toplamda sağlanan iskemi süresini uzatabilme avantajına sahiptir. Buna karşılık deklempaj dönemlerinde ciddi kan kayıpları oluşabilmektedir.

Karaciğerde ilk iskemik önkoşullama deneyleri 1993 yılında Lloris-Carsi JM ve arkadaşları tarafından kedide yapılmış, iskemik önkoşullamanın iskemi reperfüzyon sonrasında oluşan hasarı azaltabileceği bildirilmiştir(86). Sonrasında, Kume ve Hardy (35,88) tarafından da desteklenen sonuçlar, konuya duyulan ilgiyi daha da arttırmış ve hepatik iskemik önkoşullama, gerek deneysel gerekse klinik çalışmalarda uygulanmıştır(89,1,90). Farede, sürekli, aralıklı ve önkoşullanmalı hepatik pedikül klempajlarının sonuçları karşılaştırıldığında, 75 dakikalık iskemi süresinde önkoşullamanın sağladığı sağkalım üstünlüğünün, iskemi süresinin uzaması ( 120 dakika ) halinde aralıklı klempaj lehine belirgin olarak değiştiği gösterilmiştir(90).

Deneysel karaciğer iskemi reperfüzyon modellerinde, özellikle de en sık kullanılan denek olan sıçanlarda, parsiyel hepatik iskeminin uygulanması önerilmektedir. Bu yolla, mezenterik konjesyon ve bunun çalışma sonuçlarına olabilecek istenmeyen etkisi önlenmekte, iskemi reperfüzyon hasarının izole olarak karaciğer parankimindeki etkilerini araştırmak mümkün olmaktadır. Total hepatik iskemi ise yalnızca sağkalım analizi için kullanılmalıdır. Sıçanda hepatik iskemi reperfüzyon modelinde, orta ve sol loblara ait portal dalların selektif klempajı parsiyel hepatik iskemi sağlarken, mezenterik kan akımı da kaudat ve sağ lob yoluyla drene olmayı sürdürmektedir (91).

İskemik önkoşullama, deneysel hepatik iskemi reperfüzyon modellerinde, doku ATP düzeyi, hepatik enzim sonuçları ve safra üretimi açısından belirgin iyileşme sağlamıştır (91). Bu korumanın sağlanabildiği en etkin zaman aralığı, uzun iskemiden hemen önce uygulanacak 10 dakika iskemi ve 10 dakika reperfüzyondur. İşlem, bir mini Pringle manevrası anlamına geldiğinden, ek bir cerrahi diseksiyon, alet veya farmakolojik ajan

gerektirmemektedir. Farklı iskemi reperfüzyon sürelerinin birlikte uygulanması sonucu 10 dakika iskemi 10 dakika reperfüzyonla iskemik önkoşullamanın optimum koruma sağladığı saptanmış ve bu çalışmanın sonuçları kendinden sonraki tüm uygulamalara referans kabul edilmiştir(92). Geçmişten biriken deneyimler adenozinin iskemik önkoşullamada anahtar rol oynadığını göstermektedir(93-99). İskemik önkoşullamanın 10 dakikalık iskemi süresi boyunca tüketilen hücre içi ATP, ADP ve AMP, ekstrasellülerde yüksek miktarda adozin birikimine neden olmaktadır. Adozin, nitrik oksit sentetaz indüksiyonu ile NO seviyesinde de artış sağlar. Ancak, iskeminin 10-15 dakikadan daha uzun tutulması halinde adozin seviyesi düşmeye, o ana kadar minimal düzeyde seyreden ksantin düzeyi de hızla yükselmeye başlar(92). Artan ksantin, reperfüzyonla birlikte yüksek miktarda O<sub>2</sub>• oluşumuna neden olmaktadır. Bu süperoksid iyon (O<sub>2</sub>•), adozinin indüklediği ve koruyucu etkisinden yararlanılması beklenen NO'yu yine bir oksijen radikali olan ONOO<sup>-</sup> 'e dönüştürerek ortamdaki uzaklaştırır. Sonuçta, 10-15 dakikadan daha uzun iskemilerde iskemik önkoşullama şartları ortadan kalkmaktadır.

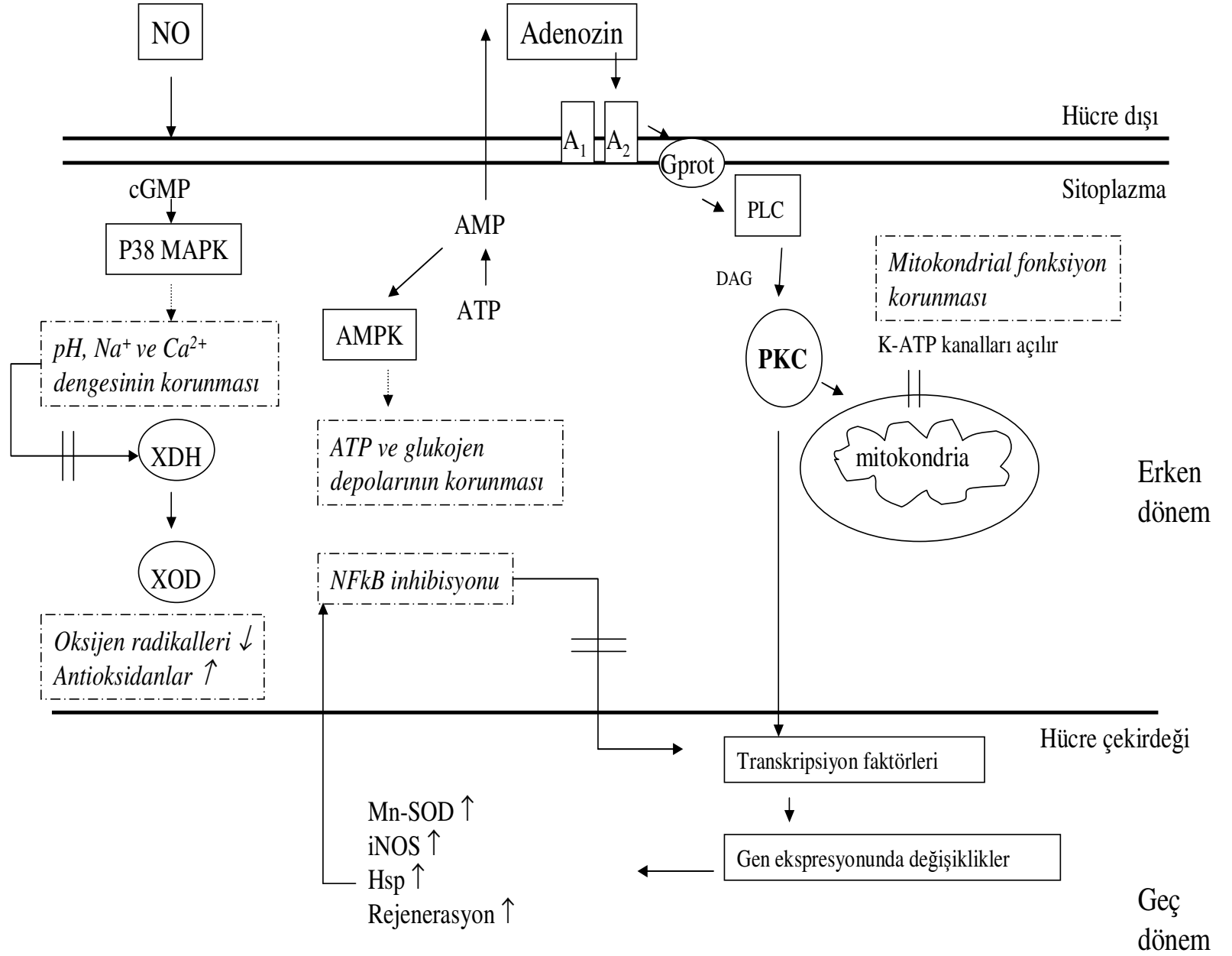
Karaciğerde uygulanan iskemik önkoşullama, hepatositlerin ve sünüzoidal endotel hücrelerin hücre içi korunma mekanizmalarını harekete geçirmenin yanında, reperfüzyonla beraber gelişen inflamatuvar cevabı azaltarak sistemik korunma da sağlamaktadır. Örneğin, iskemik önkoşullama veya adozin agonistleri ile stimüle olan endotel hücrelerine lökosit adezyonu azalmakta ve postiskemik nötrofil infiltrasyonu gerilemektedir(100).İskemik önkoşullamanın, iskemi reperfüzyona cevap olarak gelişen Kuppfer hücrelerinden TNF- $\alpha$  salınımını ve karaciğer kaynaklı endotelin üretimini engelleyerek, karaciğerdeki mikrovasküler disfonksiyonun önüne geçebildiği görülmüştür (100,87,101). Buradaki mekanizmanın NO üzerinden etkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca akciğer, ince barsak ve pankreas gibi uzak organlarda, hepatik iskemi reperfüzyon sonrası oluşan P-selektin artışını engelliyebilmektedir. Bu, uzak organlardaki oksidatif stresin düşmesini ve mikrovasküler bozuklukların önlenmesini sağlamaktadır. P-selektine veya TNF-  $\alpha$ 'ya karşı antikörlerin iskemi öncesi uygulanması önkoşullamaya benzer etki göstermektedir. Bu da, P-selektin artışının engellenmesinde, Kuppfer hücrelerinden sistemik TNF-  $\alpha$  salınımının inhibe edilmesinin etkili olduğunu düşündürmüştür (102). İskemik önkoşullamanın, TNF-  $\alpha$  ve intrasellüler adezyon molekülü 1 (ICAM-1) mRNA ekspresyonu üzerinde inhibitör etki göstermesinde NF $\kappa$ B' in baskılanması da rol oynamaktadır (103). Bu bulgu, reperfüzyon aşamasında NF $\kappa$ B inhibisyonunun karaciğerden inflamatuvar sitokinlerin sentezini azalttığı

yönündeki bilgi ile örtüşmektedir(17). Son çalışmalarda, iskemik önkoşullama ile ksantin oksidaz yolunun bloke edilebildiği, mitokondriyal fonksiyonların da korunabildiği görülmüştür. Bunun sonucunda endotelin ve serbest oksijen radikallerinin üretimi azalmış ve reperfüzyon hasarına karşı direnç artışı sağlanabilmiştir (31,104,105).

