

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

KARACİĞERİN REPERFÜZYON HASARINDA UZAK İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA VE DİREKT İSKEMİK ÖNKOŞULLAMANIN ETKİNLİĞİ

Dr. Elvan Şahin

Uzmanlık Tezi

İZMİR, 2007

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

KARACİĞERİN REPERFÜZYON HASARINDA UZAK İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA VE DİREKT İSKEMİK ÖNKOŞULLAMANIN ETKİNLİĞİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Elvan Şahin

Danışman Öğretim Üyesi: Yrd. Doç. Dr. Çimen Olguner

İZMİR, 2007

TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan hocalarım Sayın Prof. Dr. Zahide Elar, Sayın Prof. Dr. Emel Sağıroğlu, Sayın Prof. Dr. Ali Günerli, Sayın Prof. Dr. Atalay Arkan ve Sayın Prof. Dr. Erol Gökel' e;

Tez çalışmamın her anında yanımda olan, desteğini ve güler yüzünü her zaman hissettiğim danışman hocam Sayın Yrd. Doç.Dr. Çimen Olguner' e;

Tezimin her aşamasında benden yardımlarını eksik etmeyen Sayın Prof. Dr. Mustafa Olguner'e;

Uzmanlık eğitimim boyunca, beraber çalıştığım öğretim üyeleri, uzman ve asistan arkadaşlarıma;

Anestezi teknikeri arkadaşlarıma, ameliyathane, yoğun bakım, ağrı ünitesi hemşire ve personeline;

Tanıştığımız andan itibaren iyi-kötü her anımda yanımda olan sevgili dostlarım Gülistan ve Şükran' a;

Hayatımı güzelleştiren ve anlam katan, tüm eğitim hayatım boyunca sevgi ve anlayışlarıyla yanımda olan ve bana destek veren canım aileme;

Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürler.....

Dr. Elvan Şahin

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ-----	i
KISALTMALAR-----	ii
ÖZET-----	1
SUMMARY-----	2
GİRİŞ ve AMAÇ-----	3
GENEL BİLGİLER-----	4
I. İSKEMİ -----	4
II. REPERFÜZYON-----	5
III. KARACİĞER İSKEMİ REPERFÜZYONU -----	6
İskemi reperfüzyon hasarının organ sistemlerine etkileri-----	8
IV. İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA-----	10
İskemik önkoşullamanın mekanizması-----	11
A: DİREKT İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA-----	14
B: UZAK İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA-----	15
GEREÇ ve YÖNTEM-----	17
BULGULAR-----	22
TARTIŞMA-----	26
SONUÇ ve ÖNERİLER-----	31
KAYNAKLAR-----	32
ETİK KURUL İZİN BELGESİ-----	40

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. İskemi reperfüzyon sonrası kapiller damardaki değişiklikler.....	6
Şekil 2. İskemi reperfüzyon hasarı sonrası uzak organ hasar oluşumu.....	9
Şekil 3. İskemik önkoşullamanın mekanizması.....	13
Şekil 4. Ratta İÖK öncesi bacak akımının lazer akımölçerle gösterilmesi.....	18
Şekil 5. Ratın bacak kan akımının kesildiğinin lazer akımölçerle gösterilmesi.....	18
Şekil 6. Ratın karaciğer kan akımının kesilmesi.....	19
Şekil 7. Plazma AST değerleri.....	22
Şekil 8. Plazma ALT değerleri.....	23
Şekil 9. Karaciğer dokusunda MDA değerleri.....	24
Şekil 10. Karaciğer hasarının histolojik görünümü.....	25
Tablo 1. Karaciğer histolojik hasar skorları.....	24

KISALTMALAR

İR	İskemi reperfüzyon
İÖK	İskemik önkoşullama
TNF-α	Tümör nekroz faktör α
IL-6	İnterlökin-6
ATP	Adenin trifosfat
ÇOY	Çoklu organ yetmezliği
SİYS	Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
NO	Nitrik oksit
NADH	Nikotin amid dinükleotid
MDA	Malondialdehit
MPO	Miyeloperoksidaz
AAH	Akut akciğer hastalığı
ARDS	Akut respiratuvar distres sendromu
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
NF-κB	Nükleer faktör- κ B
cGMP	Siklik guanin monofosfat
cAMP	Siklik adenin monofosfat
PKC	Protein kinaz C
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LDH	Laktat dehidrogenaz
CO	Karbonmonoksit
KHHS	Karaciğer histolojik hasar skoru

ÖZET

Karaciğerin reperfüzyon hasarında uzak iskemik önkoşullama ve direkt iskemik önkoşullamanın etkinliği

Dr. Elvan Şahin, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD., İzmir.

Şok, kardiyak arrest, turnike uygulamaları, karaciğerin major cerrahileri ve transplantasyon sonrası ortaya çıkabilen iskemi reperfüzyon hasarı hastalarda ciddi organ yetmezliklerine neden olabilmektedir. Reperfüzyon hasarını azaltmak amacıyla kullanılan yöntemlerden biri iskemik önkoşullamadır. Bu amaçla hem uzak hem de direkt iskemik önkoşullama uygulanabilir. Karaciğerin iskemi reperfüzyon hasarında uzak ve direkt iskemik önkoşullamanın karşılaştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu deneysel çalışmada, ratlarda oluşturulan karaciğer iskemi reperfüzyon hasarına direkt ve uzak iskemik önkoşullamanın etkileri karşılaştırılmıştır.

Her birinde yedi denek bulunan dört grup oluşturulmuştur. Sham grubunda (Grup 1) ratların batinları açılmış, protokol süresince başka işlem yapılmadan beklenmiştir. Grup 2: 25 dk total karaciğer iskemisi sonrası 120 dk reperfüzyon, Grup 3: arka bacağa uygulanan üç döngü iskemik önkoşullama sonrası karaciğerde iskemi reperfüzyon, Grup 4: tek döngü karaciğer iskemik önkoşullaması sonrası iskemi reperfüzyon gerçekleştirilmiştir. Tüm gruplarda ratların anestezi süresi eşit tutulmuş, işlem sonunda ratlar sakrifiye edilmiş, karaciğer enzimleri için kan, malondialdehid düzeyleri ve histopatolojik inceleme için karaciğer doku örnekleri alınmıştır.

Serum AST-ALT değerlerinin sham grubunda diğer üç gruba göre anlamlı düşük olduğu, Grup 3 de 4. ve 2. gruplara göre belirgin düşük olduğu saptanmıştır. Doku malondialdehid düzeyleri sham grubunda anlamlı düşük bulunmuş, diğer gruplar arasında fark saptanmamıştır. Karaciğer histolojik hasar skoru da benzer şekilde sham grubunda diğer gruplara göre ve 3. grupta 4. gruba göre anlamlı düşük olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmada uzak iskemik önkoşullamanın AST-ALT seviyeleri ve karaciğer histolojik hasar skorunu iskemi reperfüzyon ve direkt iskemik önkoşullamaya göre azalttığı gösterilmiştir. Uzak iskemik önkoşullamanın, kolay uygulanabilir noninvaziv bir klinik yöntem olabileceği, bu iki yöntem arasındaki etkinlik ve etki mekanizmaları farklarını araştırmak için deneysel- klinik çalışmalara gereksinim olduğu kanaatine varılmıştır

SUMMARY

Prevention of hepatic ischemi-reperfusion injury with remote ischemic preconditioning and direct ischemic preconditioning

Dr. Elvan Şahin, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Anesthesiology and Reanimation, İzmir

The ischemia reperfusion (IR) injury that can occur after shock, cardiac arrest, major hepatic surgeries and transplantation could cause severe organ failures. One of the technics that can be used to prevent ischemi-reperfusion injury is ischemic preconditioning. Remote and direct ischemic preconditioning could be used for this aspect. We could not find a study that compares remote hepatic ischemic preconditioning with direct ishemic preconditioning. This present study compares the effect of remote and direct ishemic preconditioning in the rat hepatic ischemi-reperfusion injury.

Four groups, each including seven rats were conducted. In the sham group only laparotomy was performed. In the ischemia reperfusion group 25 minutes of total hepatic ischemia was induced followed by 120 minutes of reperfusion. The leg was subjected to three cycles of ischemic preconditioning (IP) before hepatic ischemia reperfusion in the remote IP+IR group. One cycle of hepatic ischemic preconditioning was performed before hepatic ischemia reperfusion in the direct IP+IR group. The length of the experiment groups were same. At the end of the experiment rats were killed, blood and liver samples were collected.

Levels of AST-ALT were significantly lower in the sham group when compared with the other groups, in the remote IP+IR group level of the enzymes were significantly lower compared with the direct IP+IR and IR groups. In the IR, remote IP+IR and direct IP+IR groups, malondialdehyd levels were increased but there were no difference between these groups. The histological score of liver injury was significantly lower in the sham group compared with the other groups and it was also significantly lower in the remote IP+IR group compared with the direct IP+IR group.

This present study has shown that when AST-ALT levels and hepatic histological score is considered, remote ischemic preconditioning decreased the hepatic ischemia reperfusion injury. Remote ischemic preconditioning protected liver from ischemia reperfusion injury better than direct ischemic preconditioning according to the results of this study.

GİRİŞ ve AMAÇ

Karaciğer ile ilgili cerrahi girişimler (*Pringle* manevrası: hepatic arter ve portal venin klempanajı) ve karaciğer transplantasyonu (organ rezeksiyonundan reanastomoz yapılana 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 (İR), doku veya organa giden kan akımında bir süre azalma veya kesilme sonrasında yeniden kanlanma olarak tanımlanır. Kan akımının tekrar başlaması dokulara iskemik hasardan daha fazla zarar verebilmektedir. Bu olay İR hasarı olarak adlandırılmaktadır.

İskemi reperfüzyon hasarından korunmak için değişik yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan biri, ilk kez 1986 yılında Murry ve ark. tarafından kalpte tarif edilen iskemik önkoşullamadır (İÖK) (1). İskemik önkoşullama, kısa iskemik epizodları izleyen reperfüzyon periyodları ile dokunun arkadan gelen uzun süreli iskemiye dayanıklılığını artıran süreç olarak tanımlanmıştır. Amaç, endojen korunma mekanizmalarının harekete geçirildiği bir refleksin başlatılmasıdır. Bir diğer yöntem uzak İÖK' dır. Bir organa uygulanan iskemi reperfüzyon epizodlarının başka bir organda iskemiye karşı dayanıklılığı artırmasına uzak İÖK denilmektedir (2). Ekstremitte veya majör organların iskemi reperfüzyonu farklı organlarda hasara yol açar (3).

Karaciğerde uygulanan İÖK' nın, hepatositler ve sünüzoidal endotel hücrelerinde reperfüzyonla ortaya çıkan inflamatuvar yanıtı baskıladığı öne sürülmektedir. Bu işlemin hepatosellüler ve endotel hücre hasarında azalma; ATP, karaciğer kan akımı ve mikrosirkülasyon artışın yanısıra hepatic intrasellüler oksijenizasyon ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir (4). Karaciğer için önerilen direkt İÖK yönteminin, portal ven ve hepatic arterin 10 dk klempanmasını takibeden 10 dk reperfüzyon olduğu bildirilmiştir (5,6). Bu yöntem kısıtlı sayıda klinik çalışmada da uygulanmıştır (7,8). Uzak İÖK'nın akciğer, beyin, böbrek ve iskelet kasında İR hasarını azaltıcı etkisi gösterilmiştir (1,5,9,10). Ancak ekstremitteye uygulanan İÖK' nın karaciğer İR' sine etkisini gösteren yalnızca bir deneysel araştırmaya ulaşılabilmektedir (11).

Deneysel karaciğer İR modelinde İÖK yöntemlerinin (direkt, uzak) etkinlikleri arasındaki farkı araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Buradan yola çıkarak karaciğere uygulanan direkt İÖK ile ekstremitteye uygulanan (uzak) İÖK' nın, karaciğer İR hasarına etkilerini karşılaştırmak amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Hepatik cerrahi uygulamaları 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 reanastomoz yapılana 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 (İR) hasarı özellikle yandaş karaciğer hastalığı (yağlanma, fibrozis) olanlarda karaciğer yetmezliğine (8); hatta uzun süreli yoğun bakım izlemi gerektirebilecek çoklu organ yetmezliklerine (ÇOY) neden olabilmektedir (3,5,12).

