

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

**DENEYSEL HEPATİK İSKEMİ REPERFÜZYON
MODELİNDE LEVOSİMENDAN İNFÜZYONUN
KARACİĞERE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. AYGANIM AHMETOVA

UZMANLIK TEZİ

İZMİR 2010

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

**DENEYSEL HEPATİK İSKEMİ REPERFÜZYON
MODELİNDE LEVOSİMENDAN İNFÜZYONUN
KARACİĞERE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Araş.Gör.Dr. AYGANIM AHMETOVA

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ:
Doç.Dr. UĞUR KOCA

İZMİR-2010

TESEKKÜR

Uzakta olsalar da hep yanımda olan ve destek veren annem Kulşarat, babam Serik, ablalarım Sabina ve Eliza, eniştem Kadir'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Anesteziyoloji ve Reanimasyon eğitimim boyunca tecrübe ve bilgilerinden yararlandığım sayın Prof.Dr.Zahide Elar, Prof.Dr.Emel Sağıroğlu, Prof.Dr.Ali Günerli, Prof.Dr.Atalay Arkan, Prof.Dr.Erol Gökel, Prof.Dr.Semih Küçükğüçlü, Prof.Dr.Necati Gökmen, Prof.Dr.Sermin Öztekin ve diğer değerli hocalarıma;

Tezimin her aşamasında bana yardımcı olan tez danışmanım Doç.Dr. Uğur Koca, Genel Cerrahi Uzmanı Doç.Dr.Koray Atila, arkadaşlarım Uzm.Dr.Filiz Kaymakçı, Dr.Hatice Fidan;

Bana destek veren sevgili arkadaşlarım Uzm.Dr.Sibel Akgül, Dr.Ezgi İçten İnce, Dr.Sibel Ergürz;

Zorlu asistanlık eğitimimizin gece ve gündüzlerini birlikte geçirdiğimiz tüm branşların uzman ve asistan arkadaşlarıma, değerli anestezi teknikerlerimize, derlenme hemşireleri ve Anestezi Yoğun Bakım, Ağrı ünitelerdeki, amelyathane ve gündüz hastanesinin tüm hemşire ve personelimize;

Tek tek ismini sayamadığım sevgili anestezi asistanlarına sonsuz teşekkür ederim.

Beni, OLDUM GİBİ sevip kabul eden ve bu uzuuuun yıllarımı benimle paylaşan, hayatımızın zorluklarını ve güzelliklerini paylaşan, benimle iyi günde ve kötü günde birlikte olan tüm arkadaşlarıma çok-çok teşekkür ederim.....

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TABLO LİSTESİ	I
ŞEKİL LİSTESİ	II
GRAFİK LİSTESİ	III
RESİM LİSTESİ	IV
KISALTMALAR	V-VI
ÖZET	1
SUMMARY (İNGİLİZCE ÖZET)	2
GİRİŞ ve AMAÇ	3
GENEL BİLGİLER	4
1. İskemi	4
2. Reperfüzyon Hasarı	7
3. Karaciğer İskemi - Reperfüzyon Hasarı	11
4. Karaciğer İskemi - Reperfüzyon Hasarın Organ Sistemlerine Etkileri	12
5. Levosimendan	13
GEREÇ VE YÖNTEM	17
1. Monitorizasyon	17
2. Deney Grupları ve Protokol	17
3. Deneysel İskemi - Reperfüzyon Yöntemi	18
4. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü	20
5. Karaciğer Hücre Histolojisinin Değerlendirmesi	21
6. İstatistiksel Analiz	22
7. Çalışma Gruplarının Şematik Görünümü	22
BULGULAR	23
1. Ortalama Arteriyel Kan Basınçları	23
2. Biyokimyasal Değerlerler	24
3. Karaciğer Işık Mikroskopik Bulgular	26
4. Karaciğer Histolojik Hasar Skoru (KHHS)	29
TARTIŞMA	31
SONUÇ ve ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR	36

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1: Levosimendanın mekanizma ve farmakolojik etkileri	14
Tablo 2: Ortalama Arteriyel Kan Basıncı Değerleri, mmHg: medyan (minimum-maksimum)	23
Tablo 3: Plazma AST düzeyleri, U/L: medyan (minimum-maksimum)	24
Tablo 4: Plazma ALT düzeyleri, U/L: medyan (minimum-maksimum)	25
Tablo 5: Gruplarda KHHS bulguları: medyan (minimum-maksimum)	30

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 1: İR hasarında yer alan olaylar dizisi 10
- Şekil 2: Levosimendanın kimyasal yapısı 13
- Şekil 3 A,B,C,D: Karaciğer dokusu 1 (Sham) (A), 2 (İ/R) (B,C) ve 3 (İ/R+L) (D)
gruplarına ait genel görüntüler (H&E) 27
- Şekil 4 E,F: Karaciğer dokusu grup 2'ye ait H&E ile boyanmış kesit görüntüleri; hücre
kordonlarının bütünlüğü bozulmuş, sinüzoidlerde dilatasyon (→), mononükleer
hücre infiltrasyonu ve hepatositlerde fokal nekroz (⇨) görüldü 28
- Şekil 5 G,H: Karaciğer dokusu grup 2'ye ait H&E ile boyanmış kesit görüntüleri;
sinüzoidlerde dilatasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu (→). Portal alanda
dilatasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonu (⇨) 28
- Şekil 6 I,J: Karaciğer dokusu İR+L grubunda ise hepatosit hücre kordonlarının
bütünlüğü kontrole göre daha düzenli, sinüzoidlerde daha az derecede dilatasyon;
portal alan normale yakın görünümde (⇨) 29

GRAFİK LİSTESİ

Sayfa No

Grafik 1: Plazma AST düzeyleri (U/L)	24
Grafik 2: Plazma ALT düzeyleri (U/L)	25
Grafik 3: Gruplarda KHH Skor bulguları	29

RESİM LİSTESİ

Sayfa No

Resim 1: Normal karaciğer dokusu	18
Resim 2: Atravmatik damar klempi ile portal ven ve hepatik arter akımın kesilmesi	19
Resim 3: Ratın total klempaj ile karaciğer kan akımının kesilmesi	19
Resim 4: Ratın klempaj sonrasında 1 saatlik reperfüzyon dönemi	20

KISALTMALAR

İR: iskemi - reperfüzyon

ACE inhibitörleri: Anjiotensin *converting* (dönüştürücü) enzim inhibitörleri

ATP: Adenozin trifosfat

AMP: Adenozin monofosfat

cAMP: Siklik Adenozin monofosfat

AAH: Akut akciğer hasarı

ARDS: Akut respiratuvar distres sendromu

ALT : Alanin Aminotransferaz

AST : Aspartat Aminotransferaz

Ca⁺²: Kalsiyum

C3a: Kompleman 3a

C5a: Kompleman 5a

ÇOY: Çoklu organ yetersizliği

ÇOYS: Çoklu organ yetersizliği sendromu (*multiple organ dysfunction syndrome*)

Dk: dakika

DNA: Deoksiribonükleik asit

ET: Endotelin

İL: İnterlökin

H&E: Hematoksilen-eozin boyası

KHHS: Karaciğer histopatolojik hasar skoru

LT-B4: Lökotrien B4

LDH: Laktat dehidrogenaz

LPS: Lipopolisakkarit

MPO: Miyeloperoksidaz

MDA: Malondialdehit

NK: Doğal öldürücü (*natural killer*)

NF-κB: Nükleer faktör κB (*nuclear factor*)

NO: Nitrik oksit

PAF: Platelet aktive edici faktör (*platelet activating factor*)

PMNL: Polimorfonükleer lökositler

OAB: Ortalama arteriyel kan basıncı

PG: Prostaglandin

PDE: Fosfodiesteraz

SOR: Serbest oksijen radikali

SIRS: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (*systemic inflammatory response syndrome*)

SIYS: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu

TNF- α : Tümör nekrozis faktör-alfa

Tx A2: Tromboksan A2

ÖZET

DENEYSEL HEPATİK-İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE LEVOSİMANDAN İNFÜZYONUN KARACİĞERE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr.Ayganım AHMETOVA, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD., İzmir.

Amaç: İskemi-reperfüzyon hasarının hemodinamik etkilerini azaltmak için vazokonstriktör/inotropik ilaçlar kullanılmaktadır. Levosimendan inotropik ve vazodilatör etkilere sahip bir ilaçtır. Yapılan bazı deneysel çalışmalarda levosimendanın antiiskemik, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkileri olduğu ve TNF- α 'nın düzeylerinde azalma sağladığı gösterilmiştir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, rat karaciğer iskemi-reperfüzyon modelinde levosimendanın karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı üzerine etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Çalışmada 21 adet erkek Wistar rat kullanılmıştır. Her birinde yedi denek bulunan üç grup oluşturulmuştur. Sham grubunda (Grup 1) ratların batınları açılmış, protokol süresince başka işlem yapılmadan beklenmiştir. İskemi-reperfüzyon grubunda (Grup 2) 45 dk total karaciğer iskemisi sonrası 60 dk reperfüzyon, İskemi-reperfüzyon+Levosimendan grubunda (Grup 3) 45 dk total karaciğer iskemisi süresince Levosimendan infüzyonu uygulandı ve 60 dk reperfüzyon sonrası iskemi-reperfüzyon gerçekleştirilmiştir. Tüm gruplarda ratların anestezi süresi eşit tutulmuş, karaciğer enzimleri AST, ALT için kan ve işlem sonunda ratlar sakrifiye edildikten sonra histopatolojik inceleme için karaciğer doku örnekleri alınmıştır.

Bulgular: Serum AST, ALT değerlerinin, sham grubunda diğer gruplara göre düşük olduğu, grup 2 ve 3 arasında anlamlı fark olmadığı saptanmıştır. Karaciğer histopatolojik hasar skoru sham grubunda diğer gruplara göre düşük, levosimendan uyguladığımız grupta ise iskemi-reperfüzyon grubuna göre düşük olduğu saptanmıştır.

Tartışma: Çalışmamızda levosimendanın, karaciğer iskemi-reperfüzyon modelinde doku hasarını azalttığı saptanmıştır. Levosimendanın karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarını önleyici etkisini araştırmak için deneysel ve klinik çalışmalara gereksinim olduğu kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: karaciğer iskemisi, reperfüzyon hasarı, levosimendan.

**EFFECTS OF LEVOSIMENDAN ON EXPERIMENTAL
HEPATIC ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY
SUMMARY**

Dr.Ayganım Ahmetova, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Anesthesiology and Reanimation, İzmir.

Purpose: Vasoconstrictor and inotropic drugs are used for attenuate the hemodynamic effects of ischemia-reperfusion injury. Levosimendan is an inotropic and vasodilator drug. In experimental studies, levosimendan displayed antiapoptotic, antiinflammatory and antiischemic properties and reduced serum TNF- α levels. We aimed to determine the role of levosimendan to prevent ischemia-reperfusion damage in experimental model of hepatic ischemia-reperfusion injury.

Material and Method: Twenty-one male Wistar rats were divided into 3 groups as Sham (group 1), underwent only laparotomy, ischemia-reperfusion (group 2), underwent 45 min total hepatic ischemia and 60 min reperfusion, and ischemia-reperfusion+levosimendan group (group 3) underwent ischemia-reperfusion as the same in group 2 but additionally levosimendan infusion was performed during ischemia period. The length of the experiment was the same in the groups. At the end of the experiment blood (for determine the serum serum aspartate transaminase and alanine transaminase levels) and liver samples (for histopatologic scoring) were collected.

Results: Levels of serum aspartate transaminase and alanine transaminase were significantly lower in the sham group compared to other groups but there was any difference between group 2 and 3. The histopatological score of liver injury was significantly lower in the sham group compared to the other groups and was also significantly lower in group 2 comparing group 3.

Discussion: Present study showed that when hepatic histological scores are considered, levosimendan protects liver from ischemia-reperfusion injury. The effects and mechanisms of levosimendan in ischemia-reperfusion injury must be studied in clinical and experimental studies.

Key words: Hepatic ischemia, reperfusion injury, levosimendan

GİRİŞ ve AMAÇ

Günlük uygulama içerisinde iskemi-reperfüzyon (İR) tıbbın pek çok alanında karşılaşılan bir olaydır. Kompleks karaciğer yaralanması, travma sonucu, karaciğer transplantasyonu, tümör ve kist cerrahisi esnasında oluşabilmektedir (5,7,8). Uygulanan cerrahi esnasında parankimal kanamayı azaltma ve cerrahi tekniği uygulama kolaylığı açısından sıklıkla portal triadın klemp vasıtası ile sıkıştırılması (“*pringle*” manevrası) tercih edilmektedir (5,11). Hepatik arter ve portal venin klempajı sonucu geçici olarak kan akımının kesilmesi ile iskemi, kan dolaşımının tekrar sağlanması ile de reperfüzyon oluşmaktadır.

İR hasarında amlodipin (40), verapamil (41) gibi Ca^{+2} kanal blokerleri, mannitol, anjiotensin *converting* (dönüştürücü) enzim inhibitörleri (ACE inhibitörleri), E-vit, propranolol, N-asetilsistein gibi antioksidanlar, prostaglandin E2, aspirin ve prednizolon (39) gibi antiinflamatuvarlar, allopürinol (44), adenosin, antiproteazlar gibi serbest radikal inhibitörleri, eritropoetin (37) gibi çok sayıda koruyucu ajanlar denenmiştir (1,3). Ayrıca iskemik önkoşullama (4) ve hipotermi (1,12) gibi deneysel yöntemler araştırılmıştır.