Bugün için iki tip hücre ölümü tanımlanmaktadır: nekroz ve apoptoz (programlı). Karaciğerdeki hücresel yaşam, reperfüzyonla birlikte harekete geçen sinyal ileti yollarına ve hasarlanmanın şiddetine bağlı olarak nekroz veya apoptozla sonlanır (12). Farklı yollar izleseler de, nekroz ve apoptoz aynı ortamda birlikte ilerleyebilmektedir. Normal şartlarda, otokton makrofajlar tarafından inflamatuvar yanıt gelişmeksizin ortamdan uzaklaştırılan apoptotik hücre fragmanları, apoptozun şiddetinde ve hızında artış meydana geldiğinde, inflamatuvar hücre reaksiyonuna ve yaygın bir nekroza neden olabilmektedir. Birçok etken ile tetiklenebilen apoptozda, kaspaz ve kalpein benzeri proteazlar etkin görev alırken Bcl-2, apoptotik sinyallere karşı hücreyi koruyan önemli bir antiapoptotik molekül olarak ortaya çıkmaktadır.

İskemik önkoşullamanın mitokondriyal fonksiyonları koruduğu gösterilmiştir. Önkoşullama ile iyi korunan mitokondrilerin, düşük düzey kaspaz-3 aktivitesi ve sitokrom c salınımı gösterdiği saptanmış ve bu yolla hepatosit ve endotel hücrelerinde apoptoza gidişin engellenebildiği görülmüştür (31,106).Bu çalışmalarda, iskemik önkoşullamanın, apoptoza giden yolda kaspaz aktivitesini bloke ederken kalpein düzeyini etkilemediği buna karşılık antiapoptotik molekül olan Bcl-2 ekspresyonunu artırdığı görülmüştür.

Şekil 2: İskemik önkoşullamanın erken ve geç dönem korumasında hücre içi ileti yolları



## **İskemik Sonkoşullama**

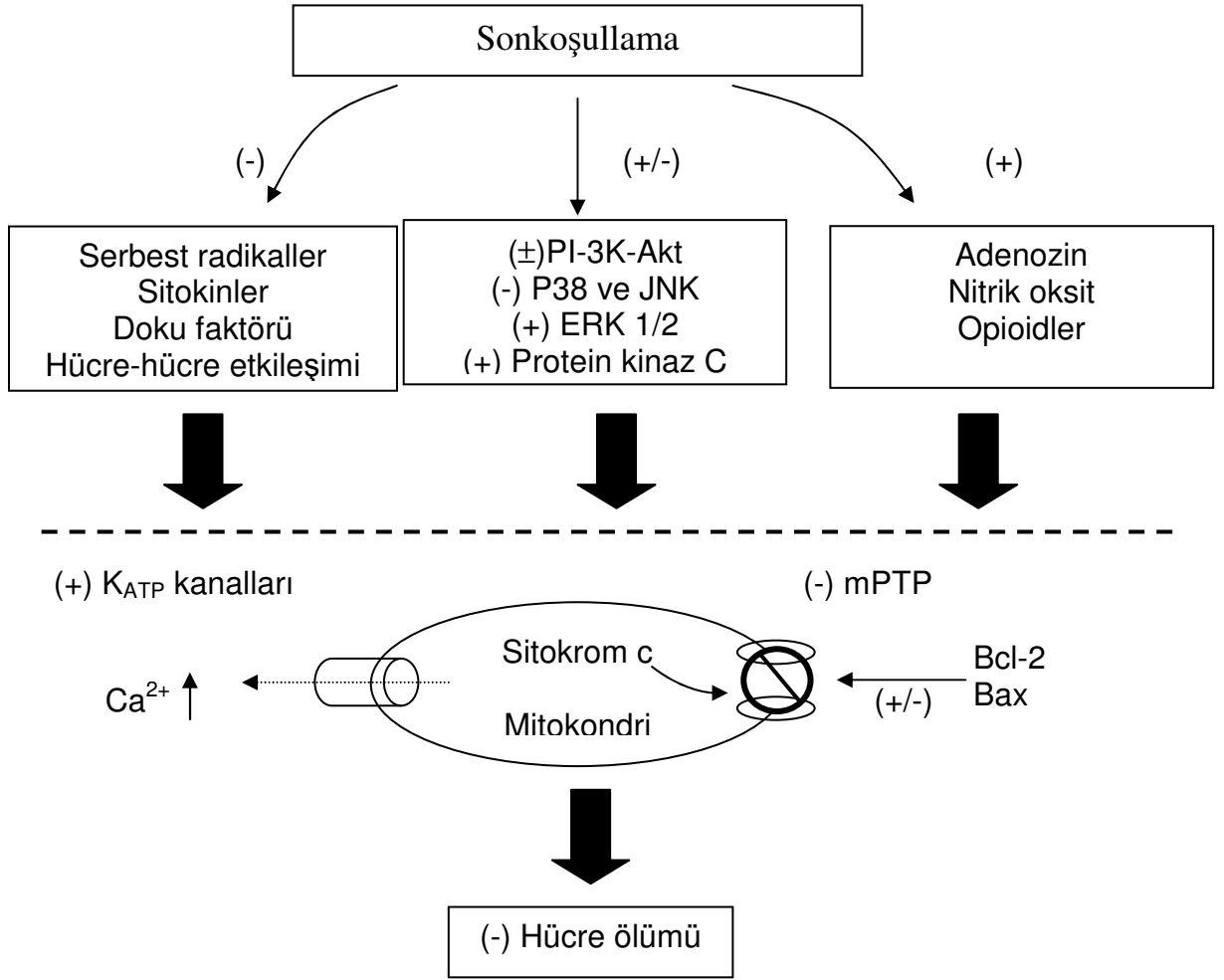
Son zamanlarda iskemik sonkoşullamanın da, iskemik önkoşullama gibi, iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu bir yöntem olduğu bildirilmektedir. İlk kez Zhao ve ark tarafından 2002’de yine kalpte tanımlanmıştır(4,5). İskemik sonkoşullama uzamış iskemi sonrasındaki reperfüzyonun erken dönemlerinde uygulanan kısa süreli iskemi ve reperfüzyon periyodları olarak tarif edilir.(6) İskemik önkoşullama hem iskemi hem de reperfüzyon hasarına karşı koruma sağlarken, iskemik sonkoşullama direkt olarak reperfüzyon hasarına karşı koruma sağlar. İskemik sonkoşullamanın hepatik iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi de gösterilmiştir. (7) Ayrıca iskemik sonkoşullamanın iskemik önkoşullama ile birlikte uygulandığında iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi yine kalpte çalışılmış ancak henüz karaciğerde çalışılmamıştır.

### *Sonkoşullama Mekanizmaları*

İskemik sonkoşullama reperfüzyonun erken döneminde mekanik olarak dokunun kanlanmasının hidrodinamiğini değiştirir. Ayrıca reperfüzyon hasarını azaltıcı endojen mekanizmaları stimüle eder. Adenozin ve opioidler gibi ligantlar moleküler yolları stimüle eden proksimal tetikleyicileri etkilerler. Sonkoşullama ayrıca p38 ve JNK mitojen-aktive protein (MAP) kinazlar gibi çeşitli yolları inhibe eder, böylece endotel hücre hasarı azalır.Mitokondrial permeabilite geçiş porlarını (mPTP) inhibe eder. Tablo 1’de özetlendiği üzere sonkoşullamanın kalp koruyucu mekanizmaları tetikleyiciler, mediatörler ve efektörleri içermektedir.(116) İskemik sonkoşullama henüz öncelikli olarak kalpte çalışılmakta ve koruyucu mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Altta yatan mekanizmalar serbest oksijen radikallerin gelişiminin ve mitokondriyal kalsiyum aşırı salınımının azaltılmasıdır. Ayrıca, Yang ve arkadaşları (113) tavşan iskemi reperfüzyon modelinde iskemik sonkoşullamanın, hücre içi sinyalleyici kinazları (ERK 1/2 ,Akt), mitokondriyal  $K_{ATP}$  kanallarını ve nitrik oksit salınımını tetiklediğini gösterdiler.Benzer olarak, Tzang ve arkadaşları, iskemik sonkoşullamanın RISK yolağı ile uyum içinde prosurvival kinazlar PI3K-Akt, eNOS, ve p70S6K’ı aktive ettiğini gösterdiler.(114) Son olarak, Yang ve arkadaşları ile Kin ve arkadaşları ise, iskemik sonkoşullama mekanizmalarının adenozin reseptörlerini de içerdiğini gösterdiler.Bu yüzden iskemik önkoşullama ile iskemik sonkoşullama arasında benzer özellikler vardır. Tablo 1’e bakınız.