I-İSKEMİ

İskemi, organların kanlanmaması yani oksijen ve besin maddelerinin dokulara yeterli düzeyde ulaşmaması demektir. Bu olay, organı perfüze eden kan akımındaki azalmaya bağlı olarak gelişen geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre zedelenmesine yol açar. İskemi sonrası kan akımının tekrar başlaması (reperfüzyon) paradoksal olarak iskeminin oluşturduğu zararlanmaya ek hasar oluşturur (13).

İskemi-reperfüzyon (İR) lokal-uzak etki ve komplikasyonlara neden olabilen bazı mekanizmaları tetikler (14). İskemik periyod süresince dokuda toksik serbest oksijen radikalleri üretilir. Reperfüzyon sırasında serbest oksijen radikalleri ve süperoksit radikalleri endotelyal hasar, artmış mikrovasküler permeabilite ve doku ödemeine neden olmaktadır (13,14). Ayrıca aktive olan adezyon molekülleri ve sitokinler sistemik inflamatuvar yanıtı başlatabilir. Bu yanıtlar İR hasarı olarak tanımlanır (14).

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' e 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 (15).

Anoksik veya iskemik koşullarda adenozinin ekstrasellüler düzeyi artmaktadır. Bu artış muhtemelen intrasellüler ATP' nin yıkılmasına bağlıdır. İskemi sırasında meydana gelen ATP yıkımı glikolizisi indüklemektedir. Glikolizis ise laktat oluşumunu hızlandırmaktadır (16). Adenozin, A₁ reseptörleri üzerinden sinaptik transmisyonu ve presinaptik Ca⁺², un geçişini inhibe etmekte, K⁺ ilişkili glutamat salınmasını azaltmaktadır (9).

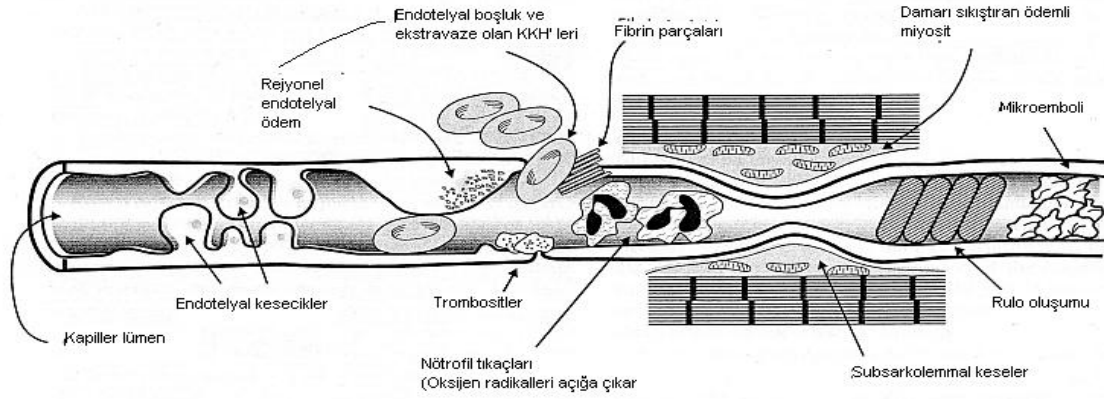
Uzamış hipoksi; membran potansiyeli, iyon geçişi ve endotelial hücrelerin iskelet yapısını bozmakta ayrıca intrasellüler volümü arttırmaktadır. Bu değişiklikler enerji depolarının, prostasiklin ve nitrik oksit (NO) gibi bazı biyoaktif maddelerin yapımının azalması, endotelin ve tromboksan A₂ gibi maddelerin yapımının artması ile birliktedir (3).

II- REPERFÜZYON

Klinik olarak İR hasarı sıklıkla transplantasyon, iskemik serebrovasküler olay (*stroke*), miyokard infarktüsü, şok/resüsitasyon ve turnike uygulamaları sonrasında görülmektedir (17).

Dolaşım tekrar başladığında fazla miktardaki nikotin amid dinükleotid (NADH) O₂ 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 (15).

Araşidonik asitten oluşan lökotrienler trombosit ve lökositlerin, süperoksit ise lökositlerin damar duvarına adezyonunu arttıırırlar (3,13). İnflamatuvar olaylarda salınan tümör nekroz faktör (TNF), İR hasarında önemli yeri olan, mikrovasküler disfonksiyona neden olur. Permeabilededeki artış proteinlerin interstisyuma ekstravaze olmasına neden olmakta, bu da ödemle sonuçlanmaktadır (5). Şekil bozukluğu olan, adezyona ve migrasyona uğrayan lökosit sayısında, İR sonrası çok büyük artışlar olduğu gösterilmiştir (3,13,17). Ayrıca fonksiyonel kapiller damar sayısında azalma olduğu saptanmıştır (13,15) (Şekil 1).



Şekil 1: İskemi reperfüzyon sonrası kapiller damardaki değişiklikler (15)

Damar duvarındaki moleküler ve biyokimyasal değişikliklerin akut inflamatuvar yanıtın karakteristik özellikleri olduğu gösterilmiştir (3).

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 O₂ geldiğinde büyük miktarda süperoksit ve hidrojen peroksit üretimine neden olmaktadır (3,18).

III- KARACİĞER İSKEMİ-REPERFÜZYONU

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 artış ve hücre lizisi ile ilişkilidir. Komplemanın klasik yolunu başlıca aktive edenler IgG ve IgM antikor-antijen kompleksidir. Ayrıca sitokinler, intrasellüler proteinlerin serbestleşmesi ve reaktif oksijen ürünleri kompleman aktivasyonunda rol oynuyor olabilirler (19).

Serbest radikaller hücrede sarkolemma, sarkoplazmik retikulum ve ekstrasellüler kollajen matriks veya kontraktıl proteinler gibi organellerde bozukluklar, bunları takiben kalsiyuma bağlı mekanizmalarda bozukluklar oluşturur. Serbest sitozolik kalsiyumun artışı protein kinazları, fosfolipazları ve diğer yıkıcı enzimleri aktive eder ve subsellüler hasarın artmasına yol açmaktadır. Aşırı Ca^{+2} yüklenmesi, oksijen radikalleri ile başlayan hasarı arttırır (20).

Oksidatif stres hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna neden olur ve diyen konjugatları ile malondialdehit (MDA) açığa çıkar (21). Serbest radikallerin en zararlı etkileri lipid peroksidasyonudur. Hücre membranı poliansatüre yağ asitleri ve fosfolipidlerden oluşur. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonunu başlatarak hücrenel hasara neden olur. Lipid peroksidasyonu, lipid molekülündeki iki ansatüre bağ arasında yer alan metilen grubundan hidrojen atomunun ayrılması ile başlayan kompleks bir zincir reaksiyonudur. Oksijenin yer aldığı yeni karbon merkezli lipid serbest radikalleri, lipid hidroksiperoksit veya lipid peroksit'i oluşturur. Ortaya çıkan lipid hidroperoksitler ve diğer konjuge lipid hidroperoksitlerin diyenleri yapısal değişikliğe uğrayarak, alkanal, alkenel, hidroksialkenal, malondialdehid (MDA) ve volatil hidrokarbonları içeren birçok ürünü oluşturur. Lipid peroksidasyonu hücre hasarında serbest radikallerin rolünü araştıran çalışmalarda ilk olarak incelenen reaksiyondur (22).

Hücre membranlarının hasarlanması hepatositlerin homeostazını bozarak apoptoz veya nekroza neden olmaktadır (21).

Büyük miktardaki serbest radikaller ve hızlı kan akımı tromboz riskini arttırır, bu da karaciğer hücre hasarının büyümesine neden olabilir (21). Mikrodolaşımdaki bozukluğın sinuzoidal endotelial hücre hasarı ve endotelin ve NO gibi vazodilatatör ve vazokonstriktör moleküller arasındaki dengesizliğe bağlı olduğu düşünölmektedir (3,23).

Karaciğerde İR hasarı iki fazda meydana gelmektedir: 1) Erken faz (0–2 saat); Ca^{+} artışı ve serbest O_2 radikallerinin 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 arttırdığı gösterilmiştir. İskemi boyunca hücrede Ca^{+} artışı saptanmazken reperfüzyon sırasında hızlı bir (reperfüzyonun birinci dk'ında Ca^{+} miktarı iki katına çıkmaktadır) Ca^{+} artışı gözlenmektedir.

2) Geç faz (6–48 saat); nötrofillerin, makrofajların, lenfositlerin ve trombositlerin karaciğere göçü ile inflamasyon yanıtı uyarılmakta ve sinüzoidal kan akımında değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Hepatositlerdeki hasar serbest O₂ radikalleri ve ekstrasellüler sitokinler ile meydana gelmektedir (24).

Karaciğer iskemisini takiben sinüzoidal hücre apoptozu reperfüzyon sonrasında hızla ortaya çıkmaktadır (30 dk). Hepatosit apoptozu ise 240 dk reperfüzyon sonrasında gösterilmiştir (25).

Karaciğerde İR hasarı, akımın geçici olarak kesildiği karaciğer rezeksiyonlarında, karaciğer cerrahisinde intraoperatif kan kaybını azaltmada ve karaciğer transplantasyonunda ortaya çıkmaktadır (4). Karaciğer transplantasyonunda, alınan karaciğerin fonksiyon kaybının en önemli nedenlerinden biri İR hasarıdır (5).

Karaciğerdeki İR hasarı kolestazi indüklemekte bu da erken ve genellikle geçici olarak safra sekresyonunda azalmaya neden olmaktadır. Safra akımındaki bu değişiklikler artmış ALT ve AST düzeyleri, karaciğer miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ve serum bilirubin değerleri ile beraberdir. Bu değişikliklerin 1–3 gün içinde geri dönüşümlü olabileceği bulunmuştur (24).

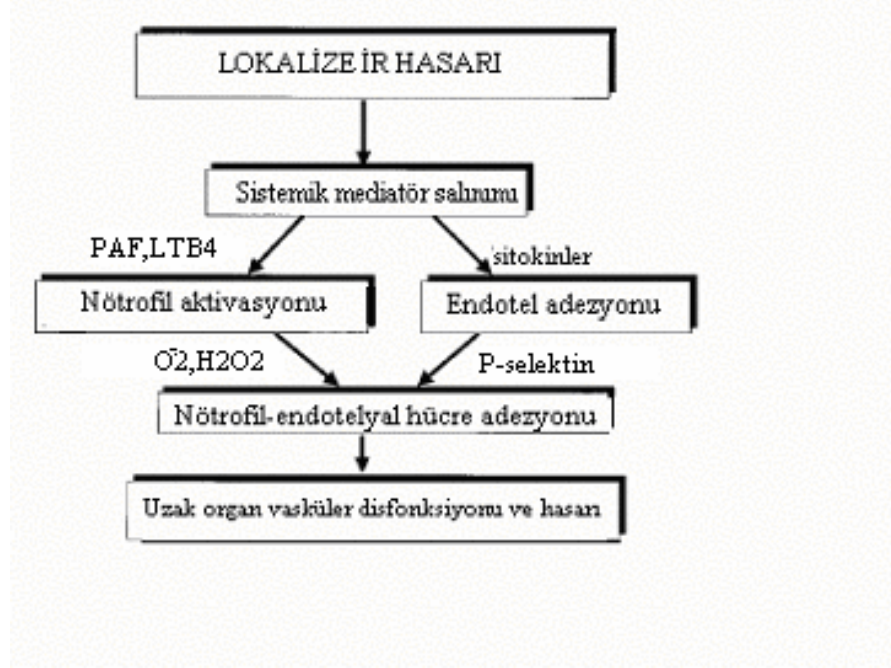
Karaciğer reperfüzyonu sırasında meydana gelen splanknik konjesyon sonucu barsak ve dalaktan salınan proinflamatuvar maddelerin sistemik dolaşıma karışması ile karaciğer ve akciğer hasarı tetiklenmektedir (26).

İskemi reperfüzyon hasarının organ sistemlerine etkileri

Postiskemik 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 sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIYS) veya ÇOY ile sonuçlanabilmektedir. Barsak, karaciğer ve iskelet kası reperfüzyonu sonrası ortaya çıkan ÇOY, ölüme neden olabilmektedir (3).