İskemi-reperfüzyon hasarının hemodinamik etkilerini engellemek veya azaltmak amacı ile vazokonstriktör ilaçlarla profilaksi önerilmektedir ve kalsiyum glukonat veya kalsiyum klorür, efedrin, fenilefrin, epinefrin veya norepinefrin, amrinone, dopamin gibi vazokonstriktör/inotropik ilaçlardan yararlandığı bilinmektedir (8,53).

İnodilatör etkinliğe sahip olan Levosimendan ile yapılan birkaç çalışmada ilacın antiiskemik, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkiler gösterilmiştir (19).

Deneysel karaciğer iskemi-reperfüzyon modelinde ise Levosimendan etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Buradan yola çıkarak iskemi boyunca verilen Levosimendan infüzyonunun karaciğer İR hasarına etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Günlük uygulama içerisinde İR tıbbın pek çok alanında sık karşılaşılan bir olaydır. Hepatik cerrahi uygulamaları anesteziistlerin karşı karşıya olduğu yüksek riskli majör abdominal girişimlerin başında gelmektedir (45). Karaciğer ile ilgili cerrahi girişimler esnasında geçici olarak kan akımının durması ile iskemi, kan dolaşımının tekrar sağlanması ile de reperfüzyon oluşmaktadır (1,2). İskemi reperfüzyon hasarı özellikle yandaş karaciğer hastalığı (yağlanma, fibrozis) olanlarda karaciğer yetmezliğine yol açabilir. Oluşan hasar bu bölgede sınırlı kalmayıp, aktive olan birçok mekanizma ile ortaya çıkan toksik ürünler, başta akciğer olmak üzere kalp, beyin, böbrekler gibi uzak organlarda hasar oluşturur ve uzun süreli yoğun bakım izlemi gerektirebilecek çoklu organ yetersizliğine (ÇOY) neden olabilmektedir (2,45).

1. İskemi

İskeminin neden olduğu patolojik süreçler sık karşılaşılan ve yaşamı tehdit eden durumlardır (8). İskemi, arteriyel veya venöz kan akımı azalması veya kesilmesine bağlı organ veya dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının sağlanamaması ve oluşan atık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır (1,5). Bu olay, organı perfüze eden kan akımındaki azalmaya bağlı olarak gelişen geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre zedelenmesine yol açar. İskemi sonucu hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikimi sonucu hücre ölümü oluşabilir (5,6). Reperfüzyon ise bu iskemik dokudaki kan dolaşımının ilaçlarla veya mekanik müdahalelerle yeniden sağlanmasıdır. Reperfüzyon sonucu oluşan fonksiyonel bozukluklar organdan organa değişim göstermekle birlikte, şok ve hipoperfüzyon sırasında pek çok organda hasara yol açmaktadır ve pek çok biyokimyasal olaylar kaskadında değişiklikler oluşmaktadır (5,8). Bu olay iskemi reperfüzyon hasarı olarak bilinir ve metabolik, immunolojik ve vasküler olaylardan oluşan bir kompleks hasardır (14). Bir dokuda iskemi ve reperfüzyon sonucu oluşan hasar, dokunun aynı toplam sürede sadece iskemiye maruz kalması sonucu oluşan hasardan daha fazladır (1,6,13).

Karaciğer reperfüzyon hasarı, sıcak İR ve soğuk-depolama reperfüzyon hasarı olarak ayrılır. Sıcak iskemi-reperfüzyon hasarı daha çok karaciğer cerrahisiyle ilgilidir. Soğuk-depolama reperfüzyon hasarı ise daha çok nakil öncesi organ koruması esnasında oluşabilmektedir (5,10). Pratikte daha çok sıcak İR hasarı ile karşılaşabilmekteyiz.

Karaciğer İR hasarı mikroskopik olarak incelendiğinde santral nötrofil lökosit (NL) infiltrasyonu, bölgesel hemoraji ve nekroz, konjesyon, sinuzoidler ve kılcacık damarlarda genişleme, bölgesel hepatoselüler vakuolizasyon, hepatosit şişmesi gibi değişiklikler görünür (8,54).

Karaciğere yönelik sıcak reperfüzyonun erken safhalarında endotelial hücre şişmesi, arteriyollerde endotele bağımlı dilatasyonun bozularak vazokonstriksiyon oluşması, koagülasyon sisteminin aktivasyonu ve platelet agregasyonu, lökosit infiltrasyonu sonucunda mikrosirkülasyonda bir yetersizlik gelişir. İntraselüler ödem nedeniyle , sinusoidal endotel hücreler ve Kupffer hücresinde şişme meydana gelir (2,5).

İkinci faz ise inflamatuvar sitokinler ve serbest oksijen radikallerinin üretilmesi ile ilgilidir. İskemi reperfüzyon sonucunda kupffer hücreleri aktive olur ve bu hücrelerden proteazlar, tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) ve lökotrienler (LT) gibi toksik mediyatörler salınır (54).

Uzamış iskemi hücrede metabolik ve yapısal değişikliklere neden olur ve iskemik dokuların reperfüzyonu ile iskeminin şiddetine ve süresine bağlı olarak, bir kısım hücre nekroz veya apoptozis ile ölüme gider (1).

İskemi sonrası hücre hasarının patogeneğinde olası hücre ödemeine bağlı tekrar kan akımının gerçekleşmemesi fenomeni, Ca^{+2} ’ın hücre içine dengelenmemiş geçişi ve oksijen serbest radikallerinin (superoksid (O_2^-), hidrojen peroksid (H_2O_2), hidroksil (OH^-) gruplarının reperfüzyon sırasında ortaya çıkışı sorumlu tutulmaktadır. Ancak, doku hasarında en önemli rolü, nötröfillerin oynadığı gösterilmiştir (4).

Söz konusu İR hasarında, temelde doku ödemi ve plazma proteinlerine mikrovasküler permeabilite artışı, mikrovasküler yatakta iskemi sonrası endotel hücrelerinden yada makrofajlardan salınan interlökin ve sitokinlerin oluşturduğu nötröfil akümülyasyonu ve adhezyon moleküllerinin bu hücrede ekspresyonunun artması ile trombosit agregasyonu sonucu parankim yada dokuda revaskülarizasyonun engellenmesi sözkonusudur (2).

İskemi sırasında, serbest radikal oluşumunu birçok olay kolaylaştırır. İskemi Adenozin trifosfat (ATP)’ın oluşumunu önleyerek hücre membranında bulunan Na^+/K^+ pompasının çalışması için ATP depoların tükenmesi sonucunda gerekli olan enerji sağlanamaz ve membran iyon dengesi bozulur. K^+ iyonları hücre dışına çıkarken Na^+ ve Cl^- iyonları da hücre içine girerler. Anaerobik glikolizle ATP üretilmeye çalışılır, bu da laktik asit üretimi ile sonuçlanır. Karbondioksitin birikimi karbonik asit (H_2CO_3) üretimi ile sonuçlanır ve asidozun artışına yol açar (6). Kısa süreli iskemi sonrasında özellikle beyin hücrelerinde ekstraselüler pH 7.3’ ten 6.7’ e kadar düşebilmektedir. Adenin trifosfat bağımlı çalışan diğer

bir pompa ise ekstrasellüler ve intrasellüler Ca^{+2} 'u dengelemektedir. ATP metabolizması sonucunda, hücre içinde adenzin monofosfat (AMP) konsantrasyonunda artış olur. İnasellüler Ca^{+2} artışı sonucunda proteolitik enzimler ve fosfolipazlar aktive olurlar. Fosfolipazların aktivasyonu araşidonik asit oluşumu ile sonuçlanır. Araşidonik asit direk etkiyle mitokondriyal enzimleri inhibe eder ve serbest radikal oluşumunu arttırır (1).

Anoksik veya iskemik koşullarda adenzinin ekstrasellüler düzeyi artmaktadır. Bu artış muhtemelen intrasellüler ATP'nin yıkılmasına bağlıdır. İskemi sırasında meydana gelen ATP yıkımı glikolizisi indüklemektedir. Glikolizis ise laktat oluşumunu hızlandırmaktadır (1).

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 A_2 (TxA_2) gibi maddelerin yapımının artması ile birlikte (4).

Karaciğer, parankimal hücreler (hepatositler), Kupffer ve endotelial hücreler gibi parankim dışı hücrelerden oluşmaktadır. Hepatositler, ATP yıkımı ve glutasyon azalmasına bağlı oksidatif stres ve serbest radikal oluşumu gibi biyokimyasal ve fonksiyonel değişikliklerin olduğu yerlerdir. Hepatik iskemi sonrası reperfüzyonda Kupffer hücrelerinin reaktif O_2 çeşitlerinin ana kaynağı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Kupffer hücrelerinin makrofajlar için karaciğerde konak yeri olduğu ve TNF- α , İL-1, İL-6, platelet aktive edici faktör (PAF) ve diğer inflamatuvar medyatörleri ürettiği bilinmektedir. Bu medyatörlerin üretimi karaciğer hasarı oluşumunda önemlidir (8).

Hepatik İR hasarının moleküler mekanizması çok iyi bilinmemektedir. Sitokinler normal hemostaziste ve hasara cevapta yapısal önem taşırlar. Sitokinler lobar hepatik İR sonrası Kupffer hücrelerinden TNF- α salınımının güçlü şekilde aktive ederler. TNF- α nötrofillerin hidrojen peroksid, superoksid anyonlar yada diğer toksik metabolitlerin üretimini başlatır. Sonuçta endotelial hücrelerin nötrofil tarafından hasara uğratılmasını arttırır. İL-1, bir makrofaj sitokini olarak septik şokta daha önemli role sahipken, TNF- α muhtemelen İR sonrası nötrofilin endotele yapışmasını hızlandırmaktadır, ancak iskemi sonrası hepatik lezyonlara PAF'in spesifik fonksiyonu tam anlaşılmamıştır (17).

2. Reperfüzyon Hasarı

Reperfüzyon hasarı, belirli bir süre iskemiye maruz kalan dokuların tekrar perfüze olması sonucu mikrosirkülasyonda görülen tıkanmalar ve tekrar perfüze olan dokunun nekrozu ile karakterize bir yaralanma olarak tanımlanmıştır (10). İskemik dokuda kan akımının yeniden sağlanmasının, enerji gereksiniminin yeniden yapılması ve toksik metabolitlerin ortadan kaldırılması gibi yararlı etkileri olmaktadır (3). İskemik bir dokunun reperfüzyonu, dokunun oksijen ve diğer metabolik ihtiyaçlarını karşılarken paradoksal olarak dokularda hasar oluşturur. Parks ve Granger (13), yaptıkları deneysel çalışmada reperfüzyon ile oluşan hasarın iskemi ile ortaya çıkan hasardan daha fazla olduğunu göstermişlerdir.

Klinik olarak İR hasarı sıklıkla transplantasyon, iskemik serebrovasküler olay (*stroke*), miyokard infarktüsü, şok/resüsitasyon ve turnike uygulamaları sonrasında görülmektedir (3).

İskemi-reperfüzyon (İR) hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bunlar birbiriyle ilişkileri karmaşık, hücrenel ve humoral olaylar serisidir . Özellikle;

- 1) Serbest oksijen radikalleri (SOR) ,
- 2) Polimorf nüveli lökositler (PMNL),
- 3) Kompleman sistemi,
- 4) Endotel hücreleri olmak üzere başlıca dört faktör hasarın nedenleri arasında yer almaktadır (6).

1) Serbest oksijen radikalleri (SOR)

Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, nitrik oksit (NO), uyarılmış nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı olarak sayılabilir. Oluşan hidroksil radikali büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi nedeni ile deoksiribonükleik asit (DNA), protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olur (6).

2) Polimorf nüveli lökositler (PMNL)

İR ile lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonu meydana gelir. PMNL yüksek miktarda serbest oksijen radikalleri üretme kapasitesine de sahiptir. İskemi reperfüzyon hasarında PMNL'in rolü ile ilgili mikrovasküler

oklüzyon, SOR ve sitotoksik enzim salınması, vasküler permeabilite artışı ve sitokin salınmasında artış gibi bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Nötrofillerin dokuya gelebilmeleri için gerekli kemotaktik maddeler arasında C3a ve interlökin-1 (İL-1), lökotrien B4 (LT-B4), trombosit aktive edici faktör (PAF) ve prostaglandin (PG) türleri vardır (1). Aktif lökositler nükleer transkripsiyon faktörlerinin (NF-kB) aktivasyonuna ve tümör nekrozis faktör- α (TNF- α)'ın sentezine yol açar. Bunun sonucu inflamatuvar mediyatörlerin salınmasını uyarırlar. Damar içinde oluşturdukları hücre toplulukları (agregatlar) ve aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya neden olurlar. Araşidonik asitten oluşan lökotrienler trombosit ve lökositlerin, süperoksit ise lökositlerin damar duvarına adhezyonunu arttıırırlar. İnflamatuvar olaylarda salınan TNF- α da, İR hasarında önemli yeri olan, mikrovasküler disfonksiyona ve parankimal hücre hasarına neden olur (3). Permeabilitedeki artış proteinlerin interstisyuma ekstravaze olmasına neden olmakta, bu da ödemle sonuçlanmaktadır. Ayrıca fonksiyonel kapiller damar sayısında azalma olduğu saptanmıştır (3).