Tablo 1: Önkoşullama ve sonkoşullamadaki tetikleyiciler, medyatörler ve efektörler

Olay	Önkoşullama	Etki/mekanizma	Sonkoşullama	Etki/mekanizma
<b>Tetikleyiciler</b>				
G-protein bağlı reseptörler				
Adenozin	Evet[92,93]	İskemi öncesi A <sub>1</sub> , A <sub>3</sub> aktivasyonu	Evet [14,27,51,94]	Reperfizyonda A <sub>2A</sub> , A <sub>3</sub> aktivasyonu
Opioidler	Evet[53]	PI-3- kinaz aktivasyonu, mK <sub>ATP</sub> kanalları açılması	Evet [37]	Bilinmiyor
κ	Hayır[95]	GCPR-PKC-mK <sub>ATP</sub> aktivasyonu[53]	Evet [37]	Bilinmiyor
δ <sub>1</sub>	Evet [95]		Evet [37]	Bilinmiyor
Bradikinin	Evet [96]		Bilinmiyor	
Doku faktörü /trombin(PAR1)	?		Evet [46]	PAR1 aktivasyonu
Guanil siklaz	Evet		Evet [27,32]	NO hedefi
<b>Medyatörler</b>				
e-NOS-NO				
Sinyalleme	Evet [97]	Mitokondrial kaynak, mPTP kapanması	Evet [17,32,35]	K <sub>ATP</sub> kanallarının açılması?
Anti-inflamatuar	?		Muhtemelen [10,12]	PMN azalması ve endotelial hücre aktivasyonu
Süperoksit anyonlar	Evet [98]			
Sinyalleme	Evet [97,99,100]	Artmış mitokondrial ROS	Muhtemelen	Mitokondrial?
Oksidatif “patlama”	Evet [100]		Evet [12,13]	Azalmış üretim; [10,12,13,41] artmış endojen antioksidanlar[33]
Protein kinaz C	Evet	K <sub>ATP</sub> kanalların fosforilasyonu; kinazların aktivasyonu	Evet [27]	Bilinmiyor
PI-3-kinaz	Evet	Artmış eNOS aktivitesi, anti-apoptotik yollar	Evet [28,101,102]; Hayır [26]	Bilinmiyor [27]
ERK 1/2	Hayır		Evet [15,102]	
GSK-3β			Bilinmiyor	
P70S6K				
K <sub>ATP</sub> kanalları	Evet	ROS, RKC <sub>e</sub> , fosforilasyon		
Mitokondrial	Evet [99]	ROS stimülasyonu, kinazlar lehine aktivasyon	Evet [15,19]	Bilinmiyor
Sarkolemmal	Evet; Hayır		Hayır [19]	
<b>Efektörler</b>				
mPTP	Evet		Evet	Kapanma, artmış kalsiyum rezistansı [20,79]



Şekil 3: Sonkoşullamanın kardiyak korumada görev alan hücre içi ileti yolları ve etkileri

### Hepatik İskemik Sonkoşullama

Hepatik iskemik sonkoşullama, kalpteki çalışmaların ardından ilk kez Kai Sun ve arkadaşları tarafından sıçanda 2004'de çalışılmıştır.(7) Sıçanlarda 60 dakikalık hepatic iskemi sonrası ikişer dakikalık iskemi periyodları arasında 2,3,5 ve 7 dakikalık reperfüzyon periyodları şeklinde sonkoşullama uygulanmıştır. Bu şekilde tarif edilen hepatic iskemik sonkoşullama ile reperfüzyon sonrası hepatosellüler apoptozisin azaltılabildiği gösterilmiştir. Wang N ve arkadaşları da sıçan karaciğer transplantasyon modelinde donör karaciğer greft implantasyon sonrası reperfüzyonun erken döneminde sonkoşullama uygulayarak iskemi reperfüzyon hasarının azaltılabildiğini göstermişlerdir.(117)



## GEREC VE YÖNTEM

### **Deney Hayvanları ve Cerrahi İşlem**

Deneyisel işlemler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nın ameliyathane, denek ve barınak imkanları kullanılarak yapılmıştır. Sıçanlar, oda sıcaklığının  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$  olduğu ve 12 saat aydınlık/karanlık siklusunun sağlandığı odalarda, üçerli gruplar halinde kafeslerde barındırılmıştır ve standart laboratuvar diyeti ve istedikleri kadar içebilecekleri su ile beslenmişlerdir.

Çalışmada 200-300 gr ağırlığında, 60 adet Wistar tipi erkek sıçan denek olarak kullanıldı. Tüm sıçanlara 100 mg/kg dozda ketamin hidroklorid (Ketalar ®) ve 10 mg/kg dozda ksilazin (Alfazyne ®) kombinasyonunun intraperitoneal enjeksiyonu ile anestezi sağlandı. Supin pozisyonda orta hat karın kesisi ile müdahale edildi. Mikro damar klemp kullanarak, karaciğerin orta ve sol loblarına giden portal ven, hepatik arter ve safra kanalını içeren hepatik pedikül klemlenerek parsiyel hepatik iskemi oluşturuldu. İskemi süresi 60 dakika tutuldu. Bu süre sonunda klemp açılarak karaciğer 120 dakika reperfüze edildi. Sıçanların yarısı 120 dakikalık reperfüzyon sonunda kardiyak punktür yöntemi ile sakrifiye edildi. Biyokimyasal ve histolojik incelemeler için kan ve karaciğer doku örnekleri alındı. Kalan yarısı ise, geç dönem etkilenmeyi değerlendirmek amacıyla klemp alındıktan sonra batın kapatılarak 7 gün sonra sakrifiye edilip kan ve karaciğer doku örnekleri alındı. İskemik önkoşullama 60 dakikalık iskemi öncesinde 10 dakika iskemi, 10 dakika reperfüzyon şeklinde kısa aralıklı tek bir periyodla sağlandı. İskemik sonkoşullama ise 60 dakikalık iskemi sonrasında reperfüzyonun hemen başında ikişer dakikalık iskemi periyodları arasında 2,3,5 ve 7 dakikalık reperfüzyon şeklinde kısa aralıklı dört periyodla sağlandı. Ardından reperfüzyon süresi toplamda yine 120 dakikaya tamamlandı.

Alınan kan örneğinde aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktatdehidrogenaz (LDH) ve total bilirubin çalışıldı. Karaciğer doku örneği ise karaciğerin iskemi uygulanan orta ve sol lobları eksize edilerek sağlandı. Bir kısmı  $-80^{\circ}\text{C}$ , diğer bir kısmı da histolojik inceleme için % 10 formalin içinde saklandı. Bu dokularda iskemi reperfüzyon hasarına bağlı nekroinflamatuvar aktivite histopatolojik olarak derecelendirildi ve oksidatif stres göstergesi olan lipid peroksidasyon düzeyi için de malondialdehid (MDA) çalışıldı. 7 gün sonra sakrifiye edilen sıçanlarda hepatik rejenerasyon göstergesi olarak,

karaciğer doku örneklerinde proliferere hücre nükleer antijeni (PCNA) immundokimyasal boyama yapıldı.

### Deney Grupları ve Protokol

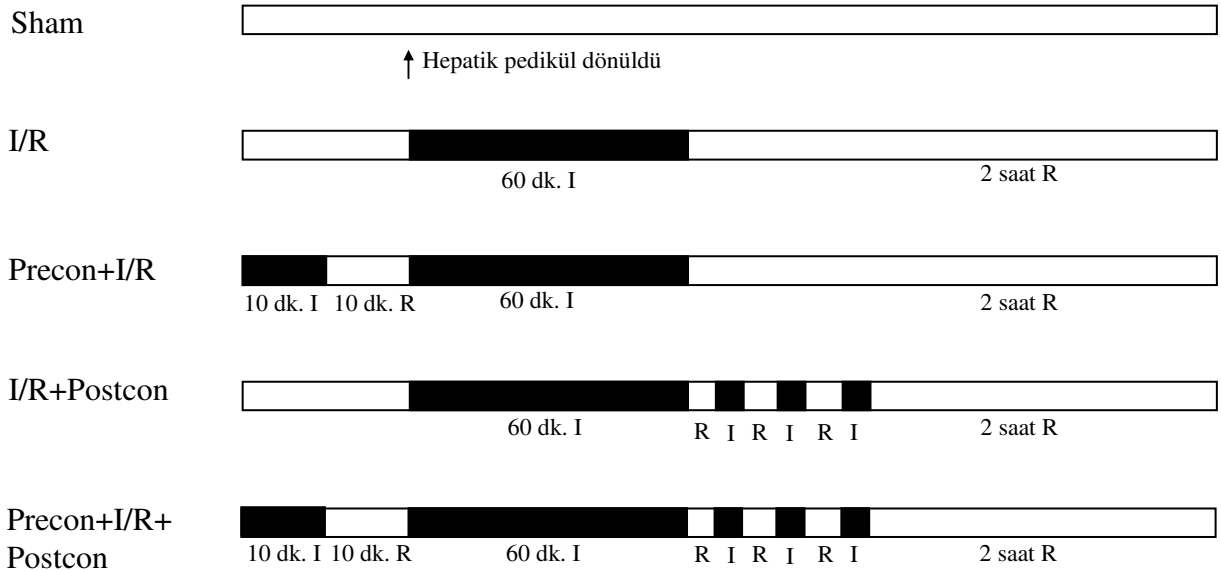
1. grup (Sham grubu): Sıçanlara (n:4), hepatic pedikül diseke edildikten sonra başka bir müdahale yapılmadan iskemi reperfüzyon grubundaki süre kadar bekletildi.

2. grup I/R (İskemi reperfüzyon grubu): Sıçanlara (n:14), 60 dakika iskemi sonrası 120 dakika reperfüzyon uygulandı.