Nötrofiller süperoksit ve H₂O₂ ile Cl⁻ iyonlarından hipoklorik asit oluşumunu katalize eden MPO enzimini üretmektedirler. Aktive nötrofiller ise endotelial bazal membranı yıkabilecek potent proteazlar üretmektedirler. İskemik alana gelen lökositler aktive olarak reperfüzyon ile dolaşıma katılmaktadırlar. İnflamasyon sırasında ortaya çıkan adezyon moleküllerinden P-selektin lökosit/endotelial hücre etkileşimini artırır (3,12,17). Aktive

lökositler İR ilişkili uzak organ hasarında rol almaktadırlar (3,12,23). Uzak organlardaki İR hasarının mekanizması Şekil 2' de gösterilmiştir.



Şekil 2: İskemi reperfüzyon hasarı sonrası uzak organ hasarı oluşumu. PAF: Trombosit aktive edici faktör, LTB₄: Lökotrien B₄, O₂⁻, H₂O₂: O₂ radikalleri (3)

İskemi reperfüzyon sonrası görülebilen ÇOY, iskemik olaydan 24–72 saat sonra ortaya çıkan akciğer yetmezliği ile başlamaktadır. Akciğer yetmezliği akut akciğer hasarı (AAH) gibi ılımlı bir tablodan akut respiratuvar distres sendromu (ARDS) gibi ciddi bir tabloya kadar değişkenlik gösterebilir (3).

Kardiyak cerrahi sırasındaki İR hasarı sistemik inflamatuvar yanıt, miyokard ve akciğer endotel disfonksiyonu ile ilişkilidir (27). Alt ekstremitenin İR' inden sonra ARDS ortaya çıkabilmekte (28) ve solunum yetmezliğini takiben hepatik, renal, gastrointestinal, santral sinir sistemi ve kalp yetmezliği gelişebilmektedir (3).

Transplantasyon sonrası karaciğerin fonksiyonel olamamasının başlıca nedenlerinden biri de hızlı gelişen akciğer yetmezliğidir. Karaciğer İR' si sonrası görülen akciğer yetmezliğinin nedeninin karaciğerden salınan sitokinler olduğu düşünülmektedir. TNF- α ' nın

hem karaciğer hem de akciğerde hasar oluşturduğu gösterilmiştir. Ratlarda oluşturulan normotermik karaciğer İR modelinde akciğerlerde interstisyel inceltme ve lökosit infiltrasyonu ile karakterize değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Vücudun en büyük sabit makrofaj kaynağı olan Kupffer hücreleri, İR sırasında artan TNF' nin en önemli kaynağıdır (5). Ciddi hepatik İR hasarında artmış Kupffer hücre aktivasyonuna bağlı NO inhibisyonunun akut akciğer hasarına neden olduğu saptanmıştır (11).

Karaciğer İR sonrası pankreasta orta-ciddi düzeyde polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu ve ciddi interstisyel ödem, barsakta epitelyal vililerde bozulma, hemoraji ve mukozada nötrofil infiltrasyonu saptanmıştır (12). Barsakta perfüzyonun bozulmasının endotelin ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (23). Enterik iskemi intestinal mukoza bariyer bütünlüğünü bozmakta, bu da enterik bakterilerin ve lipopolisakkaridlerin barsak lümeninden mezenterik lenf nodlarına ve portal kan akımına geçmesine neden olmaktadır (3). Alt ekstremitte İR' si barsak mukozasındaki bağlantıları bozarak endotoksemiye neden olabilmektedir. Endotoksinler koagülasyon kaskatını, nötrofilleri ve proinflatuar sitokinlerin üretimini aktive etmektedir (28).

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 komplikasyona yol açabilir (10,29,30). Kas iskemisi sonrası aktive olan adezyon molekülleri ve sitokinler SİYS' yi başlatabilmektedirler. Aktive olan lökosit ve sitokinlerin ana hedeflerinden biri akciğerdir (14). Alt ekstremitedeki İR hasarı hepatik yetmezliğe neden olabilmektedir (28).

IV- İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA

Uzun bir iskemi döneminde oluşan hücre hasarını azaltmak amacıyla iskemi öncesinde uygulanan kısa iskemi reperfüzyon periyodları iskemik önkoşullama olarak tanımlanır (20). İlk olarak, dört kısa iskemi reperfüzyon periyodunun köpek miyokardlarında meydana gelen iskemik hasarı azalttığını gösterilmiştir (1).

İskemik önkoşullamanın ilk olarak tanımlandığı kalpte 40 dk' lık tek bir iskemiyi 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 (1).

İskemik önkoşullamanın 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 (31). Döngü sayısı, İÖK'nin oluşturduğu korumanın etkinliği ile ilişkili bulunmuştur. İskelet kasında yapılan çalışmalarda üç döngü ile en iyi sonuç alınmıştır (10).

Başta kalp (1) olmak üzere akciğer (5,14), karaciğer (4,32), kas (29,10), böbrek (33), medulla spinalis (34), beyin (9,35) ve barsaklarda (36) İR hasarının azaltılmasında İÖK araştırılmış ve etkili olduğu saptanmıştır.

İskemik önkoşullamanın mekanizması

Hepatik iskemik önkoşullama ilk olarak 1993' te Lloris-Carsi ve ark. tarafından rat karaciğerinde uygulanmıştır. 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 gösterilmiş (4). Takip eden çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur (37).

Hepatik İÖK' nin hepatosellüler hasarda (18,32), TNF- α (5,38) ve IL-6 salınımında (38), lökosit- endotel hücre etkileşiminde (17), endotel hücre hasarında, hepatosellüler apoptozda (39), uzak organ hasarında (12) azalma ve doku ATP düzeyinde (16,37), periferik karaciğer kan akımında, mikrosirkülasyonda (40), hepatic intrasellüler oksijenizasyonda artma sağladığı gösterilmiştir.

Karaciğerde hasar göstergesi olarak AST, ALT düzeyleri ve histolojik inceleme kullanıldığında 90 dk' ya kadar uzayan iskemide 10 dk iskemiye takiben yapılan 10 dk' lık reperfüzyonun uygulandığı tek döngü İÖK' nin etkili ve yeterli olduğu savunulmuştur (31). Klinik bir çalışmada ise klasik olarak 60 dk kabul edilen güvenli maksimal karaciğer normotermik iskemi süresinin İÖK ile 120 dk' ya kadar uzatılabileceği gösterilmiştir (41).

Karaciğerdeki İÖK' nin adenosin (17,31,32,42), protein kinaz C (PKC) (43-45), NO (31,32,40), ısı şok proteinleri (46), tirozin kinazlar (47), mitojen-aktif protein kinazlar (45), oksidatif stres (48,49), nükleer faktör κ B (NF- κ B) (50) ve apoptoz kaskadının düzenlenmesi (39,51) ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. (Şekil 3)

Adenozin gibi çeşitli mediyatörler ve ikincil mesajcı sistemlerin aktivasyonu ile İÖK' nin etkisi görülmektedir (52). Bu hemen başlayan etki birkaç saat içinde sona ermekte, ancak 24 saat sonra koruyucu proteinlerin uyarılması ile (53) yeni bir koruma sistemi ortaya çıkmakta ve etkisi 48–72 saat sürmektedir (54).

Önkoşullamanın hem cGMP hem de cAMP düzeylerinde artışa neden olduğu gösterilmiş, bu nedenle de İÖK' da tetikleyici bir rolleri olabileceği düşünülmüştür (55).

Dokuda İÖK sonrası ATP' nin stabil kaldığı, adenozin, ksantin ve inozinin ise arttığı bulunmuştur (18). Başka bir deneysel çalışmada ise İÖK grubunda reperfüzyon sonrası ATP' de hızlı bir artış olduğu saptanmıştır (37).

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 (16).

Rat ince barsağında, İÖK' nin lökositlerin inflamasyon alanına yönelmesinde etkili olan P-selektinin artışını ve böylece nötrofil adezyonunu önlediği bulunmuştur (36). Bir deneysel çalışmada İR sonrası karaciğerdeki P-selektin düzeyinde değişiklik olmadığı ancak diğer organlarda (akciğer, mide, pankreas, ince barsak ve kolon) düzeyinin arttığı, MPO aktivitesinin ise hem karaciğer hem de diğer organlarda arttığı ve İÖK' nin bu artışı engellediği saptanmıştır. İskemik önkoşullama uzak organlardaki hasarı, TNF aracılı P-selektin artışını bloke ederek önlemektedir (12) (Şekil 3).

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

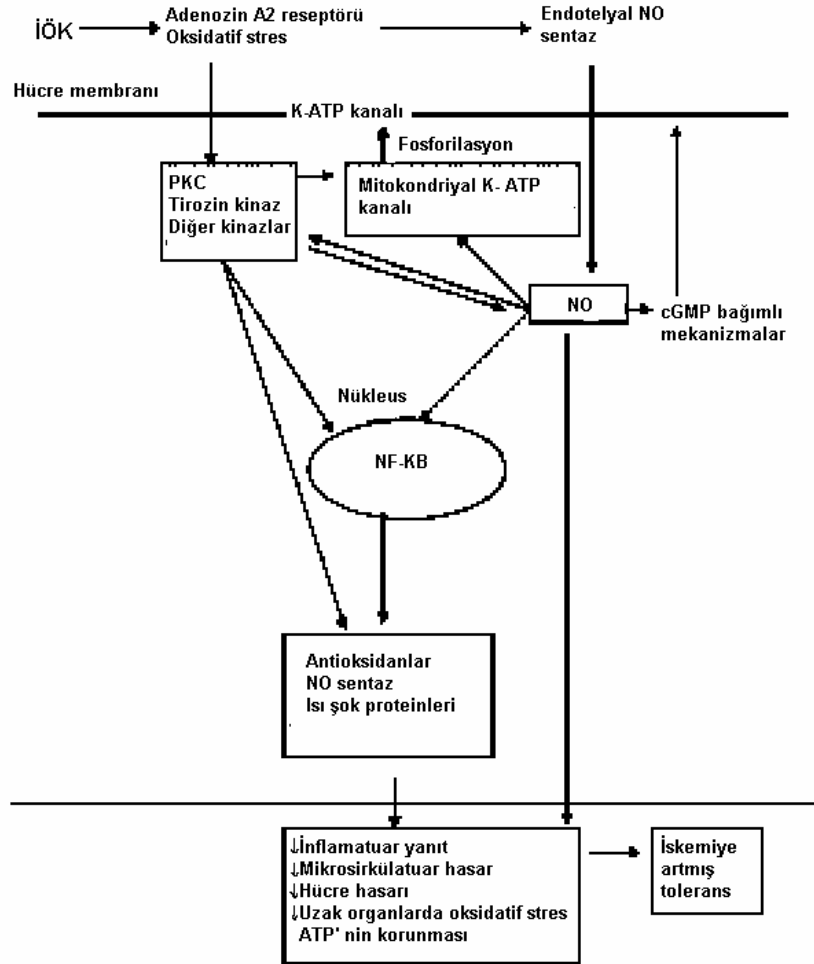
Adenozin:

Adenozin, İÖK' da hem tetikleyici hem de mediyatör olarak görev yaptığı düşünülen ekstrasellüler bir moleküldür. İskemi sırasında ATP adenozine yıkılır (4). Hem adenozin hem de NO vasküler endotelde sentez edilir ve İR periyodları sırasında vasküler ve interstisyel kompartmana salınırlar (32). Adenozin lökosit adezyonunu, nötrofil ve platelet fonksiyonunu, serbest radikal oluşumunu inhibe eder ve adezyon moleküllerinin oluşumunu azaltır (4,17).

Potent bir vazodilatatör olan adenozin aynı zamanda endotelial hücrelerden NO sentezini uyarmaktadır (32). Ancak, kısa yarılanma ömrü ve belirgin kardiyovasküler yan etkileri klinik uygulamayı sınırlamaktadır (17).

Adenozinin İÖK' daki etkinliğini saptamak için yapılan deneysel çalışmalarda İR uygulanan deneklere adenozin verildiğinde reperfüzyon sonunda karaciğer kan akımının arttığı gösterilmiştir. Aynı amaçla İÖK uygulanan deneklere adenozin yıkımında rol alan adenozin deaminaz (ADA) verildiğinde karaciğer kan akımının İÖK grubundakilerden daha düşük olduğu bulunmuştur (31).

Adenozinin A1 reseptörleri miyokarda bulunurken A2 reseptörleri karaciğer yerleşimlidir. A2 reseptörü bloke edildiği zaman İÖK' nın rat karaciğerindeki koruyucu etkisinin kalktığı gösterilmiştir (31,32,42). A2 reseptör aktivasyonunun sinüzoidal endotelial hücrelerde cAMP düzeyini arttırdığı bunun da İÖK' nın koruyucu mekanizmalarından biri olduğu gösterilmiştir (42). A2 reseptör antagonisti verildiğinde hepatik İÖK' nın hemen ardından meydana gelen NO düzeyindeki artmayı önlediği saptanmıştır (31).