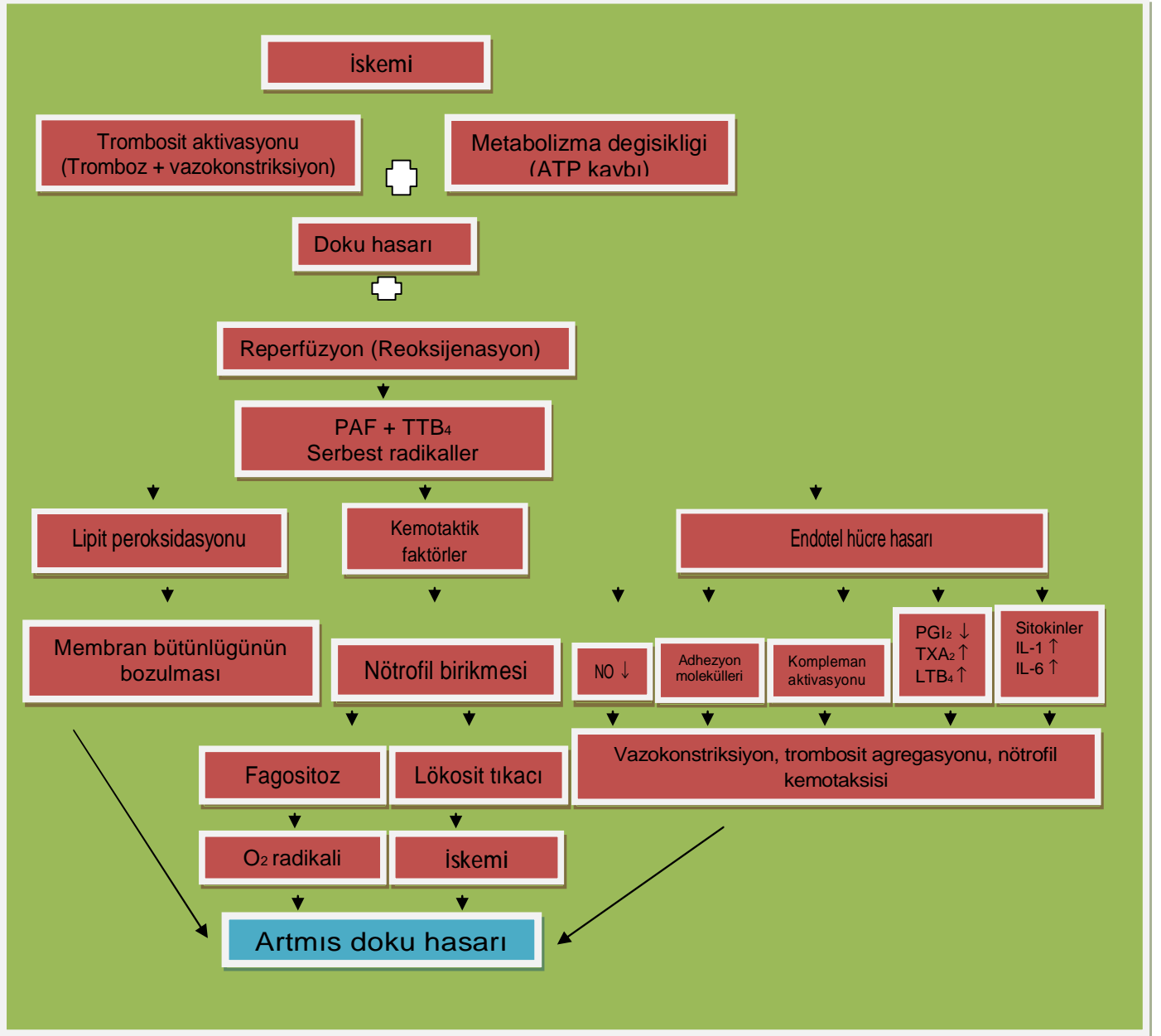
Yapılan çalışmalarda; nötrofillerin aktivasyon ve dokuya infiltrasyon derecesi ile reperfüze dokudaki nekroz ve apoptozis derecesi arasında bir korelasyon olduğu bulunmuştur. İskemik dokunun reperfüzyonu, arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyonun bozulmasına, kapillerlerde lökosit tıkaçlarının oluşmasına ve sıvı filtrasyonunun artmasına, post-kapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına sızmasına ve böylece mikrovasküler fonksiyonun bozulmasına neden olur. Reperfüzyonun başlangıç döneminde, mikrosirkülasyonun tüm segmentlerinde aktive edilmiş endotel hücrelerinden fazla miktarda O₂ oluşurken NO oluşumu ise azalır. Süperoksit radikali ile NO arasındaki dengenin bozulması, endotel hücrelerinden PAF, TNF- α gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınmasına ve lökosit-endotel hücre adhezyonuna aracılık eden adhezyon moleküllerinin biyosentezinin artmasına neden olur (6).

3) Kompleman sistemi

İskemi reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin rolü tam olarak açıklanmamıştır. Kompleman sisteminin aktivasyonu sonunda C3a, C5a, iC3b ve C5b-9 proinflamatuvar komponentlerden oluşur. C3a ve C5a anaflatoksinlerdir ve lökositleri aktive ederler. Lökosit aktivasyonu ve kemotaksisin uyarılması sonucunda C5a, makrofaj inflamatuvar protein, TNF- α , İL-1 ve İL-6 üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı artırır (6).

4) Endotel hücreleri

İR hasarının oluşmasında endotel hücreleri önemli role sahiptir. Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelin (ET)'i ve NO'yu üretir. NO arteriyel dolaşımında ET'in vazokonstriktör etkisini tersine çevirme eğilimindedir. Venlerde ise bunun tersi söz konusudur. İR hasarında endotelin/NO oranı endotelin lehine bozulur ve bunun sonucunda arteriyel vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon olur. Oksidatif stres sonucu kompleman aktive edilir; lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisi ile endotel hücreleri hasara yanıt olarak İL-1, PAF, prostaglandinler (PG I2, PG E2), büyüme faktörleri, endotelin, NO ve Tx A2 salgırlar. Deneysel çalışmalar, reperfüzyon sonrası endotel bağımlı NO'yu inaktive eden süperoksitin büyük kaynağının aktive olan lökositler olduğunu göstermektedir (6).



Şekil 1: İR hasarında yer alan olaylar dizisi (6).

3. Karaciğer İskemi-Reperfüzyon Hasarı

Reperfüzyon, iskeminin süresine bağlı olarak, oksijenize kan akımının başlaması ile hepatosellüler hasara neden olur. Miyokardiyal, intestinal, renal ve hepatik İR modellerinde komplemanın iskemi-reperfüzyon hasarında rol oynadığı gösterilmiştir. Anaflatoksinler ve kompleman aktivasyonu sonucu ortaya çıkan ürünler; karaciğerde nötrofil aktivasyonu, vazokonstriksiyon, mikrosirkülasyonda bozulma, vasküler permeabilitede artış ve hücre lizisi ile ilişkilidir. Ayrıca sitokinler, intrasellüler proteinlerin serbestleşmesi ve reaktif oksijen ürünleri kompleman aktivasyonunda rol oynuyor olabilirler (54).

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 açar. Aşırı Ca^{+2} yüklenmesi, oksijen radikalleri ile başlayan hasarı artırır (1). Oksidatif stres hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna neden olur ve malondialdehit (MDA) açığa çıkar (5,11).

Hücre membranlarının hasarlanması hepatositlerin homeostazını bozarak apoptoz veya nekroza neden olmaktadır (2).

Büyük miktardaki serbest radikaller ve hızlı kan akımı tromboz riskini artırır, bu da karaciğer hücre hasarının büyümesine neden olabilir (3). Mikrodolaşımdaki bozukluğun sinuzoidal endotelial hücre hasarı ve endotelin ve NO gibi vazodilatatör ve vazokonstriktör moleküller arasındaki dengesizliğe bağlı olduğu düşünülmektedir (6).

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 Ca^{+} artışı gözlenmektedir.

2) Geç faz (6–48 saat); nötrofillerin, makrofajların, lenfositlerin ve trombositlerin karaciğere göçü ile inflamasyon yanıtı uyarılmakta ve sinuzoidal kan akımında değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Hepatositlerdeki hasar serbest O_2 radikalleri ve ekstrasellüler sitokinler ile

meydana gelmektedir (5). Karaciğer iskemisini takiben sinuzoidal hücre apoptozu reperfüzyon sonrasında hızla ortaya çıkmaktadır (9).

Karaciğerdeki İR hasarı kolestazı indüklemekte bu da erken ve genellikle geçici olarak safra sekresyonunda azalmaya neden olmaktadır. Safra akımındaki bu değişiklikler artmış ALT ve AST düzeyleri (8), karaciğer miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ve serum bilirubin değerleri ile beraberdir (5). Bu değişikliklerin 1–3 gün içinde geri dönüşümlü olabileceği bulunmuştur.

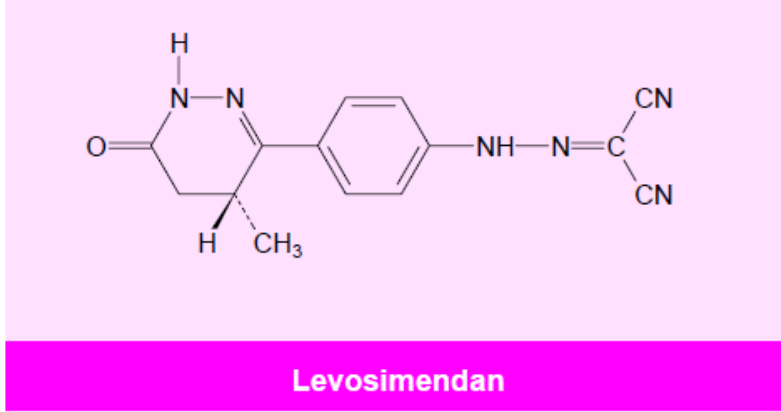
Karaciğer reperfüzyonu sırasında meydana gelen splanknik konjesyon sonucu barsak ve dalaktan salınan proinflamatuvar maddelerin sistemik dolaşıma karışması ile karaciğer ve akciğer hasarı tetiklenmektedir (26).

4. İskemi Reperfüzyon Hasarın Organ Sistemlerine Etkileri

İskemi sonrası dokuda reperfüzyona yanıt olarak ortaya çıkan hasar, diğer organları da etkileyecek kadar ciddi olabilmektedir. İskemi-reperfüzyon hasarın uzak organ etkileri sıklıkla akciğer ve kardiyovasküler sistemde görülmekte ayrıca sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIYS) veya yüksek mortalite oranına sahip çoklu organ yetersizliği (ÇOY) ile sonuçlanabilmektedir. Barsak, karaciğer ve iskelet kası reperfüzyonu sonrası ortaya çıkan ÇOY, ölüme neden olabilmektedir (2,3).

5. Levosimendan

Levosimendan, troponin C (TnC)'ye yüksek bağlanma afinitesi olan, (R)-[[4-(1,4,5,6-tetrahidro-4-metil-6-okso-3-piridazinil)-fenil]hidrazono)propandinitril yapısında, kapalı formülü C₁₄ H₁₂ N₆ O olan, *pyridazinone - dinitrile* türevidir (Şekil 2), cAMP ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırmaksızın kalbin kontraksiyonunu arttıran, inotropik ve vazodilatör etkilere sahip bir ilaçtır (19,48).



Şekil 2: Levosimendanın kimyasal yapısı (19).

Levosimendan kalp yetersizliğinin akut alevlenmesinin kısa dönem tedavisi için geliştirilmiş, miyokardın Ca⁺²'a duyarlılığını artıran ve vazodilatör etkiye sahip yeni bir inotropik ajandır. Teorik olarak bu ajan, hücre içi Ca⁺² ve cAMP düzeylerini artırmaksızın, Troponin-C'ye bağlanarak kontraktil proteinlerin Ca⁺²'a duyarlılığını artırarak kardiyak performansı iyileştirir (19). Ayrıca, levosimendan fosfodiesterazı (PDE) selektif olarak inhibe eder. Diğer Ca⁺² duyarlılaştırıcıların FDE inhibisyonu terapötik dozlarda izlenirken, levosimendanın bu etkisi yalnızca terapötik düzeyin üzerindeki dozlarda izlenmektedir (27,31). Levosimendan miyosit ve damar duvarlarındaki ATP bağımlı K⁺ kanallarını açarak, sistemik vasküler yatakta vazodilatasyona, miyokardiyal önyük ve artyükte azalmaya neden olmaktadır. Levosimendanın K-ATP kanal açıcı etkisi ilacın iskemiye karşı koruyucu etkileri olmasını da sağlamaktadır (19,27,29).

Tablo 1: Levosimendanın mekanizma ve farmakolojik etkileri (33)

Etki yeri	Etki mekanizması	Farmakolojik etki	Terapötik etki
Kardiak Troponin-C-Ca kompleksi	Kalsiyuma duyarlılığı artırır	Pozitif inotropik etki	—Ejeksiyon Fraksiyonda artış — <i>Antistunning</i>
Sarkolemmal K _{ATP} kanallarını aktive eder	Hiperpolarizasyon	Tüm vasküler yataklarda vazodilatasyon (koroner ve periferik damarlarda)	—Preload ve afterload'da düşme —Antiiskemik — Perfüzyonda artış —Nöröhumoral düzelme
Kalp hücrelerinde mitokondriyal K _{ATP} kanalları aktive eder	İskemi–reperfüzyon hasarında mitokondriyal koruma	Önkoşullama, antiapoptotik	—Kardioprotektif etki —Antiiskemik etki —Uzun vadeli yarar

Sürekli sabit dozda infüzyon yapıldığında kararlı duruma 4. saatte ulaşır; ancak daha hızlı etki istendiğinde yükleme dozu infüzyonu ile plazma doruk konsantrasyonuna 12 dk sonra ulaşılır. Levosimendanın yarılanma ömrü 1 saattir. Sadece küçük bir kısmı (~% 4) plazmada serbesttir, > %90 plazma proteinlerine bağlanır. Karaciğer ve barsaklarda metabolize edilir, ekskresyon yoluyla karaciğer ve böbreklerde elimine edilir, 1/3'ü idrarla, 1/3'ü feçesle atılır. Ancak, barsaktaki bakteriler feçesteki metabolitlerin bir kısmını redüksiyonla aromatik bir amin olan aktif OR-1855 metabolitine dönüştürürler. Levosimendan dozunun yaklaşık % 5'i önce aktif bir metabolit olan OR-1855'e, daha sonra da daha aktif olan OR-1896'ya asetile edilir. OR-1896'nın oluşumu yavaşır ve doruk konsantrasyona infüzyonun kesilmesinden 1-2 gün sonra ulaşır; % 40'ı plazma proteinlerine

bağlanır ve yarılanma ömrü yaklaşık 80 saattir. Bu yüzden levosimendanın farmakolojik etkileri ilacın kesilmesinden sonra bir haftaya kadar devam eder.