3. grup Precon +I/R (İskemik önkoşullama grubu): Sıçanlara (n:14), 10 dakika iskemi sonrası 10 dakika reperfüzyon şeklinde iskemik önkoşullama, sonra iskemi reperfüzyon grubundaki gibi uzun süreli iskemi reperfüzyon uygulandı.

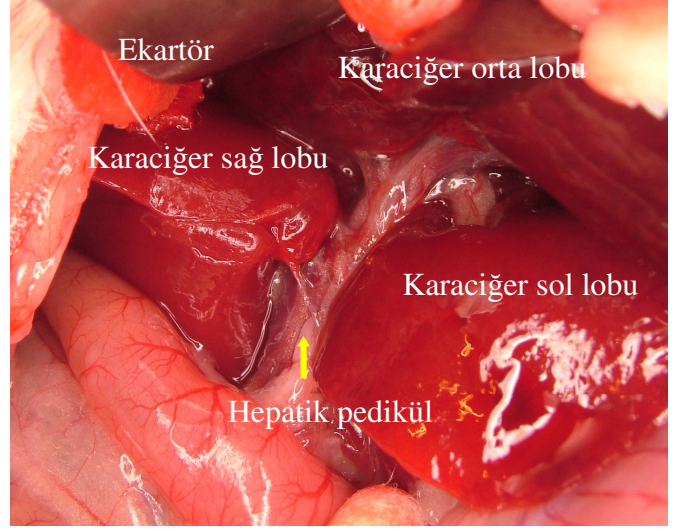
4. grup I/R+Postcon (İskemik sonkoşullama grubu): Sıçanlara (n:14), 60 dakika iskemi sonrası, ikişer dakikalık iskemi aralarında 2, 3, 5, 7'şer dakikalık reperfüzyon periyodları şeklinde iskemik sonkoşullama uygulandı. Ardından reperfüzyon 120 dakikaya tamamlandı

5. grup Precon+I/R+Postcon (İskemik önkoşullama + sonkoşullama grubu): Sıçanlara (n:14), tarif edildiği gibi iskemik önkoşullama, ardından 60 dakika iskemi, sonra yine tarif edildiği gibi iskemik sonkoşullama uygulandı. Ardından yine reperfüzyon 120 dakikaya tamamlandı.

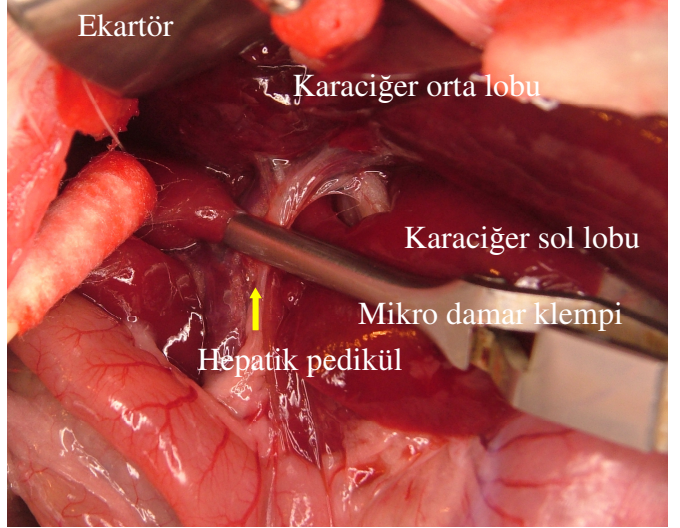


Şekil 4: Deney gruplarında uygulanan iskemi reperfüzyon periyodları

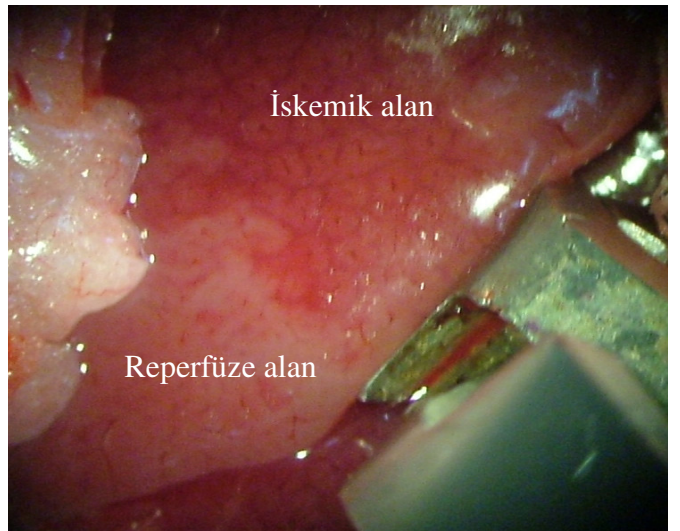
Resim 1.  
Sıçan karaciğerinde hepatik pedikül diseksiyonu



Resim 2.  
Hepatik pedikülün klempe edilerek parsiyel hepatik iskemi oluşturulması



Resim 3.  
Klempin alınarak karaciğer reperfüzyonunun sağlanması



## **Biyokimyasal ve Patolojik Değerlendirme**

### *Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü*

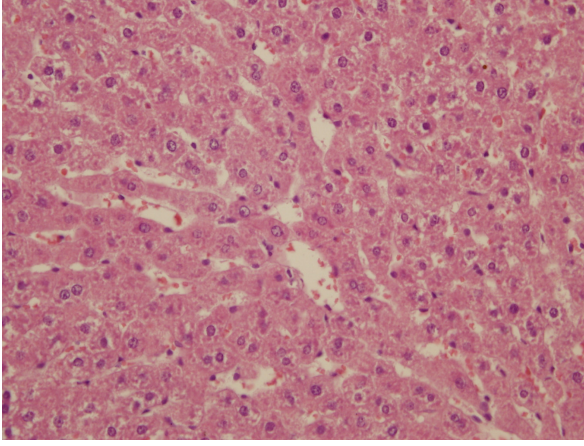
Kan alımını takiben serum örneği, kan pıhtılaştıktan sonra 3000 rpm’de 10 dakika santrifüje edilmesiyle elde edildi. Serum örnekleri ölçümler yapılana kadar -21 C°’de saklandı. Serum AST, ALT, LDH ve total bilirubin seviyeleri, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı’nda “Roche p modüler otoanalizör sistemi” kullanılarak ölçüldü.

### *Karaciğer Dokusunda MDA Ölçümü*

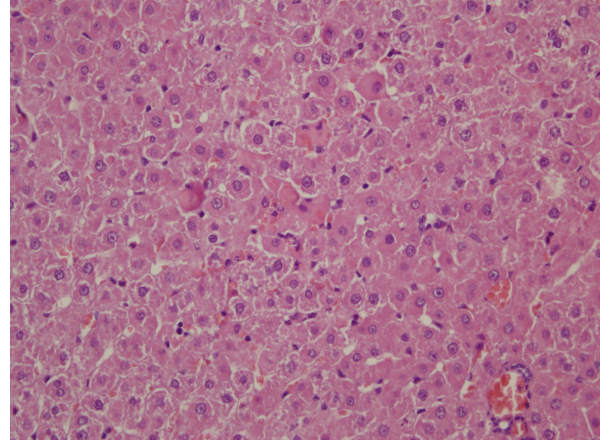
Karaciğer doku örneklerinde MDA derişimi Ohkawa ve arkadaşlarının tarif ettikleri yöntem kullanılarak saptanmıştır (118). Yöntem, MDA’nın tiyobarbitürik asitle yaptığı kompleksin kolorimetrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır. Doku homojenizasyonu hazırlamak için alınan karaciğer dokusu % 0.9’luk NaCl ile yıkanıp, kurulandı. Doku örnekleri ependorf tüpüne konarak – 80 C° ‘de saklandı. Dokuların izotonik KCl çözeltisinde cam homojenizatör kullanılarak homojenizasyonu ( 1:10, w/v) sonrası elde edilen homojenat analizde kullanıldı. Homojenatlara tiyobarbitürik asit, sodyum dodesil sülfat ve asetik asit eklendi. Kaynar su banyosunda 60 dakika inkübe edildikten sonra tüpler soğutulmuş olarak üzerlerine n-butanol-piridin eklendi ve 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantın absorbansı 532 nm’de köre karşı ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri deneyde standart olarak kullanılan tetra etoksi propan (TEP) absorbans değerleri ile karşılaştırılarak konsantrasyon saptandı ve gram yaş doku başına nanomol olarak ifade edildi ( nmol/g yaş doku).

### *Karaciğer Hücre Histolojisinin Değerlendirilmesi*

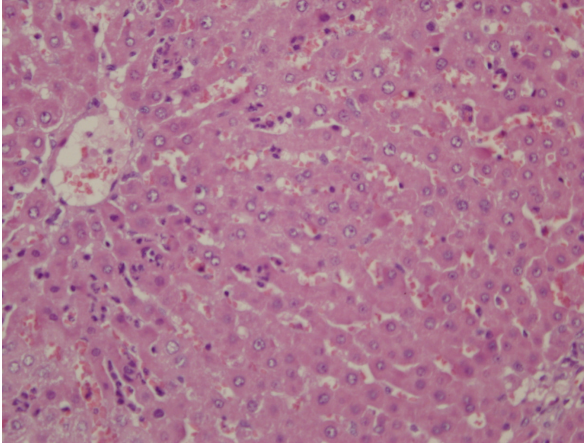
Karaciğer örnekleri Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Laboratuvarı’nda incelendi. %10’luk formalinde fikse edilmiş ve parafine gömülmüş olan karaciğer örneklerinden 5 µm’lik kesitler alınarak, hematoksilin-eozin ile boyandı. Karaciğer doku örnekleri hepatosit hasarı yönünden incelendi. Hücre histolojisindeki değişimler konjesyon, nekroz, sitoplazmik vakuolizasyon ve eozinofili, nükleer piknozis ve inflamatuvar hücre yoğunluğu yönünden, bir patolog tarafından kör olarak değerlendirildi. Hepatosit hasarı, 0: hasar yok yada minimal hasar, 1:hafif hasar ,2:orta hasar, 3:şiddetli hasar şeklinde derecelendirildi.