Şekil 3: İÖK' nın mekanizması. PKC: Protein kinaz C, NO: Nitrik oksit, NF-κB:nükleer faktör κB (4)

Protein kinaz C (PKC):

İskemik önkoşullama sırasında PKC aktive olmaktadır. Protein kinaz C' nin kardiyoprotektif etkileri mevcuttur ayrıca aktivasyonu NO sentaz gibi proteinlerin sentezini arttırmaktadır (13).

Yapılan deneysel çalışmalarda, izole edilmiş rat hepatositlerindeki İÖK' nın koruyucu etkisinin PKC, seleritrin ile inhibe edildiğinde ortadan kalktığını gösterilmiştir (13,43,44).

Isı şok proteinleri:

Isı şok proteinleri hipertermi ve iskemi sonrası arttığı gösterilen intrasellüler stres proteinleridir (4). Rat karaciğerinde iskemik hasara tolerans çeşitli ısı şok proteinleri ile ilişkilendirilmiştir (56,57). Ishikawa ve ark (46) ısı şoku önkoşullaması yapılan rat karaciğerlerinde, ısı şok proteinlerinin iskemi sırasında mitokondriyal membran bütünlüğünü koruduklarını, reperfüzyon sırasında ise yüksek enerjili fosfatlar oluşturduklarını böylece iskemik toleransa katkıda bulduklarını saptamışlardır.

Nitrik oksit (NO):

Nitrik oksit, NO sentaza bağlı NADPH ile L-arjininin L-sitrullin' e dönüşümü ile ortaya çıkan fizyolojik bir maddedir. Hepatik mikrosirkülasyonu düzenlemede NO' nun rolü vardır (58). Platelet agregasyonunu inhibe eder, vazodilatör tonusu korur ve hem nötrofil hem de trombositlerin vasküler endotele adezyonunu inhibe eder (13). Adenozin ilişkili vazodilatasyonun en önemli mediyatörünün NO olduğu gösterilmiştir (32). Rat karaciğerindeki İÖK' nın NO' in endotelin üzerindeki inhibitör etkisi ile ilişkili olduğunu belirtilmiştir (4).

A: DİREKT İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA

Direkt iskemik önkoşullama, iskemi uygulanacak organa uzun süreli iskemi öncesi kısa süreli iskemi reperfüzyon periyodlarının uygulanmasıdır.

Arka bacak kas arterlerinin klemplenmesi ile uygulanan 3 döngü 10' ar dk' lık İR' nin, takip eden uzun iskemi sonrası oluşan kas nekrozunu %44–62 oranında azalttığı gösterilmiştir. Bu koruyucu etkilerine rağmen İÖK' nın, uzayan operasyon zamanı ve tekrarlayan klemplemeler sonrası damarın hasarlanma riski nedeniyle klinikte bu yöntem

uygulanmamaktadır. Bu nedenle turnike ile noninvaziv İÖK uygulaması gündeme gelmiştir (29).

Karaciğerde direkt İÖK üç farklı yöntemle uygulanabilir; 1) Sağ lob düzeyinde hepatik arter ve portal venin klemlenmesi (5,12,16,18, 31,32), 2) Sol lob düzeyinde hepatik arter ve portal venin klemlenmesi (17,21,51), 3) Karaciğere giriş yerinde hepatik arter ve portal venin klemlenmesi (*Pringle* manevrası) (7,8). Birçok hayvan modelinde mezenterik konjesyondan korunmak için portal kan akımı parsiyel olarak kesilmektedir, ancak bu yöntem klinik kullanımla uyumlu değildir (11).

Hepatektomi geçiren hastalarda direkt İÖK' nın etkilerinin araştırıldığında, İÖK uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında cerrahi süresi, kan kaybı ve sistemik arteriyel basınçları arasında fark gözlenmemiş ancak İÖK grubunda karaciğerde reperfüzyon hasarının kontrol grubuna göre daha az olduğu saptanmıştır (7). Başka bir klinik çalışmada iskemi süresi uzadıkça İÖK' nın etkisinin daha belirgin olduğu gösterilmiştir (8).

İskemik periyod süresinin de İÖK' da önemli olduğu ileri sürülmektedir. Uzun karaciğer (90 dk) iskemisi öncesinde iki, beş, 10, 15, 20, 30 dk' lık iskemiye takiben 10 dk' lık reperfüzyon periyodları ile İÖK oluşturulmuştur. On ve 15 dk iskemi gruplarında iskemik hasar belirgin olarak azalmışken, 20 ve 30 dk' lık iskemilerde adenozinin yüksek olmasına rağmen İÖK' nın koruyucu etkileri görülmemiştir. Bu sonuç İÖK' daki uzun iskemi süresinin koruyucu etki oluşturmadığını düşündürmüştür (18).

B: UZAK İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA

Bir organa uygulanan iskemi reperfüzyon epizodları başka bir organda iskemiye karşı dayanıklılık sağlamaktadır; bu yöntem uzak İÖK olarak adlandırılır (2). Uzak İÖK ilk olarak 1993' te kalpte gösterilmiştir (59). Deneysel ve klinik araştırmalar kalbe uygulanan İÖK' nın kalp dışında akciğer ve diğer organlarda İR hasarını azalttığını göstermiştir (60,61).

Cheung ve ark (27) kardiyak cerrahi geçiren çocuklarda, alt ekstremiteye uygulanan İÖK' nın (dört döngü beşer dk' lık) miyokard fonksiyonuna etkilerini araştırmışlar ve uzak İÖK grubunda miyokard fonksiyonunun daha iyi, miyokard hasarının ise daha az olduğunu bulmuşlardır. Başka bir çalışmada kısa periyodlar halindeki ekstremitte iskemisinin miyokarddaki enfarkt alanını %50 oranında azalttığı gösterilmiştir (60).

Renal arter İÖK ile miyokarddaki koruyucu etkinin araştırıldığı bir çalışmada oluşan koruyucu etkinin adenozin reseptör antagonisti ile ortadan kalktığı bulunmuştur (2). Uzak İÖK' nin mekanizmasında adenozin, bradikinin, norepinefrin ve ATP bağımlı K⁺ kanallarının rol oynadığı düşünülmektedir (60).

Kharbanda ve ark. (60) yaptığı deneysel çalışmada alt ekstremiteye uygulanan beş dk' lık dört döngü İÖK' nin miyokard iskemisi sonrası ejeksiyon fraksiyonundaki azalmayı belirgin olarak önlediği ve miyokard infarkt alanını anlamlı olarak küçülttüğünü bulmuştur.

Harkin ve ark (62) bilateral, Olguner ve ark (14) ise tek taraflı uygulanan alt ekstremitte İÖK' nin akciğerde oluşan İR hasarını engellediğini göstermişlerdir.

Karaciğer İÖK' sının böbrek iskemisi üzerine etkileri araştırılan deneysel araştırmada, İÖK uygulanan hayvanlarda lipid peroksidasyonunun uygulanmayanlara göre daha düşük olduğu bulunmuştur (33). Bu olumlu etkinin NO ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (11). Uzak İÖK' nin miyokard koruyucu etkisinin muhtemelen otonom sinir sistemi ve/veya hormonal faktörler ile olduğu belirtilmiştir (52). İskelet kasının İÖK' da 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 (29).

Kanoria ve ark.' larının (11) rat bacağına uygulanan üç döngü 10 dk iskemi 10 dk reperfüzyon şeklinde yaptıkları uzak İÖK' nin karaciğer İR hasarına etkisini inceledikleri çalışmalarında iki saat reperfüzyon sonunda İR grubunun ortalama arter basınçları ve saturasyonları (FiO₂ artırılmış olmasına rağmen) anlamlı olarak İÖK grubundan daha düşük olarak bulunmuştur.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma; DEÜTF DeneY Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu izni alındıktan sonra, 28 adet erişkin erkek Wistar-Albino rat (200–300 gr) kullanılarak DEÜ Multidisipliner DeneY Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. DeneY hayvanları, çalışma başlangıcına kadar adaptasyonlarının sağlanması için 12 saat aydınlık- 12 saat karanlık ortamda tutulmuş, standart yiyecek ve suyla beslenmişlerdir.

Cerrahi işlemden 12 saat önce sadece su içmelerine izin verilmiştir. Anestezi, intraperitoneal ketamin 80 mg/kg (Ketalar®) ve 5 mg/kg ksilazin (Rompun®) ile sağlanmış, gerektiğinde dozlar tekrarlanmıştır. Denekler biyokimyasal tetkikler için total kan hacimleri toplandığında sakrifiye olmuşlardır.

DeneY grupları ve protokol

Dört grup oluşturulmuştur.

Grup 1 (sham, n=7): Laparotomi sonrası hepatik pedikül görüldükten sonra müdahale yapılmadan Grup 3 süresi kadar (210 dk) anestezi altında bekletilmiştir.

Grup 2 (İskemi-reperfüzyon, İR, n=7): Laparotomi sonrasında karaciğere 25 dk total iskemi sonrasında 2 saat reperfüzyon uygulanmıştır.

Grup 3 (Uzak iskemik önkoşullama + iskemi reperfüzyon, UİÖK+İR, n=7): Sol arka bacağa üç döngü, 10 dk iskemi ve 10 dk reperfüzyon uygulanmış, beş dk sonra Grup 2 deki işlemler tekrarlanmıştır.

Grup 4 (Direkt iskemik önkoşullandırma + iskemi reperfüzyon, DİÖK +İR, n=7): Bu grupta karaciğere 10 dk iskemi 10 dk reperfüzyon uygulandıktan beş dk sonra Grup 2 deki işlemler tekrarlanmıştır.

Tüm gruplarda toplam çalışma süreleri eşit tutulmuş, kan ve doku örnekleri çalışma sonunda alınmıştır.

Deneysel uzak iskemik önkoşullama yöntemi

Sol arka bacak kasık bölgesinden elastik bandaj (bir cm eninde ve 30 cm boyunda) ile çepeçevre basınç uygulanarak üç döngü halinde 10 dk iskemi oluşturulmuş takiben 10 dk reperfüzyona izin verilmiştir (11). Kan akımının kesilmesi lazer akımmölçer (Laser Flo BPM2, Vasamedic, USA) ile doğrulanmıştır (Şekil 4-5).



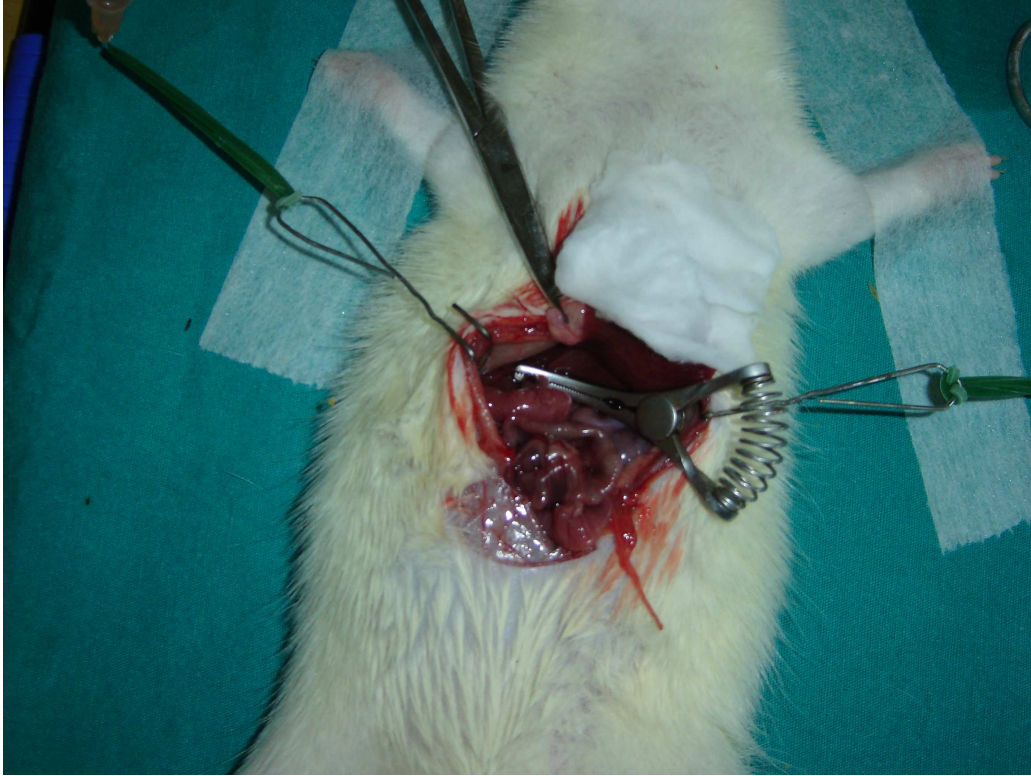
Şekil 4. Ratta İÖK öncesi bacak akımının lazer akımölçerle gösterilmesi



Şekil 5. Ratın bacak kan akımının kesildiğinin lazer akımölçerle gösterilmesi

Deneysel iskemi – reperfüzyon ve direkt iskemik önkoşullama yöntemi

Supin pozisyonda orta hat karın kesisi ile müdahale edilmiş, mikro damar klempini ile hepatik pedikül sıkıştırılarak karaciğere giden portal ven ve arter akımı engellenmiştir. Direkt önkoşullama amacıyla 10 dk iskemi 10 dk reperfüzyon gerçekleştirilmiştir. Sonrasında uzun iskemi olarak 25 dk'lık klempaj ve ardı sıra iki saat boyunca reperfüzyon sağlanmıştır. (Şekil 6)



Şekil 6. Ratın karaciğer kan akımının kesilmesi

Deneklerin vücut sıcaklıklarını 36.8-37.5 C° arasında tutmak amacıyla çalışma süresince operasyon masası ısıtılmış, ortam ısı sabit tutulmuştur.