Seyreltme işlemi %5 glukoz çözeltisi ve %0.9 NaCl ile yapılır, intravenöz infüzyon ile uygulanır. Levosimendan için başlangıçta önerilen tedavi dozu 10 dakikada 6-24 µg/kg yüklemeyi takiben 24 saat boyunca 0.05-0.2 µg/kg/dk dan 24 saatlik sürekli infüzyondur. Hemodinamik etki yükleme dozu verildikten 5 dakika sonra başlamaktadır ve pik etkisine 10-30 dakika sonra ulaşmaktadır. Böbrek yetersizliği ve karaciğer sirozu gibi durumlarda OR-1896 aktif metabolitin etkisi arttığından yarılanma ömrü uzamaktadır (19,27,28).

Levosimendan'ın ventrikül doluşu yada çıkış yolunu etkileyen belirgin mekanik obstrüksiyon, ciddi böbrek yetersizliği (kreatinin klirensi < 30 ml/dk), ileri derecede karaciğer yetersizliği, ciddi hipotansiyon (sistolik kan basıncı < 85 mm Hg) ve taşikardi (kalp hızı >120/dk) ve "*torsade de pointes*" öyküsü bulunan hastalarda kullanılmaması gerektiği bildirilmiştir. En sık görülen yan etkileri baş ağrısı, hipotansiyon, bulantı, sersemlik, taşikardi, miyokard iskemisi, atriyal fibrilasyon, ekstrasistol ve ventrikül taşikardisidir (19,27,28).

Levosimendan, hücre içi kalsiyum ve siklik adenozin monofosfat (cAMP) düzeylerini artırmaksızın, Troponin-C'ye bağlanarak kontraktıl proteinlerin kalsiyuma duyarlılığını yükselterek kardiyak performansı iyileştirir. Pozitif inotropik etkisi kalsiyum konsantrasyonuna bağlıdır. Sistolde Troponin-C'nin N-terminal ucuna bağlanıp, kalsiyum-Troponin-C bağlantısını stabilize eder. Buna karşın, kalsiyum konsantrasyonu ve sensitizasyonu diyastolde azaldığı için diyastolik relaksasyonun etkilenmediği yada iyileştiği ileri sürülmüştür (19,27).

Levosimendan rutinde kullanılan diğer inotropik ajanlardan farklı olarak kalbin oksijen tüketimini, hücre içi kalsiyum düzeyini, apoptozisi ve aritmi riskini artırmadan miyokardın kasılma gücünü artırır. Levosimendanın miyokardiyal kontraktiliteyi artırmadaki asıl etki mekanizması sitoplazmik kalsiyuma kardiyak Troponin-C'nin duyarlılığını artırmasına dayanır. Levosimendan vasküler düz kas hücrelerindeki ATP duyarlı potasyum kanallarının açılmasını sağlayarak arteriyel ve venöz dilatasyona neden olur. Bu etki mekanizması koroner, pulmoner ve sistemik vazodilatasyondan sorumludur (19,27,33).

Levosimendanın miyokardiyal iskemi-reperfüzyon modellerinde kardioprotektif etkilerin olduğu gösterilmiştir (33). Ayrıca kardiyak indeksi, sol ventrikül end-diastolik volümü ve ejeksiyon fraksiyonu artırır. Gastrik mukozal kan akımı, kreatinin klirensi, idrar debisini artırır. Pulmoner vazodilatör potansi olduğu da gösterilmiştir. ARDS ve septik şok modellerinde pulmoner arter basıncı, pulmoner kapiller wedge basıncı ve pulmoner vasküler rezistansı azalttığı gösterilmiştir. Levosimendan renal medulla ve korteks, intestinal ve

hepatik vasküler direnci azaltarak bu organların kan akımını artırır (19,27,33). Septik şok ve septik miyokardiyal disfonksiyonda levosimendanın faydalı olabileceği düşünülmektedir (28,58).

Bazı çalışmalara rağmen levosimendanın karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarında antiiskemik etkileri hakkında çalışma yoktur.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deney; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulundan alınan izin ile gerçekleştirildi. Çalışmamız 21 adet erişkin erkek Wistar-Albino rat (200–250 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 önceki 12 saat boyunca sadece su içmelerine izin verilmiştir. Anestezi, intraperitoneal 80 mg/kg vücut ağırlığına ketamin (Ketalar®, Pfizer Pharma GMBH, Germany) ve 10 mg/kg xylazine hidrokloride (Alfazine®, % 2, Alfasan International, 3440 AB, Woerden, Holland) ile sağlandı, gerektiğinde dozlar tekrarlandı. Denekler biyokimyasal tetkikler için total kan hacimleri toplandığında sakrifiye olmuşlardır.

1. Monitorizasyon

Anestezi altında sağ inguinal bölgeye femur başına paralel olacak şekilde 2 cm genişliğinde insizyon uygulanarak femoral arter disseke edildi ve heparinize serum fizyolojik (100 Ü/mL) sıvı ile yıkanmış 26 gauge kanül (Bıçakçılar, İstanbul, Türkiye) yerleştirildi. Kanülün proksimal ucu basınç transdüserine (MLT844 Physiological Pressure Transducer, Interlab LTD, İstanbul, Türkiye) bağlanarak ortalama arter basınçları kaydedildi. Damar yolu olarak tüm ratların kuyruk veni kullanıldı. Sıvı ve ilaç uygulamaları için 26 gauge kanül (Bıçakçılar, İstanbul, Türkiye) ratların kuyruk venine yerleştirildi.

2. Deney grupları ve protokol

Üç grup oluşturulmuştur.

Grup 1 (Sham, n=7): Laparotomi sonrası hepatik pedikül görüldükten sonra müdahale yapılmadan Grup 2 ve 3 süresi kadar (105 dk) anestezi altında bekletilmiştir.

Grup 2 (İskemi-reperfüzyon, İR, n=7): Laparotomi sonrasında karaciğere 45 dakika total iskemi sonrasında 1 saat reperfüzyon uygulanmıştır.

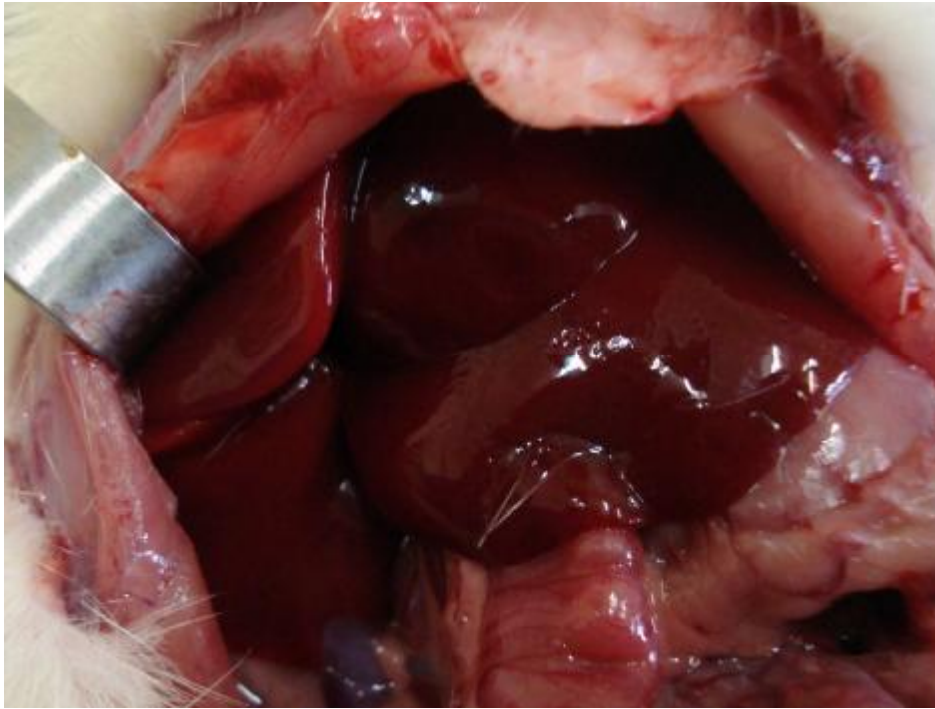
Grup 3 (İskemi-reperfüzyon+Levosimendan grubu, İR+L, n=7): Laparotomi sonrasında karaciğerdeki 45 dakika iskemi süresince Levosimendan infüzyon uygulaması sonrası 1 saat reperfüzyon uygulanmıştır.

Grup 3 (İR+L) deneklerine 10 dk 12 µg/kg yükleme sonrası iskemi süresince 0.2 µg/kg/dk levosimendan infüzyonu (21,24), diğer gruplara aynı hacimde SF infüzyonu başlandı. Gruplara uygulanan sıvı miktarı 10 mL/kg/saat'tir. Klemp açıldığı anda infüzyon sonlandırıldı. Tüm gruplarda toplam çalışma süreleri eşit tutulmuş, kan ve doku örnekleri çalışma sonunda alınmıştır.

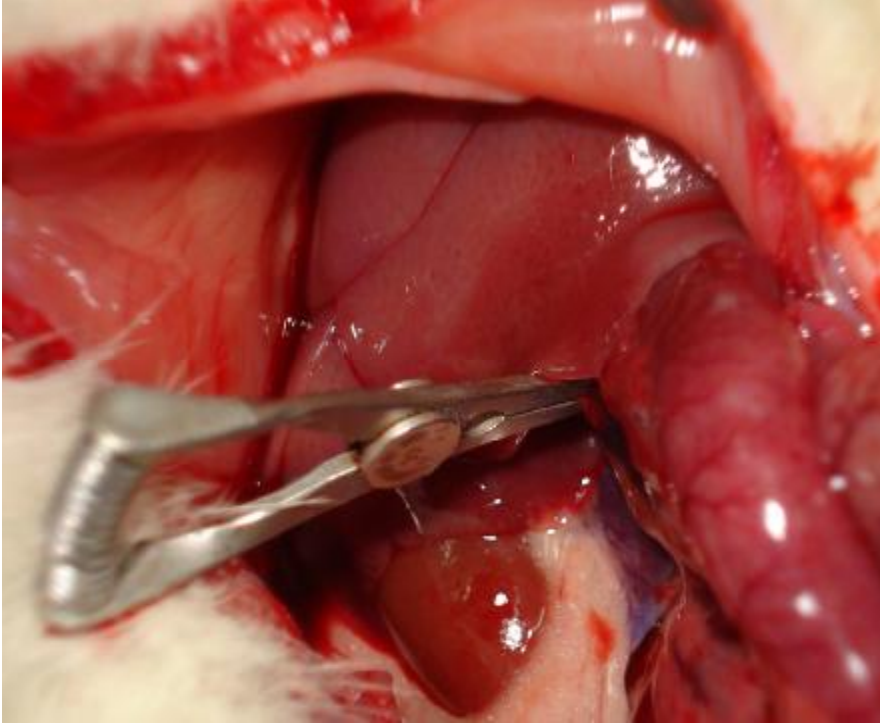
3. Deneysel iskemi – reperfüzyon yöntemi

Deneklerin vücut sıcaklıklarını 36.8-37.5C° arasında tutmak amacıyla çalışma süresince operasyon masası ısıtılmış, ortam ısısı sabit tutulmuştur. Ratlara deney boyunca % 100 oksijen insüfle edilmiştir.

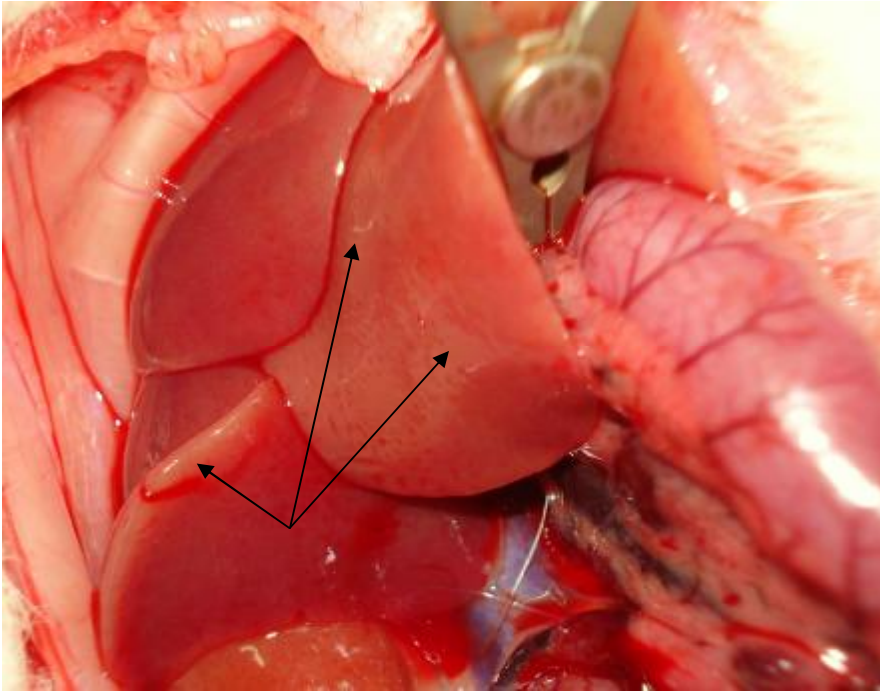
Supin pozisyonda orta hat karın kesisi ile müdahale edilmiş, atravmatik damar klempini ile hepatik pedikül sıkıştırılarak karaciğere giden portal ven ve arter akımı engellenmiştir (Resim 2). Klemp uygulanmadan önce intravasküler koagülasyonu önlemek amacıyla intravenöz 150 İU/kg heparin uygulanmıştır (20). Yeterli oklüzyon hepatik arterde pulsasyon olmaması ve dokunun soluklaşması ile doğrulanmıştır (Resim 3). İskemi amaçlı 45 dakikalık klempaj sonrasında bir saat reperfüzyon sağlanmıştır (Resim 4).



