



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI



Dr. ÖGE TAŞCILAR

70094

ANKARA, 1998

İÇİNDEKİLER

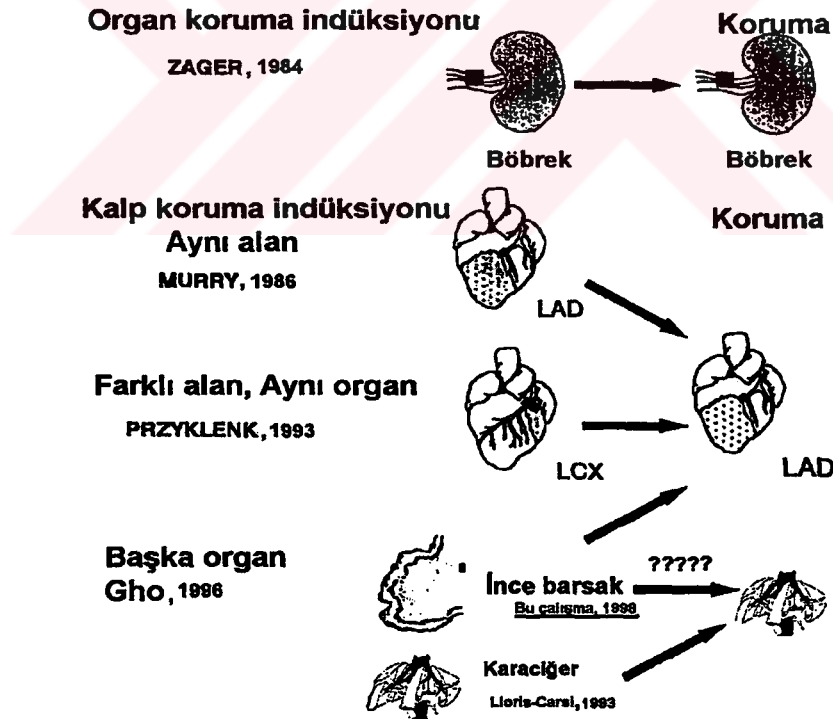
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
GEREÇ YÖNTEM.....	13
BULGULAR.....	21
TARTIŞMA SONUÇ.....	28
ÖZET.....	32
KAYNAKLAR.....	33



GİRİŞ VE AMAÇ

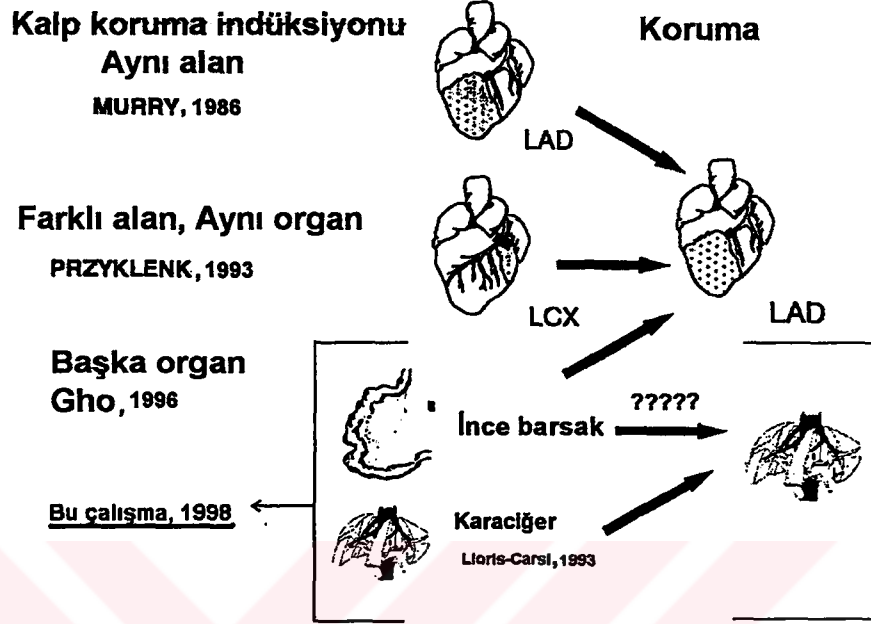
İskemik önkoşullama, kısa süreli tekrarlanan iskemi ve reperfüzyon dönemlerinin sonraki daha uzun süreli iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu, indüklenebilen güçlü bir endojen mekanizmadır⁹¹. Bu mekanizma miyokard⁹¹; böbrek¹³³; iskelet kası⁹⁰; beyin⁵², ve karaciğerde⁶⁷ de gösterilmiştir.

Uzun süre iskemik bırakılacak bölgeyi besleyen damarlar kullanılarak yapılan iskemik önkoşullama (İÖ) işlemi (esas organ İÖ=EOİÖ) ile aynı organın başka damarla beslenen diğer bölgelerinin de iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarından korunabildiğinin bulunmasıyla, İÖ'nün uzak bölgeleri de koruyabildiği ispatlanmıştır¹⁰³. Buradan yola çıkan Gho, barsaklarda ve böbreklerde oluşturulan İÖ'nün miyokard I/R hasarını azalttığını göstermiştir³⁵. Bu yöntemle uzak organ İÖ (UOIÖ) adı verilmiştir. Hepatik pedikül kullanılarak yapılan İÖ ile karaciğerde oluşan I/R hasarın azaltıldığı gösterilmiştir^{67,40}. Ancak miyokard için kullanılmakta olan UOIÖ'nün karaciğer için uygulanabilirliği henüz bilinmemektedir(Şekil 1).