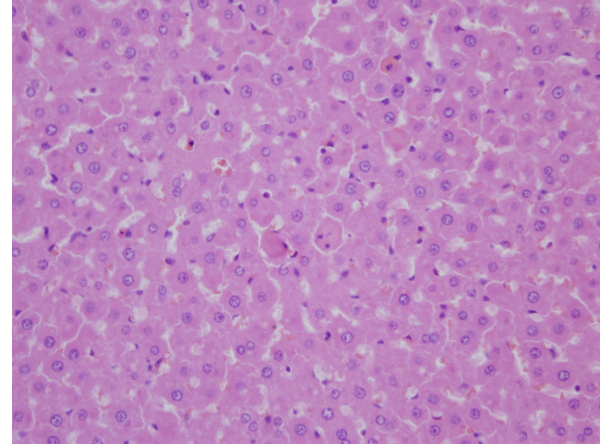
Resim 4. Normal karaciğer parankimi  
(Hematoksilen Eosin Boyama) X40 büyütme



Resim 5. Hafif karaciğer parankim hasarı  
(Hematoksilen Eosin Boyama) X40 büyütme



Resim 6. Orta karaciğer parankim hasarı  
(Hematoksilen Eosin Boyama) X40 büyütme

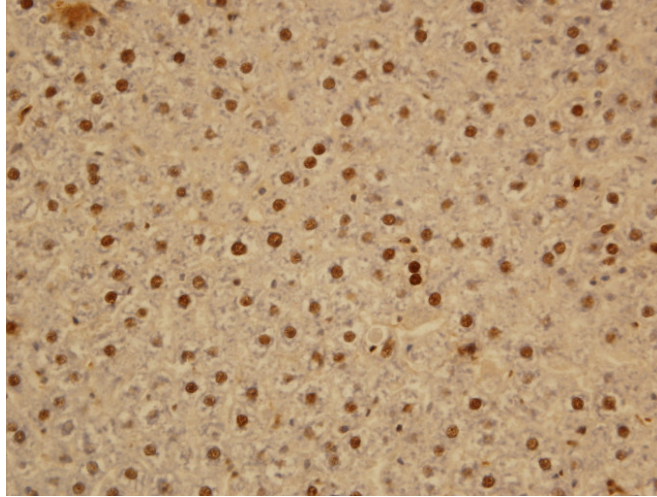


Resim 7. Şiddetli karaciğer parankim hasarı  
(Hematoksilen Eosin Boyama) X40 büyütme



### *İmmundokukimyasal Boyama ve Değerlendirme*

Sıçan karaciğer dokusunu örnekleyen parafin bloklardan, Poly-L-lizin kaplı lamlara 5µm kalınlığında kesitler hazırlandı. Mitotik aktiviteyi belirlemek için proliferen hücre nükleer antijeni (PCNA) (DAKO 1/100) kullanarak, streptavidin-biotin immunperoksidaz yöntemi ile immunboyama yapıldı. Oda sıcaklığında en az 24 saat bekletilen kesitler, ksilolde 20 dakika bekletilerek deparafinize edildikten sonra, %96'lık alkolden, %70'lik alkole dek inen alkol serilerinden geçirilerek rehidratasyon sağlandı ve TRİS solusyonunda yıkandı. Kesitler zerine %3'lk hidrojen peroksit damlatılarak, beş dakika beklendi ve endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi ve yine TRİS solusyonuna alındı. Buradan kesitler mikrodalga fırına alınarak beş dakika kaynatıldı, antijenin açığa çıkması sağlandı. Oda ısısında soğumaya bırakılan kesitler üzerine dokuyu çevreleyecek miktarda (50-100µl ) primer antikorlar damlatıldı ve 30 dakika bekletildi. Daha sonra TRİS'de yıkanarak, aynı miktarda biotinize sekonder antikor damlatıldı ve 10 dakika beklendi. Tekrar TRİS' de yıkanan kesitlere, streptavidin peroksidaz solusyonu damlatılarak, 10 dakika beklendi ve TRİS'de yıkandı. Kromojenik reaksiyon için, daha önceden hazırlanan 3.3-diaminobenzidin (DAB) damlatıldı.



Resim 8. İmmundokukimyasal (PCNA) boyama

PCNA ile immundokukimyasal boyama yapılan tüm kesitler grup özelliklerinden habersiz bir patolog tarafından değerlendirildi. Küçük büyütmede en yoğun boyanma ve en az boyanma gösteren alanlar seçilerek büyük büyütme alanlarında sayıldı. Toplamda 1000 hücre sayılarak bu alanlarda bariz nükleer boyanma gösteren hücreler mitotik aktif olarak değerlendirildi.

### **İstatistiksel Analiz**

Tüm parametrik veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak belirtildi. Gruplar arası ortalamaların karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA ve Tukey's testi kullanılırken, histopatolojik verilerin değerlendirilmesinde Mann-Witney U testi uygulandı. P değeri  $<0.05$  istatistiksel anlamlı kabul edildi..

## **BULGULAR**

İskemi reperfüzyon sonrası erken dönem serum enzim sonuçları değerlendirildiğinde, iskemik sonkoşullama grubunda (IR + Postcon) oluşan parankim hücre hasarının, yalnızca iskemik reperfüzyon grubunda (I/R) oluşan hasara oranla anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (Tablo 2). Birlikte uygulandığında (Precon+I/R+Postcon) ise iskemik önkoşullamanın, sonkoşullamanın verdiği hasarı etkin bir şekilde azalttığı gözlemlendi. Tek başına iskemik önkoşullamanın (Precon + IR), iskemik reperfüzyon hasarını azalttığı ancak aradaki farkın istatistiksel anlam kazanmadığı saptandı

İskemi reperfüzyon sonrası erken dönemde karaciğer dokusunda oluşan oksidatif stresin (MDA) değerlendirilmesinde gruplar arası fark gözlenmedi (Tablo 3). Parankim hasarının histopatolojik derecelendirilmesi sonucu sham grubu dışındaki çalışma grupları arasında anlamlı fark saptanmadı (Tablo 4).

İskemi reperfüzyon sonrası yedinci gün verileri değerlendirildiğinde, serum enzim ve karaciğer doku MDA düzeyleri, parankim hücre hasarının histopatolojik derecelendirilmesi açısından gruplar arası anlamlı fark tespit edilmedi (Tablo 5-7). Hepatik rejenerasyonun göstergesi olarak hepatositlerdeki mitotik aktivitenin değerlendirilmesinde, sham dışında tüm gruplardaki aktivitenin arttığı ancak bu grupların kendi aralarında anlamlı fark bulunmadığı saptandı (Tablo 8).



Tablo 2: Erken dönemde serum karaciğer enzim ve T.bilirubin düzeyleri

Gruplar	AST (U/l)	ALT (U/l)	LDH (U/l)	T. Bil. (mg/dl)
Sham	79±16	55±21	975±84	0,1±0,01
I/R	962±160 <sup>a</sup>	1103±402 <sup>a</sup>	5361±404 <sup>a</sup>	0,1±0,08
Precon+I/R	955±101 <sup>a</sup>	899±160 <sup>a</sup>	5298±978 <sup>a</sup>	0,1±0,00
I/R+Postcon	1591±150 <sup>a,b</sup>	2193±489 <sup>a,b</sup>	5988±1410 <sup>a</sup>	0,1±0,01
Precon+I/R+Postcon	1098±162 <sup>a,c</sup>	1029±140 <sup>a,c</sup>	5884±1163 <sup>a</sup>	0,1±0,00

<sup>a</sup> : p< 0.05 vs sham, <sup>b</sup> : p< 0.05 vs I/R, <sup>c</sup> : p<0.05 vs I/R+Postcon

Değerler ortalama± standart hata olarak verilmiştir.

Tablo 3: Erken dönemde karaciğer dokusunda MDA düzeyleri

Gruplar	MDA ( nmol/g yaş doku )
Sham	167±4,95
I/R	194±16,63
Precon+I/R	207±15,23
I/R+Postcon	193±12,35
Precon+I/R+Postcon	191±17,05

Değerler ortalama± standart hata olarak verilmiştir.

Tablo 4: Erken dönemde karaciğer parankim hücre hasarı değerlendirilmesi

Gruplar	Histopatolojik derecelendirme
Sham	0 (0:0)
I/R	2 (2:3) <sup>a</sup>
Precon+I/R	2 (1:3) <sup>a</sup>
I/R+Postcon	2 (2:3) <sup>a</sup>
Precon+I/R+Postcon	2 (1:3) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> : p< 0.05 vs sham

Değerler ortanca ( minimum: maksimum ) olarak verilmiştir.