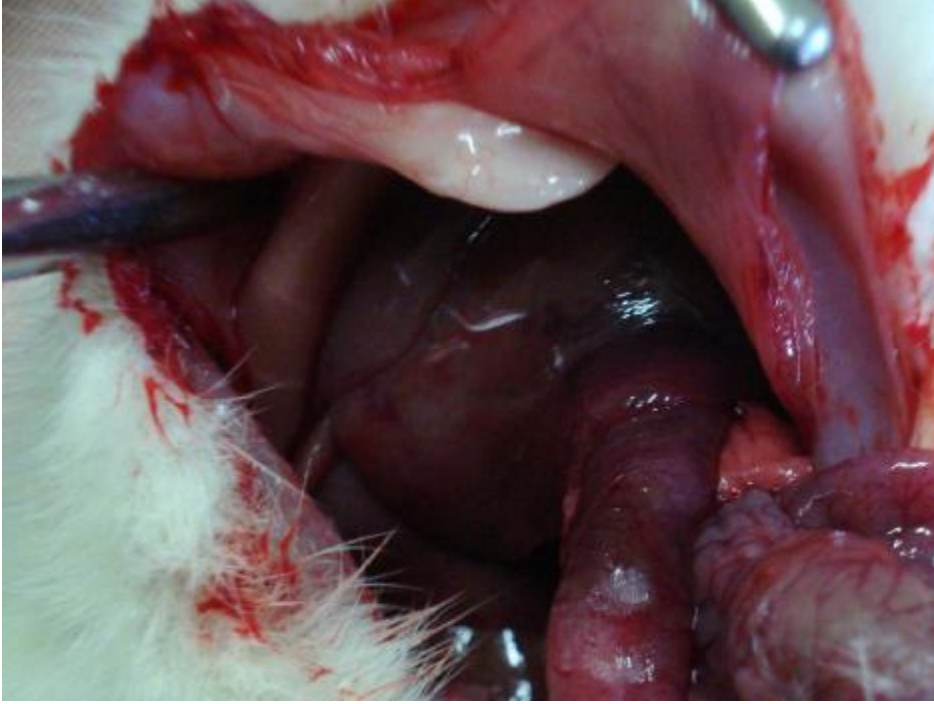
Resim 1: Normal karaciğer dokusu.



Resim 2: Atravmatik damar klempı ile portal ven ve hepatik arter akımın kesilmesi.



Resim 3: Ratin total klempaj ile karaciğer kan akımının kesilmesi (—→).



Resim 4: Ratın klempaj sonrasında 1 saatlik reperfüzyon dönemi

Deneklerin 10 dakika stabilizasyon süresi sonunda bazal (klemp öncesi) (0), 10 dk-lık Levosimendan infüzyon sonu (1), iskeminin 15. (2), 30. (3), 45. dakikası (4), reperfüzyonun 15. (5), 30. (6), 45. (7) ve 60. dakikası (8) OAB değerleri kaydedildi.

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 histolojik karaciğer hasarı, plazmada AST, ALT düzeyleri değerlendirilmiştir.

4. 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 ölçüldü ve değerler U/L olarak değerlendirildi. AST ve ALT yöntemleri için Abbott Diagnostics Architect c16000 analizöründe kendi kitleri ile çalışıldı.

5. Karaciğer Hücre Histolojisinin Değerlendirilmesi

Histomorfolojik İncelemeler

Karaciğer dokusu ışık mikroskopik inceleme için %10'luk formaldehit solüsyonunda 24-48 saat fikse edildikten sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon için sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından 3 farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki farklı ksilene tabi tutulduktan sonra 1'er saatlik 2 kez parafin ile immersiyonu sağlandı. Daha sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µm'lik (Feather S35) parafin kesitler alındı.

Hematoksilen-Eozin Boyaması

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 30 dk. 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dk. (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absölu alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirdi, kesitler distle su ile çalkalandıktan sonra 10 dk. Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dk akarsuda yıkanan kesitler, 2 dk. Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri Absölu alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dk üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

Karaciğer hücre histomorfolojisinin değerlendirilmesi:

Boyama işleminden sonra elde edilen kesitler ışık mikroskopik olarak incelendi (Olympus BX-50 Tokyo, Japonya) ve kesitlerden elde edilen görüntüler yüksek resolüsyonlu bir kamera (Olympus DP-70, Japonya) içeren bilgisayara aktarılarak digital olarak fotoğrafları çekildi. Çekilen digital fotoğraflar digital görüntü analiz programı (UTSCSA; Image tool version 3,0)

ile değerlendirildi. Karaciğer doku örnekleri hepatosit hasarı yönünden incelendi. Hücre histolojisindeki değişimler, konjesyon, nekroz, sitoplazmik vakuolizasyon ve eozinofili, nükleer piknozis ve inflamatuvar hücre yoğunluğu yönünden ışık mikroskopunda değerlendirildi. Karaciğer Histolojik Hasar Skoru (KHHS) kullanıldı. KHHS;

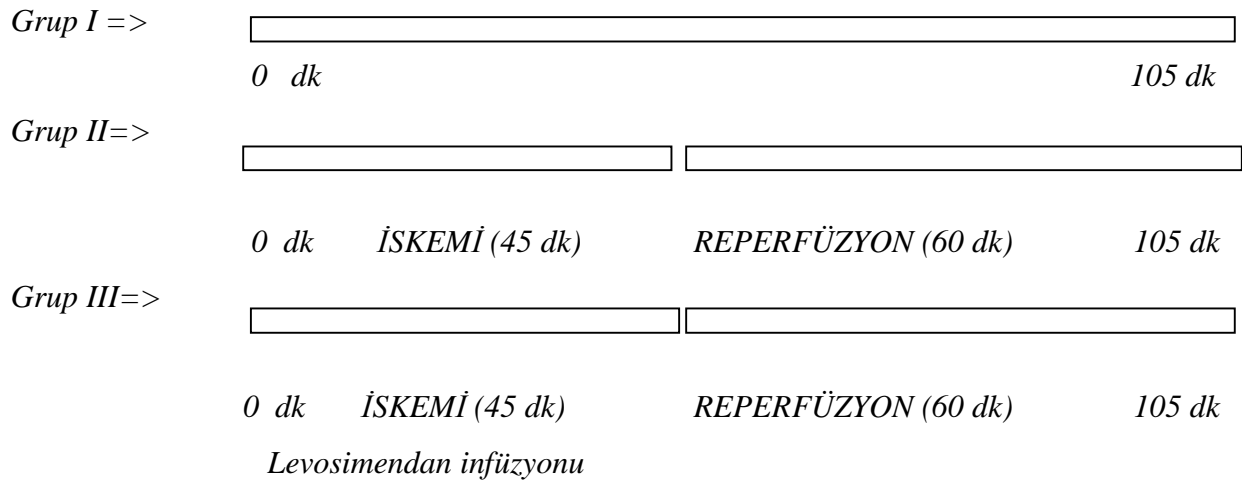
- 0: Hasar yok ya da minimal hasar,
- 1: Hafif hasar,
- 2: Orta hasar,
- 3: Şiddetli hasar şeklinde derecelendirildi (45).

Skorlama tüm gruplarda yedişer örnek üzerinden yapıldı.

6. İstatistiksel Analiz

Gruplar arasında fark olduğu saptamak için Kruskal-Wallis test uygulandı. Fark saptandığında ise farkın nerden kaynaklandığını değerlendirmek için ikili karşılaştırma amacıyla Mann-Whitney U testi kullanıldı, $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

7. Çalışma Gruplarının Şematik Görünümü



İ => İskemi

R => Reperfüzyon

Grup I => Sham, n=7

Grup II => İskemi-reperfüzyon (İ/R), n=7

Grup III => İskemi-reperfüzyon + Levosimendan (İ/R+L), n=7

BULGULAR

DEÜTF Deney Hayvanı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen çalışmaya toplam 21 rat dahil edilmiştir.

1. Ortalama Arteriyel Kan Basınçları

Grupların bazal OAB değerleri arasında fark bulunmadı. Grup 2 (İ/R)'in OAB'da grup 1 oranla, iskeminin 45.dakikasında (p:0.007) ve reperfüzyonun 45. ve 60.dakikalarında anlamlı düşüş (p:0.001 ve p:0.026) saptanmıştır. Grup 3 (İ/R+L)'ün OAB-larının *sham* grubuna göre, 10.dk levosimendan yüklemesi (p:0.011), iskeminin 15.dakikası (p:0.004) ve reperfüzyonun 15. ve 45.dakikası (p:0.038 ve p:0.011) sonrasında belirgin azaldığı izlendi. Grup 3 OAB-1 değerlerinde, grup 2 (İ/R) OAB-a göre, 10.dk levosimendan yüklemesi (p:0.026), reperfüzyonun 15.dk (p:0.038) sonrasında belirgin azalma, 60.dk (p:0.017) sonrasında ise artma izlendi (Tablo 1).

Tablo 2: Ortalama Arteriyel Kan Basıncı Değerleri (mmHg): medyan (minimum-maksimum)

GRUPLAR	Bazal	Yüklemenin 10.dakika	İskemi 15.dakika	İskemi 30.dakika	İskemi 45.dakika	Reperfüzyon 15.dakika	Reperfüzyon 30.dakika	Reperfüzyon 45.dakika	Reperfüzyon 60.dakika
Grup 1 (sham)	87 (75-92)	87(81-92)	94 (88-104)	91 (76-102)	93 (88-97)	90 (81-105)	89(86-97)	91 (86-98)	91 (78-95)
Grup 2 (İ/R)	85 (78-98)	88 (78-95)	90 (76-93)	89 (85-94)	88 (78-90) *	90 (81-108)	90 (85-96)	84 (78-86) *	80 (64-83) *
Grup 3 (İ/R+L)	80 (73-86)	80 (72-83) †‡	85 (80-89) †	89 (86-101)	86 (81-98)	81 (80-91) †‡	86 (80-91)	86 (82-90) †	86 (78-91) ‡

* ; p<0.05: grup 1 ile karşılaştırıldığında

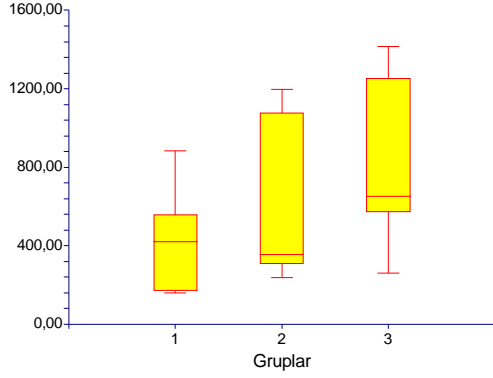
† ; p<0.05: grup 1 ile karşılaştırıldığında

‡ ; p<0.05: grup 2 ile karşılaştırıldığında

2. Biyokimyasal Değerler

Çalışmamızda elde edilen karaciğer fonksiyon testlerinin sonuçları grafiklerde gösterilmiştir.

AST:



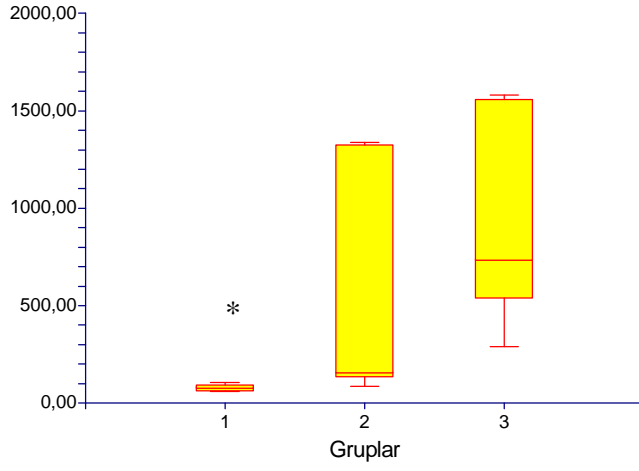
Grafik 1: Plazma AST düzeyleri (U/L)

Çalışmamızda Grup 1 denekleri plazma AST değerlerinde, diğer iki gruba oranla anlamlı fark saptanmadı . Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında da aynı şekilde AST değerlerinde anlamlı fark saptanmadı (Grafik 1).

Tablo 3: Plazma AST düzeyleri, U/L; medyan (minimum-maksimum)

Grup	Plazma AST (U/L)
Grup 1 (Sham)	434 (160-883)
Grup 2 (İ/R)	557 (236-1197)
Grup 3 (İ/R+L)	774 (260-1414)

ALT:



Grafik 2: Plazma ALT düzeyleri (U/L)

*; $p < 0.05$: grup 1 ile grup 2 ve 3 karşılaştırıldığında

Sham grubunda diğer gruplara oranla plazma ALT değerlerinde anlamlı düşüklük bulundu ($p:0.004$ ve $p:0.001$) (Grafik 2).