Çalışma sonunda, anestezi altındaki ratların sağ atriumundan enjektör ile kan örneği alınmış ve daha sonra karaciğer çıkarılmıştır. Kan örnekleri santrifüj edilip -20 derecede saklanmıştır. Doku örnekleri sıvı nitrojende dondurularak -80 derecede depolanmıştır. Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) ve histolojik karaciğer hasarı, plazmada AST, ALT düzeyleri değerlendirilmiştir.

Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Kan alımını takiben serum örneği, kan pıhtılaştıktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüje edilmesiyle elde edilmiş, serum örnekleri ölçümler yapılana kadar -20 C°'de

saklanmıştır. Serum AST, ALT seviyeleri, DEÜTF Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nda "Roche Cobos İntegra 800 (Amerika)" kullanılarak ölçülmüştür.

Karaciğer Dokusunda HPLC Yöntemi ile MDA Ölçümü

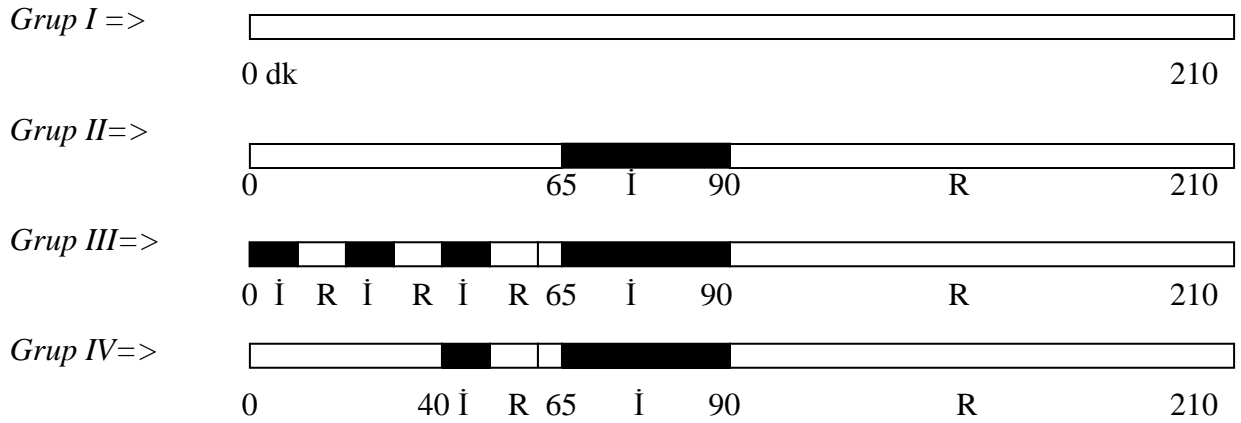
Doku homojenizati hazırlamak için alınan karaciğer dokusu % 0.9' luk NaCl ile yıkanıp, kurulandı. Yüz mg doku örneği 900 µL %1.15 KCl de homojenize edildi. Santrifüj sonrası 2.8 mmol/L BHT, %8,1 SDS, 8 g/L TBA + Asetik asit karışımı ile işlemlenen örnekler 95 °C'de 1 saat bekletilip buz üzerinde soğutuldu. Ortama butanol: piridin (15:1) eklendi, 1 dk vortekslenerek karıştırıldı. Renkli üst (organik) faz küçük tüplere alındı ve 10,000 rpm'de 5-10 dakika santrifüj edildi. 150–4,6 mm, C18 100–5 (Macherey-Nagel) özelliklere sahip kolon kullanıldı. Mobil faz için: KH₂PO₄, 0,6805g/500 mL %30 metanol (0,01M) , K₂HPO₄, 0,8709g/500 mL %30 metanol (0,01M) içerecek biçimde hazırlandı. Mobil fazın akış hızı 0,8 mL/ dk, enjeksiyon hacmi 5µL, kolon fırını sıcaklığı 30 °C olacak şekilde hazırlandı. Floresan detektörün eksitasyon dalga boyu 515 nm, emisyon dalga boyu ise 553 nm olarak ayarlandı. Sonuçlar daha önce çalışılan standartlara göre değerlendirildi

Karaciğer Hücre Histolojisinin Değerlendirilmesi

Karaciğer örnekleri DEÜTF Hastanesi Patoloji Laboratuvarı'nda incelendi. %10' luk formalinde fikse edilmiş ve parafine gömülmüş olan karaciğer örneklerinden beş 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. Değerlendirmede DEÜTF Patoloji AD tarafından geliştirilen Karaciğer Histolojik Hasar Skoru (KHHS) kullanıldı. KHHS da 0: hasar yok ya da minimal hasar, 1:hafif hasar, 2:orta hasar, 3:şiddetli hasar şeklinde derecelendirildi (70).

İstatistik: Gruplar arası değerlendirmeler tek yönlü varyans analizi ve Kruskal-Wallis test, histopatolojik veriler X² ve Mann-Whitney U testleri ile karşılaştırılmış, p <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Çalışma gruplarının şematik görünümü



İ => İskemi

R => Reperfüzyon

Grup I => Sham, n=7

Grup II => İskemi- reperfüzyon (İR), n=7

Grup III => Uzak iskemik önkoşullama ve iskemi reperfüzyon (UİÖK+İR), n=7

Grup IV => Direkt iskemik önkoşullama ve iskemi reperfüzyon (DİÖK+İR), n=7

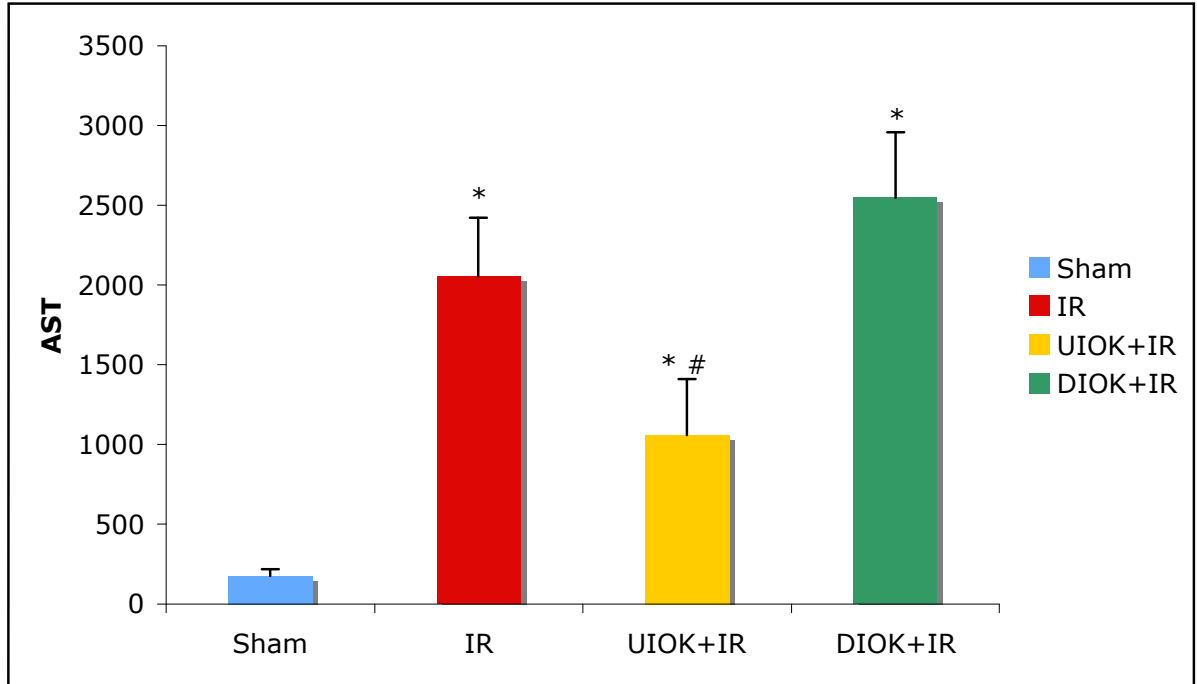
BULGULAR

DEÜTF Deneysel Hayvanı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen çalışmaya toplam 28 rat dahil edilmiştir. Uzak İÖK + İR grubunda induksiyon sonrası ölen bir rat çalışma dışı kalmış, diğer denekler protokolü tamamlamıştır.

Plazma AST, ALT ve doku MDA düzeyleri grafiklerde ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir.

AST:

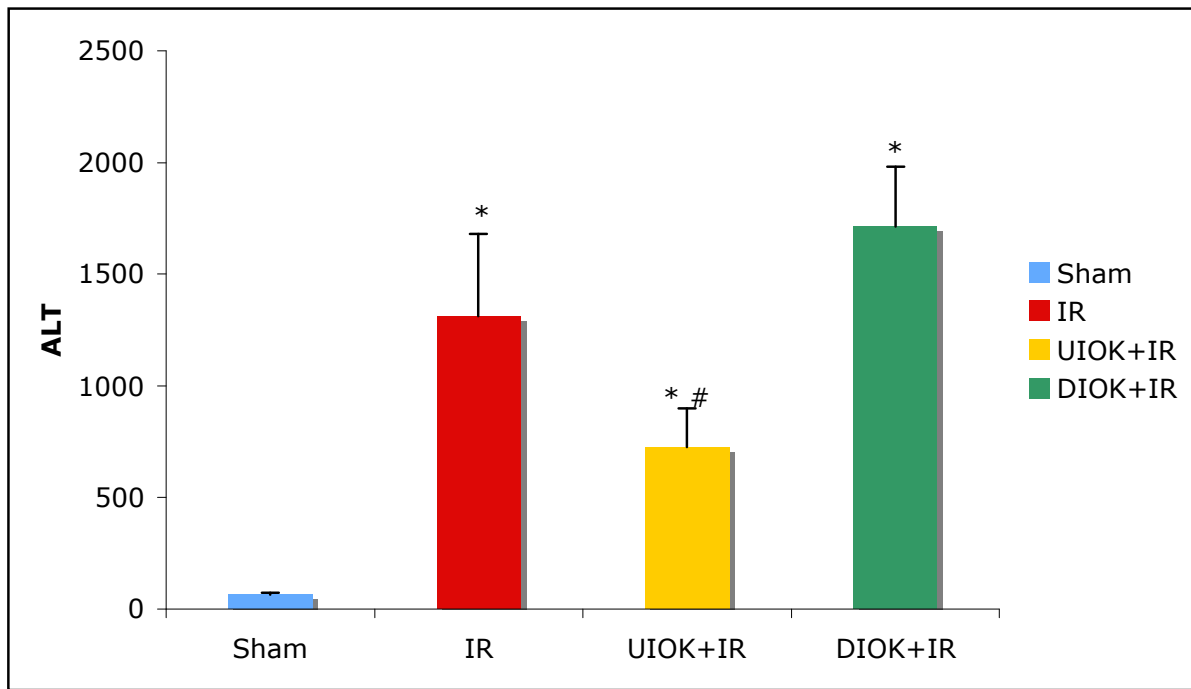
Sham grubunda AST değerleri, diğer üç gruba oranla anlamlı olarak düşük izlendi ($p<0.05$). İskemi reperfüzyon grubu UIÖK + İR ile karşılaştırıldığında belirgin yüksek ($p<0.05$) saptanan AST değerleri, DIÖK + İR ile karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmedi. Uzak İÖK + İR ile DIÖK + İR karşılaştırıldığında AST' nin UIÖK + İR lehine anlamlı düşük olduğu belirlendi ($p<0.05$) (Şekil 7) .