Tablo 5: Geç dönemde serum karaciğer enzim ve T.bilirubin düzeyleri

Gruplar	AST (U/l)	ALT (U/l)	LDH (U/l)	T. Bil. (mg/dl)
Sham	42±6,5	28±3,4	360±82	0,1±0,02
I/R	107±9,1	51±4,4	1091±188	0,1±0,01
Precon+I/R	248±8,9	65±7,8	2321±513	0,1±0,04
I/R+Postcon	118±12,8	56±7,4	1411±371	0,1±0,01
Precon+I/R+Postcon	109±7,0	54±4,8	1329±245	0,1±0,00

Değerler ortalama± standart hata olarak verilmiştir.

Tablo 6: Geç dönemde karaciğer dokusunda MDA düzeyleri

Gruplar	MDA ( nmol/g yaş doku )
Sham	118±7,0
I/R	159±8,1
Precon+I/R	178±14,1
I/R+Postcon	156±7,9
Precon+I/R+Postcon	154±8,8

Değerler ortalama± standart hata olarak verilmiştir.

Tablo 7: Geç dönemde karaciğer parankim hücre hasarı değerlendirilmesi

Gruplar	Histopatolojik derecelendirme
Sham	0 (0:0)
I/R	1 (1:2)
Precon+I/R	1 (1:2)
I/R+Postcon	1 (1:2)
Precon+I/R+Postcon	1 (1:2)

Değerler ortanca ( minimum: maksimum ) olarak verilmiştir.

Tablo 8: Geç dönemde rejenerasyonun değerlendirilmesi

Gruplar	İmmundokimyasal değerlendirme
Sham	1±0,0
I/R	12±3,8 <sup>a</sup>
Precon+I/R	14±6,1 <sup>a</sup>
I/R+Postcon	11±3,3 <sup>a</sup>
Precon+I/R+Postcon	13±4,3 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> : p< 0.05 vs sham

Değerler ortalama± standart hata olarak verilmiştir.

## TARTIŞMA

İskemi reperfüzyon hasarı karaciğer travmaları, karaciğer rezeksiyonu ve karaciğer transplantasyonu sonrası ortaya çıkabilen klinik bir problemdir. Karaciğer ile ilgili cerrahi girişimler (travma sırasında kanama kontrolü amacı ile geçici olarak yapılan Pringle manevrası veya total vasküler klempaj, tümör nedeni ile yapılan karaciğer rezeksiyonlarında uygulanan geçici vasküler klempemeler), organ transplantasyonları (rezeksiyon sonrası reanastomoz yapılabildiği kadar geçen soğuk iskemi süresi) gibi bir çok durumda geçici olarak kan akımının durması ile iskemi, kan dolaşımının tekrar sağlanması ile de reperfüzyon oluşmaktadır. İskemi reperfüzyon hasarı kompleks, multifaktöriyel bir patofizyolojik mekanizma sonucu ortaya çıkmaktadır. Doku hasarı hem iskemi hem de reperfüzyon döneminde oluşmaktadır.

Karaciğere ait sol ve orta lobları besleyen hepatik arter, portal ven ve safra kanalının klempe edilmesiyle parsiyel hepatik iskemi ve takiben de reperfüzyon oluşturulması hem karaciğer cerrahisinde hem de laboratuvar hayvan deneylerinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Karaciğeri iskemi reperfüzyon hasarından koruma yöntemleri olan önkoşullama ve sonkoşullamanın hücre hasarını azaltıcı etkileri deneysel modellerde gösterilmiş hatta önkoşullama klinik uygulamada yer almıştır. İskemik önkoşullama hücre veya dokuların iskemi ve reperfüzyona kısa süreli maruz kalması ve sonrasında daha uzun süreli iskemi ile oluşan doku hasarında belirgin azalma oluşturan bir yöntemdir. Hepatik önkoşullamada en etkili koruyucu süre, iskemi öncesi tek siklus şeklinde 10 dakika iskemi ve 10 dakika reperfüzyon uygulanmasıdır. Sonkoşullama ise yeni bir yöntem olup daha çok kalpte çalışılmıştır. İskemik sonkoşullama uzamış iskemi sonrasındaki reperfüzyonun erken dönemlerinde uygulanan kısa süreli iskemi ve reperfüzyon periyodları olarak tarif edilir. Kalpte bugün için en etkili koruyucu süre, reperfüzyon öncesi üç siklus halinde 30 saniye iskemi ve 30 saniye reperfüzyon uygulamasıdır. Henüz, literatürde, hepatik sonkoşullamanın çalışıldığı sadece iki çalışma vardır. Karaciğer için tarif edilen sonkoşullama süresi, reperfüzyon öncesi ikişer dakikalık iskemi periyodları arasında 2 ,3 ,5 ve 7' şer dakikalık reperfüzyon periyodları şeklindedir.(7)

Gerek iskemik önkoşullamanın gerekse iskemik sonkoşullamanın iskemi reperfüzyon hasarını azaltıcı etkileri ayrı ayrı uygulamalarla gösterilmiştir. Bugün için literatürde her iki yöntemin birlikte aynı anda uygulandığı sadece üç çalışma vardır. Üçü de kalp modelinde

çalışılmıştır. Bunlardan biri, bu iki yöntemin birlikte uygulanmasının ayrı ayrı uygulamalara göre daha etkili koruma sağladığını göstermiş,(113) diğer ikisi ise birlikte uygulamanın ek bir koruma sağlamadığını, ayrı ayrı uygulamalara eşdeğer bir koruma sağladığını göstermiştir.(114,116)

Hepatik iskemi reperfüzyon hasarının hücresel düzeyde en iyi göstergeleri arasında AST, ALT, LDH gibi bazı karaciğer enzim aktivitelerinin belirlenmesi , oksidatif stres göstergesi olarak karaciğer dokusunda MDA tayini ve karaciğer dokusuna ait (morfolojik) histopatolojik değerlendirmeler sayılmaktadır (107-109)

Çalışmamızda öncelikle iskemi reperfüzyon uygulamasıyla karaciğer hücre hasarı oluşturduk. Bu hasar artışını önce ayrı ayrı uyguladığımız iskemik önkoşullama ve iskemik sonkoşullama yöntemleri ile azaltabileceğimizi ardından bu yöntemlerin birlikte uygulanmasıyla hasar artışını daha etkin azaltabileceğimizi düşündük. Ancak iskemik önkoşullama ile hasar azaltılmasına rağmen istatistiksel anlamlılık kazanmadı. İskemik sonkoşullama uygulanan grupta ise iskemi reperfüzyon hasarı beklendiği gibi azalmadı, aksine arttı. Her iki yöntem birlikte uygulandığında ise, iskemik sonkoşullama uygulanan gruptaki hasar artışı istatistiksel anlamlı olarak geriledi

Çalışmamızda literatürden farklı olarak iskemik sonkoşullama uygulanan grupta iskemi reperfüzyon hasarının öngörüldüğü gibi azalmadığını, aksine arttığını tespit ettik. Bu hasar artışınının, iskemi reperfüzyon hasarını azaltmada altın standart olarak ifade edilen iskemik önkoşullama ile gerilediğini tespit ettik.

## **SONUÇ VE ÖNERİLER**

Hepatik iskemi reperfüzyon hasarını önlemek amacıyla önerilen ve klinik uygulamada da yerini bulan “iskemik önkoşullama” etkin bir korunma yöntemidir.

Bu çalışmanın sonuçları, son zamanlarda tarif edilen ve hepatik iskemi reperfüzyon hasarına karşı iskemik önkoşullamaya eşdeğer bir koruma sağladığı iddia edilen iskemik sonkoşullamanın bu etkiyi göstermediğini, beklenin aksine karaciğer iskemi reperfüzyon hasarını artırdığını göstermiştir. Bu yöntemin uygulanma şekli (iskemi reperfüzyon periyodların sayısı, süresi ve başlama zamanı) açısından daha kapsamlı deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Annals of Surgery* 2000 ; 232(2):155-162.
2. Serafin A, Rosello-Catafau J, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Peralta C. Ischemic preconditioning increases the tolerance of Fatty liver to hepatic ischemia reperfusion injury in the rat. *Am J Pathol* 2002; 161(2):587-601.
3. Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Protective Effect of Liver Ischemic Preconditioning on Liver and Lung Injury Induced by Hepatic Ischemia-Reperfusion in the Rat. *Hepatology* 1999; 30(6):1481-1489.
4. Zhao Z-Q, Corvera JS, Wang N-P, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Reduction in infarct size and preservation of endothelial function by ischemic postconditioning: comparison with ischemic preconditioning. *Circulation* 2002;106:II314 [Suppl., Abstract].
5. Zhao Z-Q, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 2003; 285:579– 88.
6. Hajime Kin, Zhi-Qing Zhao, He-Ying Sun, Ning-Ping Wang, Joel S. Corvera, Michael E. Halkos, Faraz Kerendi, Robert A. Guyton, Jakob Vinten-Johansen. Postconditioning attenuates myocardial ischemia–reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovascular Research* 2004; 62: 74– 85.
7. Kai Sun, Zhi-Su Liu, Quan Sun. Role of mitochondria in cell apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effect of ischemic postconditioning. *World J Gastroenterol* 2004;10(13):1934-1938.
8. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: A review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery* 2004; 24:468-475.
9. Bronk SF, Gores GJ. Efflux of protons from acidic vesicles contributes to cytosolic acidification of hepatocytes during ATP depletion. *Hepatology* 1991; 14:626-633.