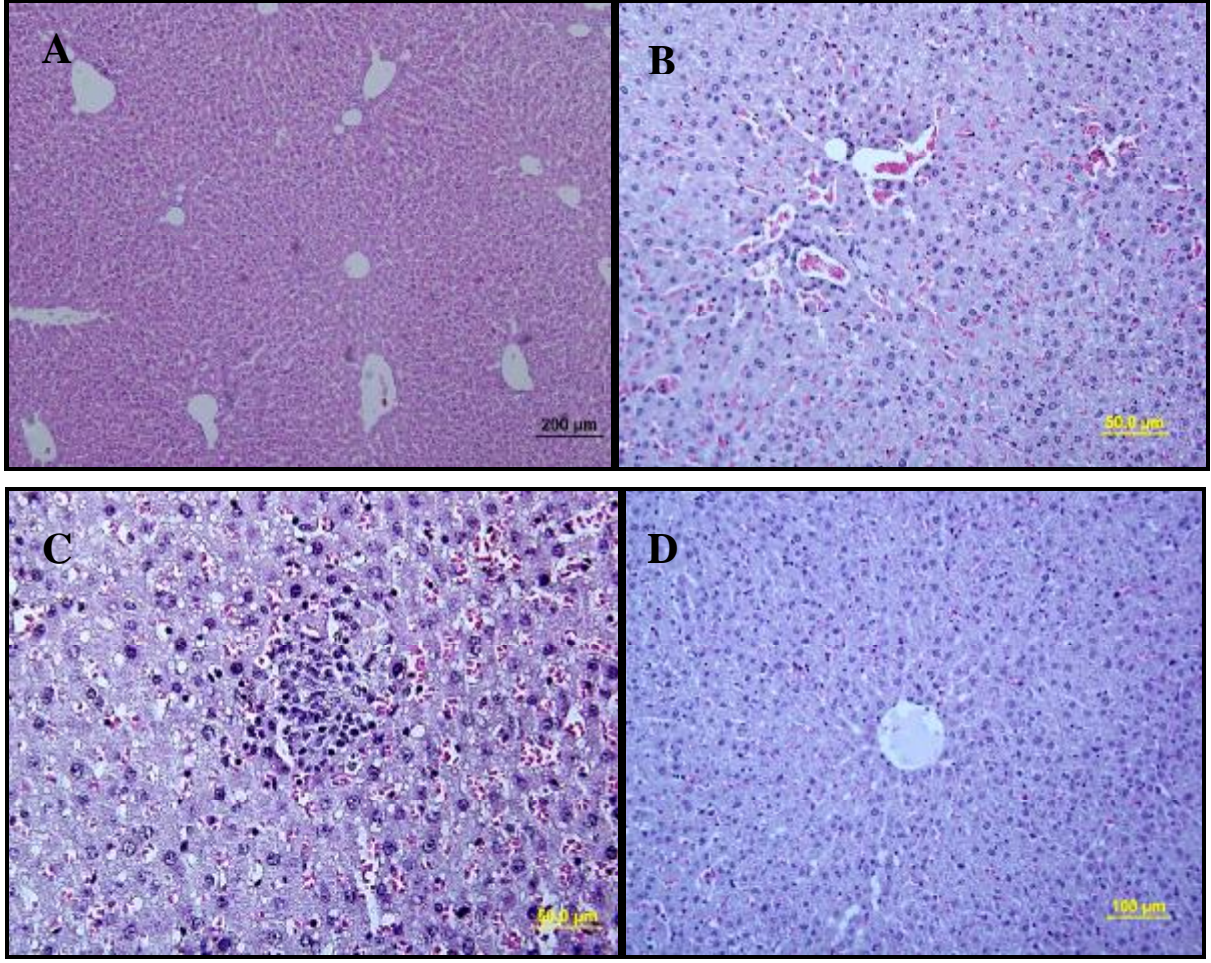
Tablo 4: Plazma ALT düzeyleri, U/L; medyan (minimum-maksimum)

Grup	Plazma ALT (U/L)
Grup 1 (Sham)	82 (59-102) *
Grup 2 (I/R)	526 (87-1337)
Grup 3 (I/R+L)	870 (288-1580)

*; $p < 0.05$: grup 1 ile grup 2 ve 3 karşılaştırıldığında

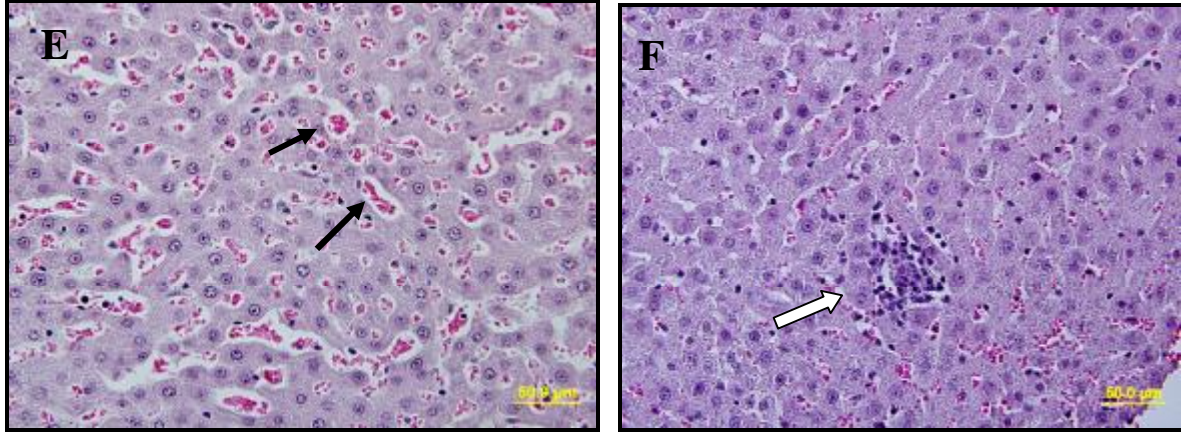
3. Karaciğerin Işık Mikroskopik Bulguları

Karaciğer dokusunun H&E boyasıyla boyanmış kesitlerinin incelenmesi ile gruplar arasında farklı sonuçlar olduğu gözlemlendi (Şekil 3A,B,C,D). Grup 1 (sham)'e ait karaciğer kesitleri incelendiğinde, klasik karaciğer lobülünün ortasında vena sentralis, vena sentralisten ışınsal biçimde periferine doğru uzanan hepatosit kordonları ve bu kordonların arasında yer alan sinüzoidler izlendi. Sinüzoidler normal yapıda ve genişlikte gözlemlendi. Hepatositlerde nükleus yuvarlak ve çoğunlukla ökromatik, sitoplazma ise eozinofilik boyandı. Sinüzoidlerde endotel hücrelerinin nükleusları ise yassı ve koyu boyanmış olarak gözlemlendi. Endotel hücrelerinin arasında ya da lümeneye bakan yüzünde tutunmuş olarak endotel hücrelerinden daha büyük, nükleusları oval ve soluk boyanan Kupffer hücrelerine rastlandı. Portal alanlarda, vena porta, arteria hepatica, safra duktusu ve lenfatik damar normal olarak gözlemlendi. Sham grubuna ait kesitlerde herhangi bir hücre infiltrasyonu gözlemlenmedi (Şekil 3A).

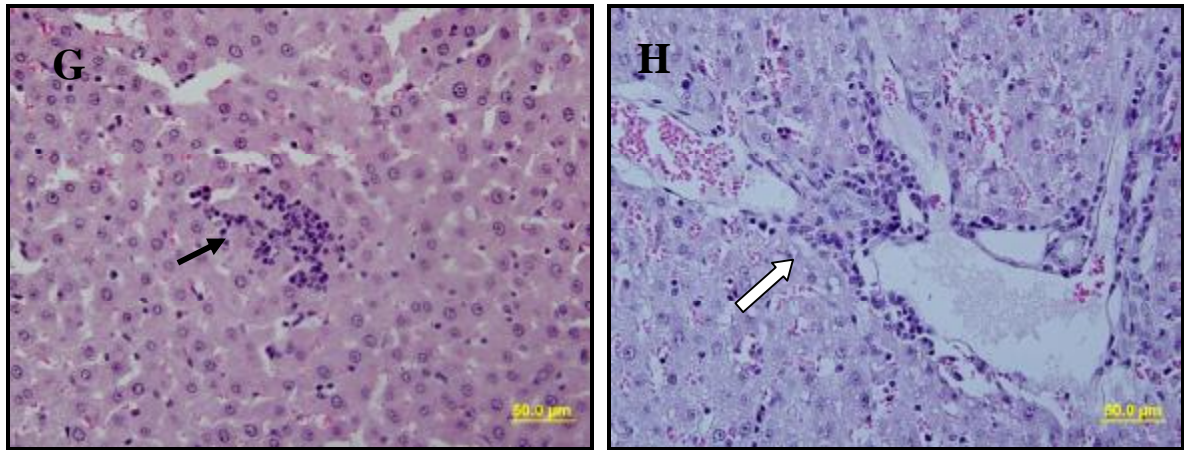


Şekil 3 A,B,C,D: Karaciğer dokusu 1 (Sham) (A), 2 (I/R) (B,C) ve 3 (I/R+L) (D) gruplarına ait genel görüntüler (H&E)

Grup 2'ye ait karaciğer kesitleri incelendiğinde, hepatosit hücre kordonlarının bütünlüğü bozulmuş, sinüzoidlerde dilatasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu ve hepatositlerde fokal nekroz görüldü (Şekil 4 E,F, 5 G,H).

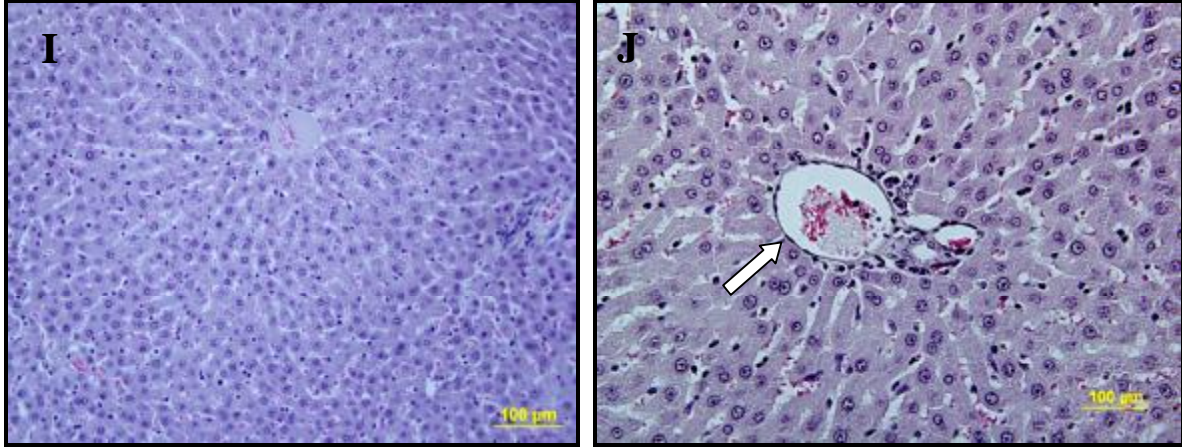


Şekil 4 E,F: Karaciğer dokusu grup 2'ye ait H&E ile boyanmış kesit görüntüleri; hücre kordonlarının bütünlüğü bozulmuş, sinüzoidlerde dilatasyon (→), mononükleer hücre infiltrasyonu ve hepatositlerde fokal nekroz (⇨) görüldü.



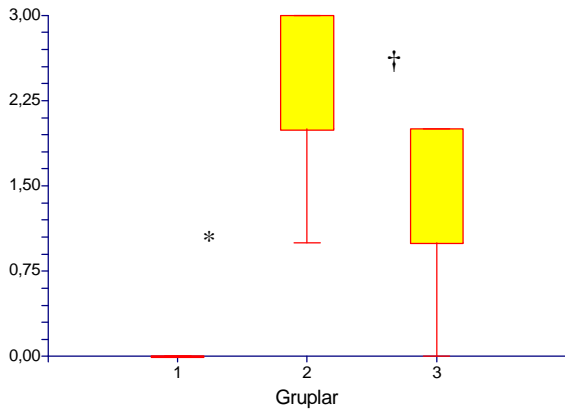
Şekil 5 G,H: Karaciğer dokusu grup 2'ye ait H&E ile boyanmış kesit görüntüleri; sinüzoidlerde dilatasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu (→). Portal alanda dilatasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonu (⇨).

Grup 3'e ait karaciğer kesitleri incelendiğinde, hepatosit hücre kordonlarının bütünlüğü grup 2'ye göre daha düzenli, sinüzoidlerde daha az derecede dilatasyon, daha az mononükleer hücre infiltrasyonu ve hepatositlerde daha az dejenerasyon görüldü. Ayrıca bazı bölgelerde nadir olarak fokal nekroz gözlemlendi (Şekil 6 I,J).



Şekil 6 I,J: Karaciğer dokusu İR+L grubunda ise hepatosit hücre kordonlarının bütünlüğü kontrole göre daha düzenli, sinüzoidlerde daha az derecede dilatasyon; portal alan normale yakın görünümde (⇒).

4. Karaciğer Histolojik Hasar Skoru (KHHS):



Grafik 3: Gruplarda KHH Skor bulguları

*; $p < 0.05$; grup 1 ile grup 2 ve 3 karşılaştırıldığında

†; $p < 0.05$; grup 2 ile 3 karşılaştırıldığında

KHH Skoru grup 1'de diğer 2 gruba oranla anlamlı düşük izlendi ($p<0.05$). İR+L grubunda ise KHHS İR grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$).