Şekil 7: Plazma AST değerleri. *: $p<0.05$ sham ile karşılaştırıldığında, #: $p<0.05$ İR ve DIÖK + İR ile karşılaştırıldığında

ALT:

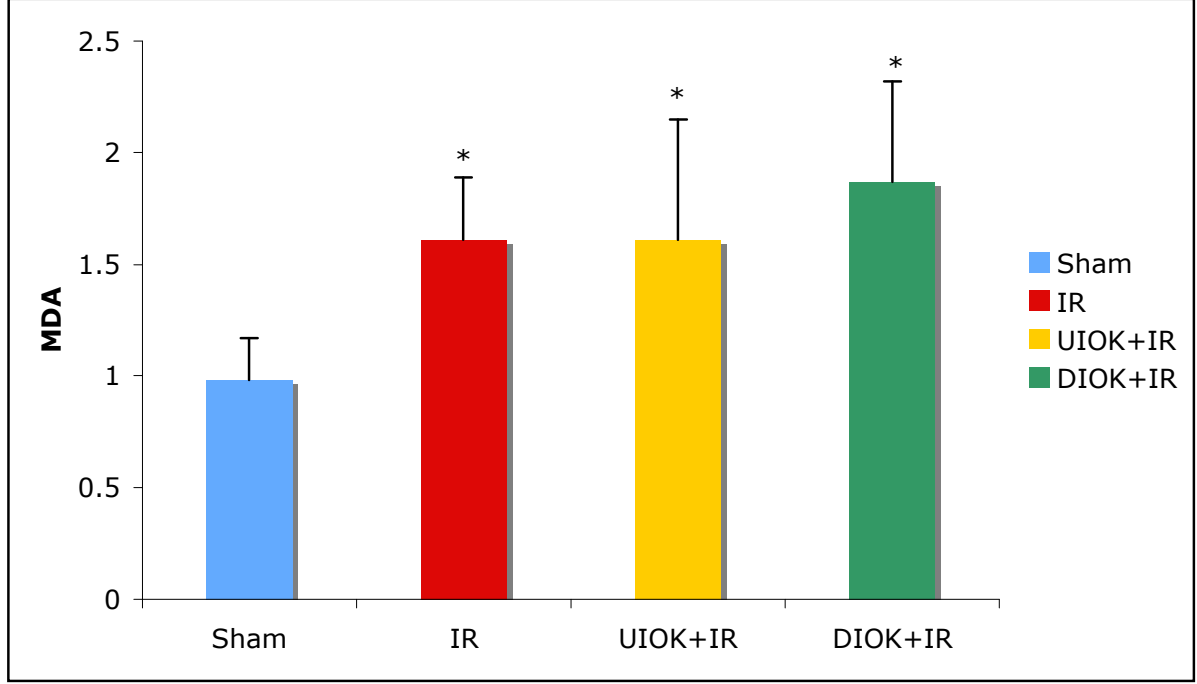
Plazma ALT düzeyleri sham grubunda diğer 3 gruba oranla anlamlı düşük bulundu ($p<0.05$). İskemi reperfüzyon grubu UIÖK + İR ve DIÖK + İR ile karşılaştırıldığında; UIÖK + İR' ye göre anlamlı yüksek ALT değerleri ($p<0.05$) elde edilirken, DIÖK + İR ile anlamlı fark saptanmadı. UIÖK + İR grubunda ALT değerleri DIÖK + İR grubuna oranla anlamlı düşük bulundu ($p<0.05$) (Şekil 8).



Şekil 8: Plazma ALT değerleri. *: $p<0.05$ sham ile karşılaştırıldığında, #: $p<0.05$ İR ve DIÖK + İR ile karşılaştırıldığında

MDA:

Karaciğer dokusunda MDA değerleri sham grubunda diğer 3 gruba oranla anlamlı düşük ($p<0.05$) saptanırken, İR, UIÖK + İR, DİÖK + İR grupları arasında anlamlı fark bulunmadı.



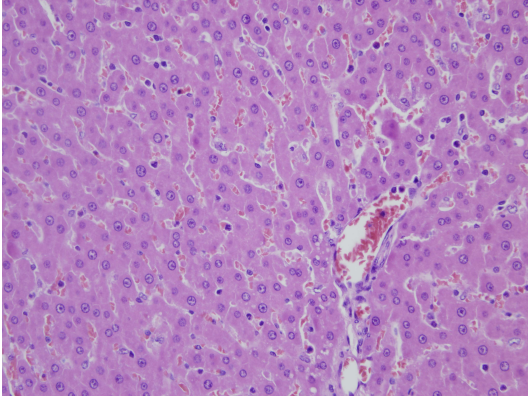
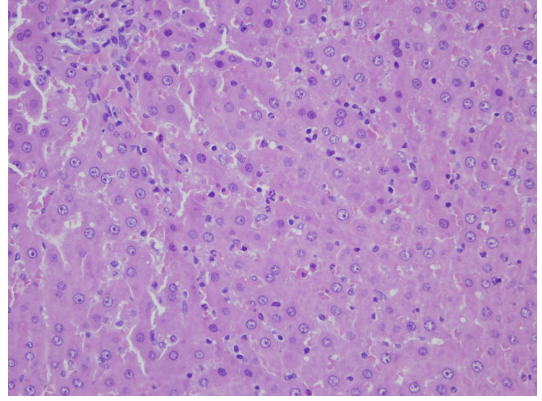
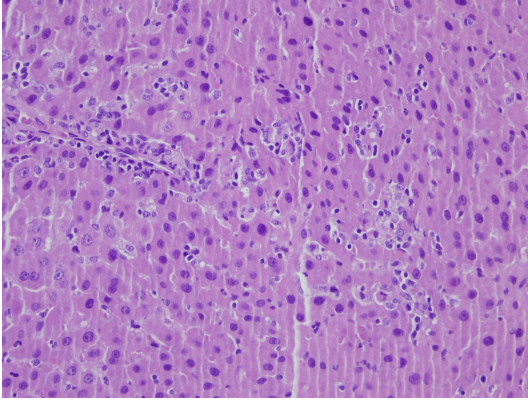
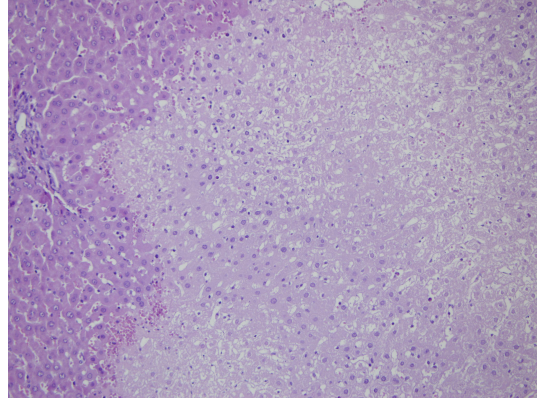
Şekil 9. Karaciğer dokusunda MDA değerleri. *: $p<0.05$ sham ile karşılaştırıldığında

Karaciğer histolojik hasar skoru (KHHS);

Sonuçlar ortanca, minimum ve maksimum olarak sunulmuştur. KHHS sham grubunda diğer 3 gruba oranla anlamlı düşük izlendi ($p<0.05$). İR grubunun UIÖK + İR ve DİÖK + İR ile arasında fark saptanmazken, UIÖK + İR grubunda DİÖK + İR' ye oranla KHHS anlamlı olarak az bulundu ($p<0.05$). Grupların Olympus DP70 (Japonya) ile elde edilen mikroskopik görüntüleri Şekil 10' dadır.

GRUPLAR	HİSTOLOJİK SKOR
Sham	1(0:1)*
İR	2(1:3)
UIÖK + İR	1(1:2)#
DİÖK + İR	3(1:3)

Tablo 1. Karaciğer parankim hücre hasarı değerlendirilmesi. *: $p<0.05$ İR, UIÖK+İR, DİÖK+İR ile karşılaştırıldığında, #: $p<0.05$ DİÖK + İR ile karşılaştırıldığında

A**B****C****D**

Şekil 10: Karaciğer hasarının mikroskopik görünümü; A; Normal karaciğer parankimi (400X, H&E) (Sham grubu), B; Derece 1 hücre hasarı (400X, H&E) (Uzak İÖK+İR grubu), C; Derece 2 hücre hasarı (400X, H&E) (Direkt İÖK+İR grubu), D; Derece 3 hücre hasarı, konfluan nekroz alanı (200X, H&E) (İR grubu)

TARTIŞMA

İskemi reperfüzyon hasarı karaciğer travmaları, karaciğer rezeksiyonu ve karaciğer transplantasyonu sonrası ortaya çıkabilen klinik bir problemdir.

DeneySEL karaciğer İR modellerinde, total (11) veya parsiyel iskemi (5) 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 (11). Bu çalışmada klinik uygulamalara yakınlığı nedeniyle 25 dk'lık total iskemi süresi seçilmiştir.

İskemi reperfüzyon sonunda oluşan serbest radikaller lipid peroksidasyonuna yol açarak diyet bileşikleri ve MDA açığa çıkarmaktadır (21). Hepatik İR hasarında son görüşler oksidatif stres sonucunda NF-κB aktive olarak iNOS gen aktivasyonuna yol açmasıdır (50). Karaciğerde NF-κB aktivasyonu proinflamatuvar sitokinler ve adezyon moleküllerinin sentezini artırmaktadır. Oksidatif stres hem lipid peroksidasyonuna, hem de NF-κB aracılığıyla doku hasarının büyümesine neden olmaktadır.

Karaciğerdeki İR hasarı kolestazi indükleyerek safra sekresyonunda geçici azalmaya neden olmaktadır. Safra akımındaki değişiklikler ALT-AST düzeyleri, karaciğer MPO aktivitesi ve serum bilirubin değerlerinde artmayla sonuçlanmakta; 1-3 gün içinde normale dönmektedir (24). Hepatik İR hasarının, hücreSEL etki düzeyinin en iyi göstergeleri serum AST, ALT, laktat dehidrojenaz (LDH) gibi enzim aktiviteleri ve histopatolojik değişimlerdir (3,7). İskemi reperfüzyon hasarı, hastalarda ve deney hayvanlarında oldukça karmaşık mekanizmalarla sistemik ve hemodinamik bozukluklara yol açmaktadır. Karaciğeri iskemi reperfüzyon hasarından koruma yöntemlerinden olan hepatik İÖK ilk olarak Lloris-Carsi ve ark. (4) tarafından rat karaciğerinde uygulanmış ve İR hasarını azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir.

İskemik önkoşullamanın etki mekanizması tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte; adenosin (31), NO (32), HSP (46), PKC (13) düzeyinin artışı, ATP yıkımının azalması (18), P-selektin artışının önlenmesi (36), bu değişikliklerin sonucunda da lökosit adezyon, migrasyonunun azalması ve mikrodolaşımın korunması bu mekanizmalardan bazılarıdır.