10. Carini R, Autelli R, Bellomo G, Albano E. Alterations of cell volume regulation in the development of hepatocyte necrosis. *Exp Cell Res* 1999; 248:280-293.
11. Gasbarrini A, Borle AB, Farghali H, Bender C, Francavilla A, Van Thiel D. Effect of anoxia on intracellular ATP, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and cytotoxicity in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1992; 267:6654-6663.
12. Rosser BG, Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 1995; 108:252-275.
13. Maxwell, S.R.J., Lip, G.Y.H. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int. J. Cardiol* 1997; 58:95-117.
14. Carden, D.L., Granger, D.N. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J. Pathol* 2000;190: 255-66.
15. Collard, C.D., Gelman, S. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesthesiology* 2001; 94:1133-1138.
16. Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DD, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 2002; 73:493-499.
17. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000; 32:169-173.
18. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation* 1993; 55:1265-1272.
19. Onishi I, Shimizu K, Tani T, Hashimoto T, Miwa K. JNK activation and apoptosis during ischemia-reperfusion. *Transplant Proc* 1999; 31:1077-1079.
20. Abdennebi, H.B., Steghens, J.P., Margonari, J., Virieux, S.R., Boillot, O. High-Na<sup>+</sup> low-K UW cold storage solution reduces reperfusion injuries of the rat liver graft. *Transp. Int* 1998; 11: 223-230.

21. Detroz, B., Honore, P., Denoiseux, C., Jacquet, N. Biology, Physiology and Physiopathology of Clamping during Liver Surgery, *Hepato-Gastroenterology* 1998; 45:359.
22. Kazuo, H., Nishida, T., Seiyama, A., Ueshima, S., Hamada, E., Ito, T., Matsuda, H. Recovery of blood flow and oxygen transport after temporary ischemia of rat liver. *Am. J. Physiol* 1998; 275 (Heart Physiol. 44): H 243-249.
23. Grace, P.A. Ischemia-reperfusion injury. *British Journal of Surgery* 1994; 81:637-647.
24. Hamović, M. Muscular, renal and metabolic complications of acute occlusions. Myonephropathic syndrome. *Surgery* 1989; 70:737-57.
25. Parks, D.A., Granger, D.N. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am. J. Physiol* 1986; 250: 749-53.
26. Connaughton, P.J., Bahuth, J.J., Lewis, F.J. Lung ischemia up to six hours; influence of topical cooling in situ on subsequent pulmonary function. *Dis. Chest* 1962; 41: 404-408
27. Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien PA. Synergism between platelets and leukocytes in inducing endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver: a Kupffer cell-mediated injury. *FASEB J* 2001; 15:1230-1232.
28. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology* 2001; 33:397-405.
29. Kohli V, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Calpain mediates ischemic injury of the liver through modulation of apoptosis and necrosis. *Gastroenterology* 1999; 116:168-178.
30. Murry, C.E., Jennings, R.B., Reimer, K.A.: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.*, 74, 1124-1136 (1986).
31. Cavalieri B, Perrelli MG, Aragno M, Mastrocola R, Corvetti G, Durazzo M, Poli G, Cutrin JC. Ischemic preconditioning attenuates the oxidant-dependent mechanisms of reperfusion cell damage and death in rat liver. *Liver Transpl* 2002; 8:990-999.



32. Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, op dW, Fraunberger P, Bilzer M. Induction of cellular resistance against Kupffer cell-derived oxidant stress: a novel concept of hepatoprotection by ischemic preconditioning. *Hepatology* 2003; 37:286-295.
33. Chen, J., Graham, S.H., Zhu, R.L., Simon, R.P.: Stress proteins and tolerance to focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.*, 16, 566-577 (1996).
34. Gürke, L., Marx, A., Sutter, P.-M., Frentzel, A., Salm, T., Harder, F., Seeling, J., Heberer, M.: Ischemic preconditioning improves post-ischemic skeletal muscle function. *Am. Surg.*, 62, 391-394 (1996).
35. Hardy, K.J., McClure, D.N., Subwongcharoen, S.: Ischemic preconditioning of the liver: a preliminary study. *Aust. N. Z. J. Surg.*, 66, 707-710 (1996).
36. Matsuyama, K., Chiba, Y., Ihaya, A., Kimura, T., Tanigawa, N., Muraoka, R.: Effect of spinal cord preconditioning on paraplegia during cross-clamping of the thoracic aorta. *Ann. Thorac. Surg.*, 63, 1315-1320 (1997).
37. Hawaleshka, A., Jacobsohn, E.: Ischemic preconditioning: mechanisms and potential clinical applications. *Can. J. Anaesth.*, 45, 670-682 (1998).
38. Cohen, M.V., Liu, G.S., Downey, J.M.: Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits. *Circulation.*, 84, 341-349, (1991).
39. Liu, Y., Downey, J.M.: Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am. J. Physiol.*, 263, H1107-1112 (1992).
40. Van Winkle, D.R., Thornton, J.D., Downey, D.M., Downey J.M.: The natural history of preconditioning: cardioprotection depends on duration of transient ischemia and time to subsequent ischemia. *Coron. Artery Dis.*, 2, 613-619 (1991).
41. Li, Y., Whittaker, P., Kloner, R.A.: The transient nature of the effect of ischemic preconditioning on myocardial infarct size and ventricular arrhythmia. *Am. Heart. J.*, 123, 346-353 (1992).

42. Murry, C.E., Richard, V.J., Jennings, R.B., Reimer, K.A.: Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol.*, 260, H796-H804 (1991).
43. Marber, M.S., Latchman, D.S., Walker, J.M., Yellon, D.M.: Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation.*, 88, 1264-1272 (1993).
44. Chen, J., Graham, S.H., Zhu, R.L., Simon, R.P.: Stress proteins and tolerance to focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.*, 16, 566-577 (1996)
45. Pagliaro, P., Gattullo, D., Rastaldo, R., Losano, G.: Ischemic preconditioning from the first to the second window of protection. *Life Sciences.*, 69, 1-15 (2001)
46. Lawson CS and Downey JM.: Preconditioning: state of the art myocardial protection. *Cardiovasc Res.*, 27, 542-550 (1993)
47. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, and Downey JM.: Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*, 84, 350-356 (1991).
48. Auchampach JA and Gross GJ.: Adenosine A1 receptors, KATP channels, and ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol.*, 264: H1327-1336 (1993).
49. Dana A, Baxter GF, Walker JM, and Yellon DM.: Prolonging the delayed phase of myocardial protection: repetitive adenosine A1 receptor activation maintains rabbit myocardium in a preconditioned state. *J Am Coll Cardiol.*, 31: 1142-1149 (1998).
50. Zweier, J.L., Wang, P., Kuppusamy, P.: Direct measurement of nitric oxide generation in the ischemic heart using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 270, 304-307 (1995).
51. Nakanishi, K., Vinten-Johansen, J., Lefer, D.J., Zhao, Z., Fowler III, W.C., McGee, D.S., Johnston, W.E.: Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size. *Am. J. Physiology.*, 263, H1650-1658 (1992).

52. Hartman, J.C., Kurc, G.M., Hullinger, T.G., Wall, T.M., Sheehy, R.M., Shebuski, R.J.: Inhibition of nitric oxide synthase prevents myocardial protection by ramiprilat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 270, 1071-1076 (1994).
53. Williams, M.W., Taft, C.S., Ramnauth, S., Zhao, Z.Q., Vinten-Johansen, J.: Endogenous nitric oxide protects against ischemia-reperfusion injury in the rabbit. *Cardiovasc. Res.*, 30, 79-86 (1995).
54. Bolli, R., Manchikalapudi, S., Tang, X.L., Takano, H., Qiu, Y., Guo, Y., Zhang, Q., Jadoon, A.K.: The protective effect of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is mediated by nitric oxide synthase: evidence that nitric oxide acts both as a trigger and as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning. *Circ. Res.*, 81, 1094-1107 (1997).
55. Takano, H., Tang, X.L., Qui, Y., Guo, Y., French, B.A., Bolli, R.: Nitric oxide donors induce late preconditioning against myocardial stunning and infarction in conscious rabbits via an antioxidant-sensitive mechanism. *Circ. Res.*, 83, 73-84 (1998).
56. Bolli, R., Dawn, B., Tang, X.L., Qiu, Y., Ping, P., Xuan, X.T., Jones, W.K., Takano, H., Guo, Y., Zhang, J.: The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. *Basic. Res. Cardiol.*, 93, 325-338 (1998).
57. Vegh, A., Szekeres, L., Parrat, J.R.: Preconditioning of the ischemic myocardium; involvement of the L-arginine nitric oxide pathway. *Br. J. Pharmacol.*, 107, 648-652 (1992).
58. Williams MW, Taft CS, Ramnauth S, Zhao ZQ, and Vinten-Johansen J.: Endogenous nitric oxide (NO) protects against ischaemia-reperfusion injury in the rabbit. *Cardiovasc Res.*, 30, 79-86 (1995).
59. Banerjee S, Tang XL, Qiu Y, Takano H, Manchikalapudi S, Dawn B, Shirk G, and Bolli R.: Nitroglycerin induces late preconditioning against myocardial stunning via a PKCdependent pathway. *Am J Physiol.*, 277, H2488-2494 (1999).
60. Ping P, Takano H, Zhang J, Tang XL, Qiu Y, Li RC, Banerjee S, Dawn B, Balafonova Z, and Bolli R.: Isoform-selective activation of protein kinase C by nitric oxide in the heart of

conscious rabbits: a signaling mechanism for both nitric oxide-induced and ischemia-induced preconditioning. *Circ Res.*, 84, 587-604 (1999).

61. Miyoshi H, Nakaya Y, and Moritoki H.: Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, 345, 47-49 (1994).

62. Downey JM and Cohen MV.: Signal transduction in ischemic preconditioning. *Adv Exp Med Biol.*, 430, 39-55 (1997).

63. Sasaki N, Sato T, Ohler A, O'Rourke B, and Marban E.: Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation*, 101, 439-445 (2000)

64. Gross GJ and Fryer RM.: Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and myocardial preconditioning. *Circ Res.*, 84, 973-979 (1999).