Tablo 5: Gruplarda KHH Skor bulguları; medyan (minimum-maksimum)

GRUPLAR	HİSTOLOJİK SKOR
<i>Grup 1 (Sham)</i>	<i>0 *</i>
<i>Grup 2 (İR)</i>	<i>2,14 (1-3)</i>
<i>Grup 3 (İR+L)</i>	<i>1,14 (1-2) †</i>

*; $p<0.05$; grup 1 ile grup 2 ve 3 karşılaştırıldığında

†; $p<0.05$; grup 2 ile 3 karşılaştırıldığında

TARTIŞMA

İskemi-reperfüzyon hasarı karaciğer travmaları, karaciğer rezeksiyonu ve karaciğer transplantasyonu sonrası ortaya çıkabilen klinik bir problemdir (5). Cerrahi esnasında ortaya çıkan kanamayı kontrol altına alabilmek morbidite ve mortalite açısından önemli olduğu için, karaciğerin vasküler izolasyonu ile kan kaybı en aza indirilmelidir (11,53).

Karaciğer cerrahisi esnasında parankimal kanamayı azaltma ve cerrahi tekniği uygulama kolaylığı açısından sıklıkla portal triadın klemp vasıtası ile sıkıştırılması (“*pringle*” manevrası) uygulanmaktadır (8,11). *Pringle* manevrası ilk defa 1908 yılında *Pringle* tarafından tarif edilmiştir. *Pringle* manevrası esnasında hepatik arter ve portal venin klempajı yapılmaktadır (53). Geçici olarak kan akımının kesilmesi ile iskemi, kan dolaşımının tekrar sağlanması ile de reperfüzyon oluşmaktadır. *Pringle* manevrası karaciğer perfüzyonunu bozarak ciddi hemodinamik değişikliklere ve tehlikeli hepatik parankim hasarına sebep olabilmektedir (11). Hepatik arter ve portal venin klempajı uygulandığında iskemik dönemde hücre hasarı olurken, reperfüzyon döneminde bu hasar daha da artmaktadır (53). Ayrıca cerrahi girişim olmadan da bir hemodinamik veya kardiyojenik şok (3,4), dissemine intravasküler koagülasyon (5,6), kanser nedeniyle uygulanan kemoterapi, endotoksemi (10,16), travma ve yanık (15), pankreatit, abdominal kompartman sendromu sonucunda bu durum oluşabilir. Karaciğer hem iskemi hem reperfüzyon esnasında hücre hasarına oldukça hassas bir organdır ve bu durum fonksiyonel yetmezlikle sonuçlanabilmektedir.

Karaciğerdeki İR hasarı kolestazi indükleyerek safra sekresyonunda geçici azalmaya neden olmaktadır ve safra akımındaki değişiklikler ALT, AST düzeyleri ve serum bilirubin değerlerinde artmayla sonuçlanmaktadır. Bu değerlerin artışı 1–3 gün içinde normale dönmektedir. Hepatik İR hasarının, hücresel etki düzeyinin en iyi göstergeleri serum AST, ALT, laktat dehidrojenaz (LDH) gibi enzim aktiviteleri ve histopatolojik değişimlerdir (10,11).

DeneySEL karaciğer İR modellerinde, total veya parsiyel iskemi yöntemleri kullanılabilir. Hemodinamik stabilite bozulmadan hasar oluşturulan total karaciğer iskemi süresi en az 25 dk olarak saptanmıştır. DeneySEL çalışmalarda belirtilen en uzun sıcak iskemi süresi 90 dakika iken kabul edilebilir sıcak iskemi süresi yaklaşık 60 dakikadır (11,53). Çalışmamızda klinik uygulamalara yakınlığı nedeniyle 45 dk’lık total iskemi süresi seçilmiştir.

Karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarından sorumlu tutulan birkaç mekanizma mevcuttur. Açıklanan tüm mekanizmalar birbiriyle ilişkilidir ve bu nedenle tek tek mekanizmalar ve medyatörlerle koruyucu bir etkinlik sağlamak oldukça zordur.

İskemi-reperfüzyon hasarını azaltmak amacıyla birçok ajan ve yöntem ile birçok çalışmalar yapılmıştır. Hasarı önlemek amacıyla hepatik kan akımının artırılması ve inflamatuvar olayların kontrol altına alınması günümüzde giderek önem kazanmaktadır. Vasküler oklüzyonlar üzerine pek çok çalışma yapılmıştır. Serbest radikal ve nötrofil inhibitörleri, antioksidanlar, önkoşullama, hipotermi gibi fizyolojik, farmakolojik ve yapısal tedavi prensipleri denenmiştir (1,2,12). Ancak halen ideal bir ajan bulunamamıştır.

İnotrop ve vazodilatör özelliklerine sahip olan Fosfodiesteraz inhibitörlerin intestinal ve hepatosplenik kan akımını artırdığı ve hepatosplenik organları korumada olumlu etkileri gösterilmiştir. Tip III Fosfodiesteraz inhibitörleri ile hepatik sinüsoidal endotel hücrelerinin korunması, hücre içi kalsiyum düzeyinin regülasyonu, platelet agregasyonunun inhibisyonu, antiinflamatuvar etki ve nötrofil kaynaklı reaktif oksijen radikallerin salımının inhibisyonu gibi mekanizmalarla açıklanabileceğini düşünülmektedir (53).

Küçük ve ark. (53) tarafından, Levosimendan benzeri inotrop ve vazodilatör etkilere sahip olan tip III Fosfodiesteraz inhibitörü (PDE III inh.) olan Amrinon ile yapılan deneysel çalışmada, iskemi-reperfüzyon grubuna göre Amrinon grubunda karaciğer hasarının gerek morfolojik, gerekse fonksiyonel olarak azalmış olduğu gösterilmiştir.

Ağırlıklı kalp yetersizliği olan hastalarda kullanılan, diğer inotrop ve vazodilatör ajan olan Levosimendan ile birçok deneysel iskemi-reperfüzyon modeli çalışmaları yapılmıştır. Asıl etki mekanizması sitoplazmik kalsiyuma kardiyak Troponin-C'nin duyarlılığını artmasına dayanır. Bu inotropik etki sırasında hücre içi kalsiyum düzeyinin artmaması en önemli özelliktir. Ayrıca vasküler düz kas hücrelerindeki ATP duyarlı potasyum kanallarının açılmasını sağlayarak arteriyoler ve venöz dilatasyona neden olur. Bu etki mekanizmasıyla koroner, pulmoner, portal ve sistemik vazodilatasyondan sorumludur (19). Levosimendan miyokardın oksijen tüketimini artırmadan kardiyak kontraktıl performansta iyileşme, vazodilatasyon, kalbin hem önyük hem de ardyükünü azaltarak anti-iskemik etkiler göstermektedir (27,28). Levosimendan, pimobendan ve milrinonun kalp debisinin bölgesel dağılımına etkileri deneysel olarak araştırılmış, ilaçların hemodinamik etkileri benzer bulunmakla birlikte, levosimendanın ince barsak ve karaciğer kan akımını artırdığı

belirlenmiştir (59). İskemik kalplerde Levosimendanın Amrinon'a göre daha güçlü bir inotropik etki gösterdiği bulunmuştur ve bu etkinin fosfodiesteraz inhibe edici özelliğine ek olarak kalsiyuma duyarlılığı artırıcı özelliğine bağlı olduğu düşünülmüştür (55).

Yapılan bazı deneysel çalışmalarda levosimendanın kardiyoprotektif, antiinflamatuvar ve antiapoptotik (27,30), antiiskemik ve antitrombotik (23) etkileri gösterilmiştir. Levosimendanın immuno-inflamatuvar yanıt üzerine yararlı etkileri olduğu ve TNF- α 'nın plazma düzeylerinde anlamlı bir azalma sağladığı gösterilmiştir (30).

Yakut ve ark. (25) deneysel renal İR hasarı esnasında levosimendanın histolojik skor (tübüler nekroz, atrofi, hidropik dejenerasyon) ve lipid peroksidasyonunu azalttığını, proinflamatuvar sitokinler ve apoptotik mediyatörleri düşürerek antiinflamatuvar ve antiapoptotik özellik gösterebildiğini belirtilmişlerdir.

Levosimendan K-ATP kanallarını açarak koroner vazodilatasyon yaparak kardiyoprotektif etki göstermektedir. Yapıcı ve ark. (24) soğuk kardiyoplejik arrest uygulanmış deneysel miyokardiyal hipotermik iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine levosimendanın antiiskemik özelliklerini araştırmışlar ve doku malondialdehid ve miyeloperoksidaz enzim aktivitesini düşük olarak saptamışlardır.

Lafçı ve ark. (20) yaptıkları çalışmada spinal kord hasarı üzerine levosimendanın antiiskemik özelliklerini araştırmışlar ve vazodilatör, trombosit agregasyon inhibitörü ve sitoprotektif özellikleri bilinen prostasiklin analogu olan ilioprost ile benzer etkileri olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada ilioprost ve levosimendan gruplarında kontrol grubuna göre daha iyi histopatolojik ve nörolojik sonuçlar gösterilmiştir.

Başka benzer bir çalışmada Katırcıoğlu ve ark. (21) tavşan spinal İR modelinde, iskemi öncesi 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 10 dk levosimendan yüklemesini takiben 30 dk iskemi süresince 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dk}$ infüzyon uygulayıp 24 saat reperfüzyon sağladıkları çalışmalarında, *Tarlov* skoru ve MDA değerlerini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulmuşlardır. Spinal kord iskemi reperfüzyon hasarında levosimendan grubunda daha iyi histopatolojik sonuçlar elde etmişlerdir. Levosimendanın PDE III inhibisyonu yaptığı, PDE III enzim inhibitörlerinin inflamatuvar sitokinlerin baskılanmasına yol açtığı bildirilmiştir. Bu çalışmada levosimendanın spinal İR hasarına karşı koruyucu olduğunu ve bu koruyucu etkinin kan akımını arttırması, K-ATP kanallarını açmasının yanı sıra PDE III enzimini inhibe etmesine bağlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Levosimendan için önerilen klinik dozu 6-24 µg/kg bolus sonrası 24 saat 0.05-0,2 µg/kg/dk infüzyon olarak bildirilmiştir (27). Hafif ve orta şiddette karaciğer bozukluğunda levosimendan infüzyonu sonrası ilacın farmakokinetik etkilerinin değişmediği gösterilmiştir ama OR-1896 ve OR-1855 metabolitlerin aktivitesi uzayacağından dikkatli doz ayarlanması yapılması önerilir (26).

Biz, levosimendan uyguladığımız grupta laparotomi öncesi hepatik arter ve portal ven klemplenmeden önce 10 dakika boyunca 12mcg/kg dozunda Levosimendan ile yükleme uyguladık. Hepatik pedikül serbestleştirildikten sonra klemp yardımıyla uygulanan 45 dakikalık total karaciğer iskemisi boyunca 0.2mcg/kg/dk dozunda Levosimendan infüzyonu sürdürdük. Klemp açıldığı anda infüzyon sonlandırıldı ve 1 saat reperfüzyona izin verildi. Yükleme dozu verildikten sonra 10-30 dakika içinde etki pik yapar ve miyozit ve vasküler düz kas hücrelerinde ATP bağımlı potasyum kanallarını açarak sistemik vasküler yatakta vazodilatasyona yol açarak hipotansiyona neden olur (19,31). Bolus sonrası 10.dk sonra başlayan ve iskeminin 15. dk-ya kadar devam eden OAB de azalma beklenen bir sonuçtur. Klempaj kaldırıldıktan sonra 15 dk., 45 dk. (sham grubuna göre) ve 60 dk. (grup 2'ye göre)'larda OAB-larında anlamlı bir düşüş izlendi.

Hepatik İR hasarının, hücresel etki düzeyinin göstergeleri olan serum AST, ALT değerlerini karşılaştırırken AST değerlerinde gruplar arasında herhangi fark saptamadık. ALT değerlerinde ise sham grubunda diğer gruplara göre anlamlı fark saptadık, ancak iskemi uyguladığımız ve levosimendan verdiğimiz gruplar arasında anlamlı fark saptamadık.

Histopatolojik değerlendirmede mikroskopik incelemede kontrol grubunda hepatosit bütünlüğü bozulmuş, sinüzoidlerde dilatasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu ve hepatositlerde hidrofik dejenerasyon ve bazı bölgelerde fokal nekroz gözlemlendi. İR+L grubunda ise İR grubuna göre hepatosit hücre kordonlarının bütünlüğü daha düzenli, sinüzoidlerde daha az derecede dilatasyon, daha az mononükleer hücre infiltrasyonu ve hepatositlerde hidrofik dejenerasyon görüldü. Fokal nekroz da bazı bölgelerde daha nadir olarak gözlemlendi. İstatistiksel olarak levosimendan uygulanan iskemi-reperfüzyon grubundaki hasar skoru kontrol grubuna göre daha iyi sonuçlar vermiştir.

Bu çalışma levosimendanın karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarını engellemede etkisini sorgulayan ilk araştırmadır. Sonuç olarak, sıçanlarda yapılan deneysel karaciğer iskemi-reperfüzyon modelinde Levosimendan uygulanması karaciğer hasarını histopatolojik düzeyde azaltmıştır. Araştırmamızın sonuçları, Levosimendanın karaciğer iskemi reperfüzyon hasarındaki muhtemel koruyucu rolünün daha geniş deneysel ve klinik çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanaatini doğurmuştur.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu deneysel çalışmada rat karaciğer iskemi-reperfüzyon modelinde, ön tedavi olarak verilen levosimendanın total klempaj sonucu oluşan iskemik karaciğer hasarı üzerine etkileri, ALT-AST değerleri ve histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.

AST ve ALT değerlerinde İR ve İR+L gruplar arasında anlamlı fark saptamadık. Bu çalışmada biokimyasal olarak TNF- α düzeyi çalışılmamıştır.

Levosimendan, histopatolojik olarak iskemi-reperfüzyon hasarını azaltmıştır.