Karaciğer İR hasarının engellenmesinde direkt İÖK' nın etkinliğini belirleyen faktörlerin başında önkoşullamada uygulanan iskemi süresi ve döngü sayısının geldiği

vurgulanmaktadır (18). Beş dk iskemi, 10 dk reperfüzyon (64); beş dk iskemi, 30 dk reperfüzyon (65); 15 dk iskemi, 20 dk reperfüzyon (50); 30 dk iskemi, 30 dk reperfüzyon (13) gibi farklı iskemi ve reperfüzyon süreleri İÖK oluşturmak için kullanılmıştır. Peralta ve ark (18) tek döngü 10 dk'lık iskemiye takiben 10 dk'lık reperfüzyonun karaciğer İR hasarını azaltan etkili ve yeterli direkt İÖK yöntemi olduğunu bildirmişlerdir. Takip eden deneysel ve klinik çalışmaların çoğu karaciğer direkt İÖK'ında 10 dk'lık tek İR periyodunu standart kabul etmiş ve uygulamıştır (5-7,11,12). Bu çalışmada bir kez 10 dk'lık İR periyodu ile direkt İÖK gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte deneysel etkinliği gösterilmiş bu yöntemin klinik uygulamalarda kanamayı artırabileceği endişesi bulunmaktadır. Belghiti ve ark (41) direkt İÖK uyguladıkları hastalarda karaciğer rezeksiyonu sırasında kan kaybının anlamlı olarak daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Beyin ölümü gerçekleşmiş karaciğer donöründe uygulanan direkt İÖK'ın kalbe venöz dönüşü azaltacağı, azalan kan akımının da zaten mevcut olan metabolik ve nörohormonal bozuklukları daha da kötüleştirebileceği savunulmuştur (11). Azoulay ve ark (66) da yaptıkları klinik çalışmada, benzer şekilde direkt İÖK'ın erken dönemde İR hasarını azalttığını ancak karaciğer transplantasyonunda etkisinin yeterli olmadığını vurgulamışlardır.

Bu çalışmada direkt İÖK uygulanan grupta AST - ALT, MDA düzeyleri ve KHHS' da İR grubuna göre bir fark saptanmamıştır. Gerçekleştirilen birçok deneysel çalışmada direkt İÖK'ın gerek total gerekse parsiyel karaciğer iskemisi sonrasında AST-ALT düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (5,12,18,32). Karaciğer iskemisinde İÖK'ın koruyucu etkilerini gösteren bu çalışmaların aksine, direkt İÖK'ın % 50-70 hepatektomi uygulamalarında etkin olmadığını bildiren klinik ve deneysel araştırmalar bulunmaktadır (8,65). Pacheco ve ark (64) bizim çalışmamıza benzer şekilde, hepatik pedikül kan akımını keserek oluşturdukları direkt İÖK'ın AST ve ALT değerlerini İR grubuna göre değiştirmedeğini saptamışlardır. Ayrıca iskemi süresinin 40 dk' dan az olmasının direkt İÖK'ın koruyucu etkilerini göstermekte yetersiz kaldığı bildirilmiştir (8,67). Bu verilere dayanarak kullandığımız 25 dk'lık iskemi süresinin direkt İÖK grubunda hasarı engelleyici etkiyi ortaya koyamadığını düşündük.

İlk olarak Pryzklenk ve ark. tarafından uzakta uygulanan İÖK'ın diğer koroner arterlerin perfüzyonunu iyileştirdiği gösterilmiş ve bu olay uzak İÖK olarak adlandırılmıştır (59). Klinik ve deneysel çalışmalarda uzak İÖK'ın miyokard dışında akciğer (5), böbrek (33), iskelet kası (10) ve barsaklarda (36) da etkin olduğu bulunmuştur. Olguner ve ark (14) tek taraflı arka bacak İR' si öncesinde turnike yöntemiyle uygulanan İÖK'ın akciğerde lökosit infiltrasyonu ve lipid peroksidasyonunu engellediğini göstermişlerdir. Harkin ve ark

(62) domuzlarda bilateral alt ekstremite iskemisi öncesinde gerçekleştirilen İÖK' nın İL-6 düzeyi, dolaşımdaki lökosit sayısı, pulmoner ödem ve solunum yetmezliği bulgularını azaltarak akciğer hasarını engellediğini saptamışlardır.

Uzak İÖK' nın İR hasarını azaltmaktaki etkisini gösteren bu çalışmalar karaciğer İR hasarından korunmada noninvaziv bir yöntem arayışını gündeme getirmiştir. Uzak İÖK' nın karaciğere direkt bir stres uygulamadan İR hasarından korunmada etkili ve kolay bir yöntem olabileceği savunulmuştur (68,11). Lai ve ark (68) rat karaciğerinin parsiyel iskemisi öncesinde femoral arter kan akımını mikrovasküler klempile keserek alt ekstremiteye uyguladıkları 4 döngü İÖK' nın karaciğer hasarını azaltmada etkili olduğunu bulmuşlardır. Normalde, Kupfer hücrelerinde bulunan ısı şok proteini ailesinden Hem oksijenaz, hemiliverdin ve karbonmonoksit (CO) dönüştürür. İntrasellüler iletili olarak çalışan CO, NO gibi vazodilatör etkilidir. Araştırmacılar stres altında karaciğer parankim hücrelerinin de Hem oksijenaz salgıladığını ve uzak İÖK' nın parankim hücrelerini aktive ederek İR hasarını engelleyici etkiyi ortaya çıkardığını ileri sürmüşlerdir.

Küntscher ve ark (61) geçici iskemi oluştururken damar kan akımını direkt kesmek yerine noninvaziv turnike uygulamasının uzak İÖK' da alternatif yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Saita ve ark (10) İR hasarını engelleyen en etkili İÖK yönteminin üç kez 10 dk iskemi ve 10 dk reperfüzyon şeklinde olması gerektiğini bildirmişlerdir. Kanoria ve ark (11) klinik uygulamaya daha yakın olduğunu düşündükleri total karaciğer iskemi modelinde uzak İÖK' nın etkinliğini araştırmışlardır. Araştırmacılar üç döngü uygulanan uzak İÖK' nın serum transaminaz değerlerini düşürdüğünü, hepatik kan akımını artırdığını ve periferik O₂ saturasyonunu yükselttiğini belirlemişlerdir. Çalışmamıza temel olan bu araştırmada karaciğer İR' sinde ilk kez noninvaziv turnike yöntemiyle alt ekstremitte İÖK' sı oluşturulmuştur.

İskemik önkoşullamanın uzak organlardaki koruyucu etkisini açıklayan mekanizmaların başında NO ve adozin gelmektedir. İskemi reperfüzyon öncesinde uzak İÖK uygulanan deneklerin plazma NO düzeyinin arttığını, bunun da artan karaciğer kan akımı ve azalmış karaciğer hasarıyla ilişkili olduğunu ileri sürülmüştür (11). Takaoka ve ark (2) deneysel çalışmalarında uzak İÖK sonrasında adozin düzeylerinin arttığını ve koruyucu etkilerin adozin reseptörleri üzerinden olabileceğini belirtmişlerdir. Endojen opioidler ve ATP bağımlı K⁺ kanalları da uzak İÖK' da rol oynayan mekanizmalar arasındadır. Addison ve ark (29) İÖK' nın kas opioid reseptörlerini aktive ettiğini, erken dönemde nötrofil akümülyasyonunu azalttığını bildirmişlerdir. Kharbanda ve ark. (60) uzak İÖK' nın ATP

bağımlı K⁺ kanallarını aktive ettiğini, İR sırasında gerçekleşen endotelial hasarı sınırlayarak doku yaralanmasını azalttığını göstermişlerdir.

Bu çalışmada, serum AST-ALT değerleri uzak İÖK grubunda, gerek İR gerekse direkt İÖK grubuna oranla anlamlı düşük bulunmuştur. Kanoria ve ark (11) uzak İÖK grubunda AST değerlerinin İR grubundan farklı olmamakla beraber ALT değerlerinin belirgin azaldığını saptamışlardır. Çalışmada bulunan sonuçlar Lai ve ark (68) ve Kanoria ve ark (11) elde ettiği sonuçlar ile uyumludur. Ulaşabildiğimiz kaynaklarda karaciğer İR hasarında direkt ve uzak İÖK etkisini karşılaştıran bir araştırmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız, uzak İÖK' nın hepatic iskemi reperfüzyonda AST-ALT değerlerini direkt İÖK' ya oranla belirgin azalttığını saptayan ilk örnektir.

Karaciğerin histopatolojik incelemelerinde İR sonrası parenkim boyunca yaygın hepatosit nekrozu, hepatic sinuzoidlerde konjesyon ve polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu izlenmektedir (5). Deneysel karaciğer transplantasyonu yapılan bir çalışmada, geniş alanlarda hepatositlerde koagülatif nekroz, nötrofil infiltrasyonu ve hemoraji saptanmıştır (6).

Karaciğerin histopatolojisi özellikle konjesyon, nekroz ve inflamatuvar hücre yoğunluğu açısından incelendiğinde, KHH skorunun sham grubunda diğer 3 gruba oranla belirgin olarak düşük olduğu saptanmıştır. İskemi reperfüzyon grubu ile İÖK grupları arasında fark olmamakla birlikte, uzak İÖK grubunda KHH skorunun direkt İÖK grubuna göre daha düşük bulunduğu belirlenmiştir. Cescon ve ark (69) direkt İÖK' nın histopatolojik bulguları değiştirmedeğini göstermişlerdir. Işık mikroskobu ile yapılan histolojik değerlendirmeler semikantitatif skorlamalar olarak kabul edilmektedir (14). Bununla birlikte bu çalışmada uzak İÖK' nın KHHS yi direkt İÖK' ya oranla daha iyi baskıladığı sonucuna varılmıştır.

Bu araştırmada, sham grubunda diğer üç gruba göre lipid peroksidasyonu göstergesi olan MDA düzeylerinin anlamlı olarak düşük olduğu ancak İR, uzak İÖK ve direkt İÖK grupları arasında fark olmadığı saptanmıştır. Pacheco ve ark (64) sirotik karaciğer modeli oluşturdukları çalışmalarında lipid peroksidasyon ürünleri (MDA) ve AST-ALT düzeylerinde İR ve İÖK gruplarında fark bulamamışlardır. Kırk dk' lık uzun iskemi süresinin yetersiz olduğunu, İÖK' nın bu nedenle etkisini gösteremediği sonucuna varmışlardır. Darılmaz ve ark (70) da benzer şekilde iskemi süresinin kısa olmasının MDA düzeylerindeki artışı göstermeyebileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmadaki 25 dk' lık uzun iskemi süresi yeterli

MDA oluşumuna yol açamamış olabilir. İskemi reperfüzyon araştırmalarında lipid peroksidasyonu ürünlerinin, karaciğer enzimlerine oranla daha az duyarlı, sonuç elde edilmesi güç parametreler olduğu bildirilmiştir (22).

Ulaşılabildiğimiz kaynaklarda karaciğer İR hasar modellerinde direkt İÖK ile uzak İÖK'nin farklarını araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Reperfüzyon hasarının kendisi kadar engellenmesini sağlayan mekanizmalar da oldukça karışıktır. İskemik önkoşullamanın etkinliği yaklaşık iki dekat önce gösterilmesine rağmen aracılık eden yolaklar hala tam olarak anlaşılamamıştır. Son bilgiler karaciğer direkt İÖK sınırının P13/Akt yolu ile İR hasarını azalttığı yönündedir (63). Araştırmacılar, Akt fosforilasyonunun İÖK tarafından arttırılmasının proapoptotik faktörlerde aktivasyon azalması ve NF-κB *down* regülasyonu ile sonuçlandığı, ayrıca serbest oksijen radikallerinin Akt aktivasyonuna eşlik ettiği bildirilmiştir. Uzak İÖK'da NF-κB aktivasyonunun miyokarda İR hasarını engelleyici rolü olduğu öne sürölmektedir (71). Gerek direkt gerekse uzak İÖK'da benzer mekanizma ve yolakların geçerli olduğu düşünülebilir. Önceki araştırmalarda İR hasarında anahtar rol oynadığı belirlenen NF-κB'nin (3,50) uzak İÖK'nin karaciğer İR hasarında etkinliğini araştıran bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Çalışmamızda NF-κB ve serbest oksijen radikalleri teknik nedenlerle değerlendirilememiştir. Uzak İÖK, karaciğer iskemi reperfüzyonunda daha yoğun NF-κB inaktivasyonuna veya daha az serbest oksijen radikali oluşumuna yol açmış olabilir.

Bu çalışmada uzak İÖK'nin hepatik İR hasarında AST-ALT değerleri ve KHH skorunu azalttığı gösterilmiştir. Direkt İÖK'ya göre daha etkin bulunan bu yöntem karaciğeri İR hasarından korumuştur. İskemik önkoşullamanın etkinliğini gösteren ve bu çalışmada yer almayan serbest oksijen radikalleri, NF-κB gibi mekanizmalar iki yöntem arasındaki farkı açıklayabilir. Bu nedenle ayrıntılı deneysel çalışmaların arttırılması gerekmektedir.