65. Gross, G.J., Fryer, R.M.: Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and myocardial preconditioning. *Circ. Res.*, 84, 973-979 (1999).

66. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, and Grover GJ.: Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res.*, 81: 1072-1082 (1997).

67. Baines CP, Liu GS, Birincioglu M, Critz SD, Cohen MV, and Downey JM.: Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial K<sup>+</sup> ATP channels and actin cytoskeleton. *Am J Physiol.*, 276, H1361-1368 (1999).

68. Takashi E, Wang Y, and Ashraf M.: Activation of mitochondrial K<sup>+</sup> ATP channel elicits late preconditioning against myocardial infarction via protein kinase C signaling pathway. *Circ Res.*, 85, 1146-1153 (1999).

69. Fryer RM, Hsu AK, Eells JT, Nagase H, and Gross GJ.: Opioid-induced second window of cardioprotection: potential role of mitochondrial K<sup>+</sup> ATP channels. *Circ Res.* 84: 846- 851 (1999).

70. Duncker DJ and Verdouw PD.: Role of K<sup>+</sup> ATP channels in ischemic preconditioning and cardioprotection. *Cardiovasc Drugs Ther.*, 14, 7-16 (2000).
71. Qiu Y, Rizvi A, Tang XL, Manchikalapudi S, Takano H, Jadoon AK, Wu WJ, and Bolli R.: Nitric oxide triggers late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Am J Physiol.*, 273, H2931-2936 (1997).
72. Potoka DA, Nadler EP, Zhou X, Zhang XR, Upperman JS, and Ford HR.: Inhibition of NF-kappaB by IkappaB prevents cytokine-induced NO production and promotes enterocyte apoptosis in vitro. *Shock*, 14, 366-373 (2000).
73. Parratt J and Vegh A.: Pronounced antiarrhythmic effects of ischemic preconditioning. *Cardioscience*, 5, 9-18 (1994).
74. Vegh A, Papp JG, and Parratt JR.: Prevention by dexamethasone of the marked antiarrhythmic effects of preconditioning induced 20 h after rapid cardiac pacing. *Br J Pharmacol.*, 113, 1081-1082 (1994).
75. Vegh A, Gyorgy K, Rastegar MA, Papp JG, and Parratt JR. Delayed protection against ventricular arrhythmias by monophosphoryl lipid-A in a canine model of ischaemia and reperfusion. *Eur J Pharmacol.*, 382: 81-90 (1999).
76. Kaszala K, Vegh A, Papp JG, Parratt JR. Modification by bradykinin B2 receptor blockade of protection by pacing against ischemia-induced arrhythmias. *Eur J Pharmacol.*, 328:51-60, (1997).
77. Bouchard JF, Chouinard J, and Lamontagne D.: Role of kinins in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning. *Br J Pharmacol.*, 123, 413-420 (1998).
78. Bugge E and Ytrehus K.: Endothelin-1 can reduce infarct size through protein kinase C and KATP channels in the isolated rat heart. *Cardiovasc Res.*, 32, 920-929 (1996).
79. Brown JM, Grosso MA, Terada LS, Whitman GJ, Banerjee A, White CW, Harken AH, and Repine JE.: Endotoxin pretreatment increases endogenous myocardial catalase activity and decreases ischemia-reperfusion injury of isolated rat hearts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 2516-2520 (1989).

80. Brown JM, White CW, Terada LS, Grosso MA, Shanley PF, Mulvin DW, Banerjee A, Whitman GJ, Harken AH, and Repine JE.: Interleukin-1 pretreatment decreases ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 87, 5026-5030 (1990).
81. Rowland RT, Cleveland JC, Meng X, Ao L, Harken AH, and Brown JM.: A single endotoxin challenge induces delayed myocardial protection against infarction. *J Surg Res.*, 63, 193-198 (1996).
82. Zacharowski K, Otto M, Hafner G, Chatterjee PK, and Thiemeermann C.: Endotoxin induces a second window of protection in the rat heart as determined by using p-nitro-blue tetrazolium staining, cardiac troponin T release, and histology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 19, 2276-2280 (1999).
83. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, and Yellon DM.: Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation*, 88, 1264-1272 (1993).
84. Hutter MM, Sievers RE, Barbosa V, and Wolfe CL.: Heat-shock protein induction in rat hearts. A direct correlation between the amount of heat-shock protein induced and the degree of myocardial protection. *Circulation*, 89, 355-360 (1994).
85. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, Marty J, Farges O. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. *Ann Surg* 1999; 229:369-375.
86. Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc* 1993; 25:3303-3304.
87. Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpi E, Prats N, Rosello-Catafau J. Liver i preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Биохим Biophys Res Commun* 1996; 229:264-270.
88. Kume M, Yamamoto Y, Saad S, Gomi T, Kimoto S, Shimabukuro T, Yagi T, Nakagami M, Takada Y, Morimoto T, Yamaoka Y. Ischemic preconditioning of the liver in

rats: implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 1996; 128:251-258.

89. Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, Jochum W. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 2003; 238:843-850.

90. Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA. Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg* 2002; 235:400-407.

91. Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, Maeda T, Uchiyama H, Sugimachi K. Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning. *Br J Surg* 1998; 85:1636-1640.

92. Peralta C, Closa D, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Hotter G. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* 1998; 28:768-773.

93. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Contribution of adenosine A<sub>2</sub> 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.

94. Cejalvo D, Lloris-Carsi JM, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA. Effect of adenosine and allopurinol on liver ischemia-reperfusion. *Transplant Proc* 1993; 25:3023-3024.

95. Nakayama H, Yamamoto Y, Kume M, Yamagami K, Yamamoto H, Ki Ishikawa Y, Ozaki N, Shimahara Y, Yamaoka Y. Pharmacologic stimulation of adenosine receptor supplants ischemic preconditioning in providing ischemic tolerance in rat livers. *Surgery* 1999; 126:945-954.

96. Nilsson B, Friman S, Wallin M, Gustafsson B, Delbro D. The liver protective effect of ischemic preconditioning may be mediated by adenosine. *Transpl Int* 2000; 13 Suppl 1:S558-S561.

97. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997; 25:934-937.
98. Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. 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; 29:126-132.
99. Serracino-Inglott F, Virlos IT, Habib NA, Williamson RC, Mathie RT. Adenosine preconditioning attenuates hepatic reperfusion injury in the rat by preventing the down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *BMC Gastroenterol* 2002; 2:22.
100. Howell JG, Zibari GB, Brown MF, Burney DL, Sawaya DE, Olinde JG, Granger DN, McDonald JC. Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions. *Transplantation* 2000; 69:300-303.
101. Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999; 30:1481-1489.
102. Peralta C, Fernandez L, Panes J, Prats N, Sans M, Pique JM, Gelpi E, Rosello-Catafau J. 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; 33:100-113.
103. Funaki H, Shimizu K, Harada S, Tsuyama H, Fushida S, Tani T, Miwa K. Essential role for nuclear factor kappaB in ischemic preconditioning for ischemia-reperfusion injury of the mouse liver. *Transplantation* 2002; 74:551-556.
104. Peralta C, Bulbena O, Bargallo R, Prats N, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Strategies to modulate the deleterious effects of endothelin in hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation* 2000; 70:1761-1770.



105. Peralta C, Bulbena O, Xaus C, Prats N, Cutrin JC, Poli G, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation* 2002; 73:1203-1211.
106. Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 1999; 30:1223-1231.
107. Flecha, B.G., Cutrin, J.C., Boveris, A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J. Clin. Invest.* 1993; 91: 456-464.
108. Gupta, M., Dobashi, K., Greene, E.L., Orak, J.K., Singh, I.: Studies on hepatic injury and antioxidant enzyme activities in rat sub cellular organelles following in vivo ischemia and reperfusion. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1997; 176: 337-347.
109. Katayama, T, Yokoyama, S., Mitomi, T., Watanabe, K.: Alterations in glutathione peroxidase activity following reperfusion injury to rat liver. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 1997; May 22(2): 33-44.
110. Halkos ME, Kerendi F, Corvera JS, Wang NP, Payne CS, Sun HY, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ (2004) Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. *Ann Thorac Surg* 78:961–969
111. Heusch G (2004) Editorial comment: Postconditioning. Old wine in a new bottle? *J Am Coll Cardiol* 44:1111–1112
112. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2004) Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res* 62:74–85
113. Yang X-M, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV (2004) Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signal pathways. *J Am Coll Cardiol* 44:1103–1110
114. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM (2004) Postconditioning: A form of “modified reperfusion” protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res* 95:230–232

115. Galagudza M, Kurapeev D, Minasian S, Valen G, Vaage J (2004) Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm. *Eur J Cardio-thorac Surg* 25:1006–1010
115. Vinten-Johansen J, Zhao Z-Q, Zatta AJ, Kin H, Halkos ME, Kerendi F (2005) Postconditioning: A new link in nature's armor against myocardial ischemia reperfusion injury. *Bas Res Cardiol* 100:1–16
116. Zhao Z-Q, Vinten-Johansen J. Postconditioning: Reduction of reperfusion-induced injury . *Cardiovas Res* 2006;70:200-211
117. Wang N, Ma QJ, Lu JG, Chu YK, Lai DN. Protective effect of ischemic postconditioning on ischemic reperfusion injury of rat liver graft *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2005 Dec 1;43(23):1533-6
118. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbutiric acid relations. *Analytical Biochemistry* 1979, 95:351-358.