İskemi-reperfüzyonun klinik tedavisinde rutin olarak yer almayan levosimendanın erken dönem uygulaması karaciğer hasarını azaltabilir.

Bu sonucun deneysel ve klinik çalışmalar ile desteklenmesi ve araştırmaların devam edilmesi uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br. J. Surg.* 1994;81:637-647
2. Carden D. L., Granger D. N. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J. Pathology* 2000;190:255-66
3. Holger K.Eltzschig, Charles D.Collard. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *British Medical B.* 2004;70:71-86
4. Collard C.D., Gelman S. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesthesiology* 2001;94(6):1133-1138
5. Baykara B., Tekmen I. Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2005;19(3):185-194
6. Göksel Şener, Berrak Ç. Yeğen. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim* 5-13
7. Ildefonso JA, Arias-Díaz J. Fisiopatología del síndrome hepático por isquemia-reperfusion. *CirEsp.* 2010. doi:10.1016/j.ciresp.2009.11.009
8. K.Atila, A.Çöker, O.Sagol, I.Çöker, Ö.Topalak, H.Astarcioğlu, S.Karademir, I.Astarcioğlu. Protective effects of carnitine in an experimental ischemia-reperfusion injury. *Clinical Nutrition* 2002;4:309-313
9. Eduardo E. Montalvo-Jave, Tomas Escalante-Tattersfield, Jose A. Ortega-Salgado, Enrique Piña, David A. Geller Factors in the pathophysiology of the liver ischemia reperfusion injury *J Surg Res.* 2008 June 1; 147(1): 153–159. doi:10.1016/j.jss.2007.06.015.
10. E.Uz, H. R. Yılmaz, M. Iraz, Ersin Fadiloğlu, H. Özyurt, S. Söğüt, Ö. Akyol. Effects Of Vitamin E And Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) On Metabolic Enzymes Of Rats With Experimental Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Ege Tıp Dergisi* 2002; 41(2): 77 – 82.
11. Ü.Topaloğlu, M.Odabaşı, M.Güran, A.Özcan, İ.Onaran, N.Karadağ, Ö.Peker, S.Ünalmişer. Karaciğer Rezeksiyonu Esnasında Sürekli İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve Prostaglandin E2'nin Rolü. *Ulusal Travma Dergisi* 1999; 5(2): 67-73
12. Cheng-You Wang, Yong Ni, Yan Liu, Zhi-Heng Huang, Min-Jie Zhang, Yong-Qiang Zhan, Hai-Bin Gao. Mild hypothermia protects liver against ischemia and reperfusion Injury. *World J Gastroenterol* 2005; 11(19): 3005-3007
13. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol.* 1986; 250(6 Pt 1): 749-753
14. P.Chattopadhyay, N.Verma, A.Verma, T.Kamboj, N.A. Khan, A.Kumar Wahi. L-Arginine Protects from Pringle Manoeuvre of Ischemia-Reperfusion Induced Liver Injury. *Biol. Pharm. Bull.* 2008; 31(5): 890-892

15. Juan C. Cutrn, Maria-Giulia Perrelli, Barbara Cavalieri, Carmen Peralta, Joan Rosell Catafau, Giuseppe Poli. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning . *Free Radical Biology and Medicine* 2002; 33(9): 1200-1208
16. Spapen H. Liver Perfusion in Sepsis, Septic Shock, and Multiorgan Failure *The Anatomical Record.* 2008; 291: 714–720
17. Mao Mao Ma and Zhen-Hua Ma. Effect of tumor necrosis factor-alpha in rats with hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2008; 7 :296-299
18. Yan-Ling Yang, Ji-Peng Li, Xiao-Ping Xu, Ke-Feng Dou, Shu-Qiang Yue, Kai-Zong Li. Protective effects of tumor necrosis factor α antibody and ulinastatin on liver ischemic reperfusion in rats. *World J Gastroenterology* 2004; 10(21): 3161-3164
19. Figgitt D.P., Gillies P.S., Goa K.L. Levosimendan. *Drugs* 2001; 61(5) :613-627
20. Lafçı B., Yaşa H., İlhan G., Ortaç R., Kestelli M., Gökdoğan T., Gürbüz A. Protection of the Spinal Cord from İschaemia: Comparative Effects of Levosimendan and İliprost. *European Surgical Reserch* 2008; 41: 1-7
21. Katircioglu S.F, Seren M., Parlar A.İ., Turan N, Manavbasi Y. et al. Levosimendan Effect on Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury Following Aortic Clamping. *J CARD SURG* 2008; 23: 44-48
22. Ersoy O., Budak A.B., Mungan U., Tutun U., Parlar A.İ., Cicekcioglu F., Ulus A.T., Katircioglu S.F. Levosimendan for Ischemic Preconditioning in Thoracic Aortic Aneurysm Repair. *J CARD SURG* 2008; 23: 251-253
23. Kaptan K., Erinç K., İfran A., Yıldırım V., Uzun M., Beyan C., Isık E. Levosimendan has an inhibitory effect on platelet function. *American Journal of Hematology* 2008; 83:46–49
24. Yapıcı D., Altuncan Z., Özeren M., Bilgin E. et al. Effects of Levosimendan on Myocardial ischemia-reperfusion injury. *European Journal of Anaesthesiology* 2008; 25(1); 8-7
25. Yakut N., Yasa H., Lafci B.B., Ortac R., Tulukoglu E. , Aksun M., Ozbek C., Gurbuz A. The influence of levosimendan and iloprost on renal ischemia_reperfusion: an experimental study *Interact CardioVasc Thorac Surg* 2008; 7: 235-239
26. Puttonen J., Kantele S., Ruck A., Ramela M., Häkkinen S., Kivikko M., Pentikäinen P.J. Pharmacokinetics of Intravenous Levosimendan and Its Metabolites in Subjects With Hepatic Impairment. *Journal of Clinical Pharmacology* 2008; 48: 445-454

27. Antoniadou C., Tousoulis D., Koumallos N., Marinou K., Stefanadis C.. Levosimendan: Beyond its Simple Inotropic Effect in Heart Failure. *Pharmacology & Therapeutics* 2007; 114: 184-197
28. Kamath S.R., Jaykumar I., Matha S. Levosimendan. *Indian Pediatrics* 2009 ; 46(17): 593-596
29. Oguzhan Yildiz. Vasodilating Mechanisms of Levosimendan: Involvement of K⁺ Channels. *Journal of Pharmacological Sciences* 2007; 104: 1 – 5
30. Paraskevaïdis I.A., Parissis J.T., Kremastinos D.T. Anti-Inflammatory and Anti-Apoptotic Effects of Levosimendan in Decompensated Heart Failure: A Novel Mechanism of Drug-Induced Improvement in Contractile Performance of the Failing Heart. *Curr. Med. Chem. – Cardiovascular & Hematological Agents* 2005; 3: 243-247
31. Kivikko M., Lehtonen L., Collucci W.S. Sustained Hemodynamic Effects of Intravenous Levosimendan. *Circulation* 2003; 107: 81-86
32. H.Yasa, N.Yakut, B.Emreçan, K.Ergunes, R.Ortac, N.Karahan, C.Ozbek, A.Gurbuz. Protective Effects of Levosimendan and Iloprost on Lung Injury Induced by Limb Ischemia-Reperfusion: A Rabbit Model. *Journal of Surgical Research* . 2008;147:138–142
33. Pollesello P., Papp Z. The Cardioprotective Effects of Levosimendan: Preclinical and Clinical Evidence. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; 50: 257–263
34. Erbüyün K., Vatanserver S., Tok D., Ok G., Türköz E., Aydede H., Erhan Y., Tekin I. Effects of Levosimendan and Dobutamine on Experimental Acute Lung Injury in Rats. *Acta Histochemica* 2008
35. Hardev Ramandeep Singh Girn, Sashi Ahilathirunayagam, Andrew I. D. Mavor, Shervanthi Homer-Vanniasinkam. Reperfusion Syndrome: Cellular Mechanisms of Microvascular Dysfunction and Potential Therapeutic Strategies. *Vascular and Endovascular Surgery* 2007; 41(4): 277-293
36. Dubin A. Maskin B. Murias G. et al. Effects of levosimendan in normodynamic endotoxaemia: a controlled experimental study. *Resuscitation* 2006; 69: 277-286
37. Yılmaz S., Ateş E., Tokyol Ç. et al. The protective effect of erythropoietin on ischemia /reperfusion injury liver. *HPB* 2004; 6(3): 169-173
38. Pevni D., Frolkis I. et al. New evidence for the role of TNF- α in liver ischaemic/reperfusion injury. *European Journal of Clinical Investigation* 2008;38: 649-655
39. Meng Wang, Feng Shen, Le-Hua Shi, Tao Xi, Xi-Feng Li, Xu Cheng; Meng-Chao Wu Protective effects of prednisolone on ischaemia - induced liver injury in rats. *World journal of Gastroenterology* 2008; 14(27): 4332-4337

40. Pronobesh C., Dagagi A.V., Pallab C., Kumar W.A.. Protective role of the calcium channel blocker amlodipine against mitochondrial injury in ischemia and reperfusion injury of rat liver. *Acta Pharm.* 2008; 58: 421–428
41. O. Erdoğan , S. Yıldız, A. Başaran, A. Demirbaş, A. Yeşilkaya. Effect of intraportal verapamil infusion on hepatic ischemia-reperfusion injury. *Pol. J. Pharmacology* 2001; 53: 137–141
42. Rhodes S.S., Ropella K.M., Amadou K. S. Camara, Qun Chen, Riess M.L., Pagel P.S., Stowe D.F. Ischemia- reperfusion injury changes the dynamics of Ca²⁺-contraction coupling due to inotropic drugs in isolated hearts *J Appl Physiol* 2006; 100: 940–950
43. Robert B. Jennings, Charles E. Ganote, Keith A. Reimer. Ischemic Tissue Injury. *American Journal of Pathology* 1975; 81(1): 179-197
44. Ping-Guo Liu, Song-Qing He, Yan-Hong Zhang, Jian Wu. Protective effects of apocynin and allopurinol on ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice. *World J Gastroenterol* 2008 May 14; 14(18): 2832-2837
45. Şahin E., Olguner Ç., Bodur H.A., Koca U. et al. Uzak ve Doğrudan İskemik Önkoşullamanın Karaciğerin Reperfüzyon Hasarı Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2009;29(2):381-387
46. Wang Ke-xin, Hu San-yuan, Jiang Xu-sheng, Zhu Min, JinBin, Zhang Guang-yong and Chen Bo. Protective effects of ischaemic postconditioning on warm/cold ischaemic reperfusion injury in rat liver: a comparative study with ischaemic preconditioning. *Chin Med J* 2008; 121(20): 2004-2009
47. Saila Antila, Stig Sundberg, Lasse A. Lehtonen. Clinical Pharmacology of Levosimendan. *Clin Pharmacokinet* 2007; 46 (7): 535-552
48. P.S. Pagel, H.Haikala, P.J. Pentikainen et al. Pharmacology of Levosimendan: A New Myofilament Calcium Sensitizer. *Cardiovascular Drug Reviews* 1996;14(3): 286-316
49. H.Yokoshiki, M.Sunagawa, T. Seki, N. Serelakis. ATP-sensitive K₁ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998; 274: 25-37
50. W.G. Toller, C.Stranz. Levosimendan, a New Inotropic and Vasodilator Agent. *Anesthesiology* 2006; 104: 556–69
51. C.D. Anderson, J. Pierce, Ian Nicoud, A. Belous., C.D. Knox, R.S. Chari. Modulation of Mitochondrial Calcium Management Attenuates Hepatic Warm Ischemia-Reperfusion Injury. *Liver Transplantation* 2005; 11(6): 663-668

52. A.Oldner, D.Konrad, E.Weitzberg, A.Rudehill, P.Rossi, M.Wanecek. Effects of levosimendan, a novel inotropic calcium-sensitizing drug, in experimental septic shock Crit Care Med 2001; 29(11): 2185-2193
53. Küçük C.; Akcan A., Akyıldız H., Akgün H., Muhtaroglu S., Sözüer E. Effects of Amrinone in an Experimental Model of Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury The Journal of surgical research 2009; 151(1):74-79
54. Ferdinand Serracino-Inglott, Nagy A. Habib, Robert T., Mathie B. Hepatic ischemia-reperfusion injury. The American Journal of Surgery 2001; 181 (2): 160-166
55. Süzer Ö., Bozkurt A.K., Süzer A., Aykaç Z., Barlas A. İzole kobay kalplerinde iskemik arrest sonrası levosimendan ve amrinonun inotropik etkilerin karşılaştırılması. GKD Cer Dergisi 1996; 1: 4-8
56. E.F.Du Toit, C.A.Muller, J.McCarthy, L.H.Opie. Levosimendan: Effects of a Calcium Sensitizer on Function And Arrhythmias and Cyclic Nucleotide Levels during Ischemia/Reperfusion in the Langendorff-Perfuse Guinea Pig Heart The Journal Of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1999; 290(2) : 505–514
57. Schwarte LA, Picker O, Bornstein SR, et al. Levosimendan is superior to milrinone and dobutamine in selectively increasing microvascular gastric mucosal oxygenation in dogs. Crit Care Med. 2005; 33:135–142.
58. Noto A, Giacomini M, Palandi A, Stabile L, Reali Forster C, Iapichano G, *et al.* Levosimendan in septic cardiac failure. Intensive Care Med 2005; 31: 164-165.
59. Petri Kaheinen, Piero Pollesello, Jouko Levijoki, Heimo Haikala, Effects of Levosimendan and Milrinone on Oxygen Consumption in Isolated Guinea-Pig Heart. J Cardiovasc Pharmacol 2004; 43: 555–561.