Direkt organa uygulanan İÖK'nin vital organ cerrahilerinde kolayca uygulanamayacağı, birincil olarak hedef organın güvenliğini tehlikeye atabileceği, ikincil olarak İÖK'nin cerrahi süreyi ve kanamayı arttırabileceği bildirilmektedir (68). Uzak İÖK, karaciğerde ek stres oluşturmadan, operasyon sırasında cerrahi süre veya kan kaybını arttırmaksızın, kolaylıkla uygulanabilir noninvaziv bir klinik yöntem olabilir. Bu çalışmada direkt İÖK'nin etkinliği gösterilememiştir. Bununla beraber karaciğer İR hasarını önlemede son dönemde oldukça popüler olan bu iki yöntemin etkinliğini ve etki mekanizmalarını karşılaştırmak için deneysel- klinik çalışmalara gereksinim olduğu kanaatine varılmıştır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Direkt İÖK ile uzak İÖK' nın karaciğer İR hasarına etkilerinin karşılaştırıldığı bu çalışmada uzak İÖK' nın karaciğer İR' u sonrası, AST-ALT değerlerini ve KHH skorunu belirgin olarak azalttığı bulunmuştur. Direkt İÖK grubunda, İR grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Sham grubunda MDA değerleri diğer üç gruba göre anlamlı olarak düşük bulunmuş; İR, uzak İÖK+İR, direkt İÖK+İR grupları arasında fark saptanmamıştır.

Uzak İÖK' nın direkt İÖK ile karşılaştırıldığında karaciğer İR hasarını önlemede daha etkili olduğu gösterilmiştir. Karaciğer gibi vital organlara direkt İÖK uygulaması hedef organın güvenliğini tehlikeye atabileceği ile ilgili görüşler olması uzak İÖK' yı ön plana çıkarmaktadır.

Major karaciğer ameliyatlarında, cerrahi süreyi uzatmadan ve organa ek hasar oluşturmadan İR hasarını önlemek için uzak İÖK' nın uygulanabilir bir yöntem olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu iki yöntemin etki mekanizmaları ve etkinlikleri açısından farklarının ortaya konacağı deneysel ve klinik çalışmalara gereksinim olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124–1136
- 2- Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, Yabe T ve ark. 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;33:556–564
- 3- Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia±reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190: 255-266
- 4- Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg* 2003;20:383–396
- 5- Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpi´ E ve ark. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999;30:1481–1489
- 6- Franco-Gou R, Rosell ´ o-Catafau J, Casillas-Ramirez A, Massip-Salcedo M ve ark. How ischaemic preconditioning protects small liver grafts. *J Pathol* 2006; 208: 62–73
- 7- Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg* 2000;232:155–162
- 8- Clavien PA, Selzner M, Ru¨diger HA, Graf R ve ark. Prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 2003;238: 843–852
- 9- 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;92:4666–4670

- 10- 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;55:241-245
- 11- Kanoria S, Jalan R, Davies NA, Seifalian AM ve ark. Remote ischaemic preconditioning of the hind limb reduces experimental liver warm ischaemia–reperfusion injury. *Br J Surg* 2006;93:762–768
- 12- Peralta C, Fern´andez L, Pan´es J, Prats N ve ark. 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
- 13- 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;70:1070–1075
- 14- Olguner C, Koca U, Kar A, Karci A ve ark. Ischemic preconditioning attenuates the lipid peroxidation and remote lung injury in the rat model of unilateral lower limb ischemia reperfusion. *Acta Anaesthesiol Scand* 2006;50:150–155
- 15- Best B. Ischemia and reperfusion injury in cryonics. <http://www.benbest.com/cryonicsischemia.html>
- 16- Peralta C, Bartrons R, Serafin A, Bl´azquez C ve ark. Adenosine monophosphate–activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 2001;34:1164–1173
- 17- Howell JG, Zibari GB, Brown MF, Burney DL ve ark. Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions. *Transplantation* 2000;69:300–306
- 18- Peralta C, Closa D, Xaus C, Gelpí E ve ark. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* 1998;28:768–773

- 19- Heijnen BHM, Straatsburg IH, Padilla ND, Van Mierlo GJ ve ark. 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
- 20- Birincioğlu M. İskemi-reperfüzyon tekniklerine genel giriş. <http://www.tfd.org.tr/gaziantep.html>
- 21- Vali L, Taba G, Szentmihalyi K, Febel H ve ark. Reduced antioxidant level and increased oxidative damage in intact liver lobes during ischemia-reperfusion. *World J Gastroenterol* 2006;12:1086–1091
- 22- Van M. *Ischemic preconditioning* alt ekstremite operasyonlarında kullanılan turnikeye bağlı iskemi reperfüzyon hasarını azaltır mı? *Uzmanlık tezi, İzmir 2003*
- 23- Kaszaki J, Wolfárd A, Szalay L , Boros M. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2006;38:826–828
- 24- Nieuwenhuijs VB, De Bruijn MT, Padbury RTA, Barritt GJ. Hepatic ischemia-reperfusion injury: roles of Ca²⁺ and other intracellular mediators of impaired bile flow and hepatocyte damage. *Digestive Diseases and Sciences* 2006;51:1087-1102
- 25- Quireze C, Souza Montero EF, Leit ~ ao EMC, Juliano Y ve ark. Ischemic preconditioning prevents apoptotic cell death and necrosis in early and intermediate phases of liver ischemia-reperfusion injury in rats. *J Investigative Surg* 2006;19:229–236
- 26- Fern'andez L, Heredia N, Peralta C, Xaus C ve ark. Role of ischemic preconditioning and the portosystemic shunt in the prevention of liver and lung damage after rat liver transplantation. *Transplantation* 2003;76:282–289
- 27- Cheung MMH, Kharbanda RK, Konstantinov IE, Shimizu M ve ark. 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– 2282

- 28- Duru S, Koca U, Oztekin S, Olguner C ve ark. Antithrombin III pretreatment reduces neutrophil recruitment into the lung and skeletal muscle tissues in the rat model of bilateral lower limb ischemia and reperfusion: a pilot study. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005;49:1142–1148
- 29- Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Khan A ve ark. Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H1435–H1443
- 30- Orban JC, Levraut J, Gindre S, Deroche D ve ark. Effects of acetylcysteine and ischaemic preconditioning on muscular function and postoperative pain after orthopaedic surgery using a pneumatic tourniquet. *EJA* 2006;23:1–6
- 31- Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N ve ark. 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
- 32- Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpí E ve ark. 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
- 33- Ates E, Genc E, Erkasap N, Erkasap S ve ark. Renal protection by brief liver ischemia in rats. *Transplantation* 2002;74:1247-1251
- 34- 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
- 35- Dave KR, Saul I, Prado R, Busto R ve ark. Remote organ ischemic preconditioning protect brain from ischemic damage following asphyxial cardiac arrest. *Neuroscience Letters* 2006;404:170–175

- 36- Davis JM, Gute DC, Jones S, Krsmanovic A ve ark. Ischemic preconditioning prevents postischemic P-selectin expression in the rat small intestine. *Am J Physiol* 1999;277:H2476–H2481
- 37- Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, Maeda T ve ark. Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning. *Br J Surg* 1998; 85:1636–1640
- 38- Tsuyama H, Shimizu K, Yoshimoto K, Nezuka H ve ark. Protective effect of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Transplant Proc* 2000;32:2310–2313
- 39- 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
- 40- Koti RS, Yang W, Dashwood MR, Davidson BR ve ark. Effect of ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Liver Transpl* 2002;8:1182–1191
- 41- Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P ve ark. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection a controlled study. *Ann Surg* 1999;229:369-375
- 42- Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. 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
- 43- Ricciardi R, Meyers WC, Schaffer BK, Kim RD ve ark. Protein kinase C inhibition abrogates hepatic ischemic preconditioning responses. *J Surg Res* 2001;97:144–149
- 44- Carini R, Grazia De Cesaris M, Splendore R, Bagnati M ve ark. Ischemic preconditioning reduces Na1 accumulation and cell killing in isolated rat hepatocytes exposed to hypoxia. *Hepatology* 2000;31:166–172

- 45- Carini R, Grazia De Cesaris M, Splendore R, Vay D ve ark. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology* 2001;33:131–139
- 46- Ishikawa Y, Yamamoto Y, Kume M, Yamagami K ve ark. Heat shock preconditioning on mitochondria during warm ischemia in rat livers. *J Surg Res* 1999;87:178–184
- 47- Ricciardi R, Schaffer BK, Kim RD, Shah SA ve ark. Protective effects of ischemic preconditioning on the cold-preserved liver are tyrosine kinase dependent. *Transplantation* 2001;72:406–412
- 48- Peralta C, Bulbena O, Xaus C, Prats N ve ark. Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation* 2002;73:1203–1211
- 49- Sindram D, Ru'diger HA, Upadhyya AG, Strasberg SM ve ark. Ischemic preconditioning protects against cold ischemic injury through an oxidative stress dependent mechanism. *Journal of Hepatology* 2002;36:78–84
- 50- Funaki H, Shimizu K, Harada S, Tsuyama H ve ark. Essential role for nuclear factor κB in ischemic preconditioning for ischemia- reperfusion injury of the mouse liver. *Transplantation* 2002;74:551–556
- 51- Peralta C, Perales JC, 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;160:2111–2122
- 52- Loukogeorgakis SP, Panagiotidou AT, Broadhead MW, Donald A ve ark. 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;46:450–456
- 53- Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res.* 2000;87:972–983

- 54- Baxter GF, Goma EM, Yellon DM. Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium. *Basic Res Cardio* 1997;192:159 – 167
- 55- Lochner A, Marais E, Genade S, Moolman JA. Nitric oxide: a trigger for classic preconditioning? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279: H2752–2765
- 56- Kume M, Yamamoto Y, Yamagami K, Ishikawa Y ve ark. Pharmacological hepatic preconditioning: involvement of 70-kDa heat shock proteins (HSP72 and HSP73) in ischaemic tolerance after intravenous administration of doxorubicin. *Br J Surg* 2000;87,1168–1175
- 57- Terajima H, Enders G, Thiaener A, Hammer C ve ark. Impact of hyperthermic preconditioning on postischemic hepatic microcirculatory disturbances in an isolated perfusion model of the rat liver. *Hepatology* 2000;31:407–415
- 58- Clemens MG. Nitric Oxide in Liver Injury. *Hepatology* 1999;30:1–5
- 59- Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA ve ark. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 1993;87;893–899
- 60- Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB ve ark. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation* 2002;106:2881–2883
- 61- Küntscher MV, Kastell T, Sauerbier M, Nobile R ve ark. Acute remote ischemic preconditioning on a rat cremasteric muscle flap model. *Microsurgery* 2002;22:221–226
- 62- Harkin DW, Barros D'Sa AAB, McCallion K, Hoper M ve ark. Ischemic preconditioning before lower limb ischemia-reperfusion protects against acute lung injury. *Vasc Surg* 2002;35:1264–1273
- 63- Izuishi K, Tsung A, Hossain MA, Fujiwara M ve ark. Ischemic preconditioning of the murine liver protects through the Akt kinase pathway. *Hepatology* 2006;44:573–580

- 64- Pacheco EG, Gomes MCJ, Rodrigues GR, Campos W ve ark. Effect of liver ischemic preconditioning in cirrhotic rats submitted to hepatic ischemia/ reperfusion injury. *Acta Cirurgica Brasileira* 2006;21:24–28
- 65- Eipel C, Glanemann M, Nuessler AK, Menger DM ve ark. Ischemic preconditioning impairs liver regeneration in extended reduced-size livers. *Ann Surg* 2005;241: 477–484
- 66- Azoulay D, Massimo D, Andreani P, Ichai P ve ark. Effects of 10 minutes of ischemic preconditioning of the cadaveric liver on the graft's preservation and function. *Ann Surg* 2005;242: 133–139
- 67- Smyrniotis V, Theodoraki K, Arkadopoulos N, Fragulidis G ve ark. Ischemic preconditioning versus intermittent vascular occlusion in liver resections performed under selective vascular exclusion: a prospective randomized study. *Am J Surg* 2006;192:669–674
- 68- 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: 1311–131
- 69- Cescon M, Grazi GL, Grassi A, Ravaioli M ve ark. Effect of ischemic preconditioning in whole liver transplantation from deceased donors. A pilot study
Liver Transplant 2006;12:628–635
- 70- 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;37:4550–4552
- 71- Li G, Labruto F, Sirsjo A, Chena F ve ark. Myocardial protection by remote preconditioning: the role of nuclear factor kappa-B p105 and inducible nitric oxide synthase. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;26:968-973