Şekil 1 : İskemik önkoşullama ilgili yapılan çalışmaların şeması

Bu çalışmada amaç, karaciğer iskemi-reperfüzyon modelinde süperior mezenterik arteri kullanarak uzak organ iskemik önkoşullama (UOIÖ) yönteminin olası varlığını araştırmak ve bu yöntemi bilinen esas organ iskemik önkoşullama (EOİÖ) yöntemi ile karşılaştırmaktır(Şekil 2).



Şekil 2 : İskemik önkoşullama kalbe yada iskemik bırakılan alana özgü değildir. İskemik önkoşullamanın koruyucu etkisi iskemik bırakılmayan diğer bölgeler ve diğer organlar için de geçerli olabilir. Biz çalışmamızda karaciğer veya ince barsak önkoşullamasının karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarına etkisini araştırdık.

GENEL BİLGİLER

Tekrarlayan streslere karşı doku adaptasyonu ya hipertrofi yada yanıtların kaybolmasıyla sonuçlandığı uzun zamandır bilinmektedir. Ancak bir hücrenin saldırıya karşı akut adaptasyon göstermesi ve tekrar fenotipik sakin duruma dönmesi yakın zamanda gözlemlenmiştir. Murray ve grubunun miyokardda ilk kez önkoşullamayı tariflemelerinden bu yana bu güçlü, endojen koruyucu stratejinin mekanizmalarıyla ilgili çok detaylı bilgiler elde edilmiştir⁹¹. İlk kez köpeklerde tespit edilen önkoşullama insan içinde geçerlidir. Bu konuda ilk kez Yellon ve arkadaşları tarafından koroner bypass operasyonu geçiren bir hastanın geçici bir iskemi sonrası kalp ventrikül kası biopsisinde adenosin trifosfat seviyelerinin ventriküler fibrilasyon sonrası daha iyi korunduğunun bulunması üzerine tarif edilmiştir¹³⁰. Ayrıca Kloner ve Shook⁵⁸, Ottani ve grubu⁹⁶ ile Andreotti ve grubu² birbirlerinden bağımsız olarak miyokard infarktüsünden 24-48 saat önceki anginanın koruyucu etkisini gözlemişlerdir.

Önkoşullamanın mekanizmaları aydınlatılmaya başlandıkça iskemi dışındaki uyarımların da koruma oluşturabildiği görülmüştür. Stres hormonları, adenosin ve norepinefrin intrasellüler kinazları aktive ederek önkoşullamanın erken fazlarını aktifleştirebilmektedir. Hücre dışı sinyaller, hücre içi ikincil mesajcıları ve tetikleyicileri uyaran hücre zarı reseptörlerini tetiklemektedir. Bu ilk kez Gross ve Auchamach tarafından önkoşullamanın ATP-duyarlı potasyum kanalları (K_{ATP} kanalları) tarafından oluşturulduğu gösterilmiştir³⁷.

Murray ve grubu önkoşullama terimini iskemik saldırıya karşı miyokardial endojen koruyucu mekanizma olarak kullanmıştır⁹¹. Uyarının şekline göre adaptasyon için gereken süre farklıdır. Endotoksin uyarımlı miyokardial adaptasyon 24-72 saatte (geç adaptasyon) olurken, iskemi ile oluşan klasik önkoşullama (akut adaptasyon) dakikalar içinde oluşmaktadır. Bu gözleme göre mekanizmalarının birbirinden farklı olduğu ortaya çıkmaktadır. Akut adaptasyonda savunma mekanizmaları örneğin iyon transport sistemleri üzerinden aktifleşirken, geç adaptasyonda yeni proteinler sentezlenmektedir^{20,83,74}.

Akut önkoşullama mekanizmaları

Reseptör-aracılı sinyal iletimi

Önkoşullamanın erken fazlarında adenosin ve norepinefrin gibi iskemik stres hormonlarının protein kinaz C(PKC) izoformlarının aktivasyonuna etki ettiğine dair birçok kanıt bulunmaktadır^{78,30,93}.

Fosfatidil 4,5-bifosfat ve diaçilgliserol'ün(DAG) fosfolipaz C ile hidrolizlenerek aktifleşmesinde, PKC ve kalsiyum-depo organellerinin rolü vardır⁹³. Kalsiyum homeostazisi birçok sinyal sistemleri tarafından sağlanmaktadır. Birçok hücrede fizyolojik yanıtların süresi, Ca^{2+} konsantrasyonunun bazal seviyelere dönmesinden çok daha uzun sürmektedir. Bu uzamanın kardiyak önkoşullamadaki fizyolojik önemi bilinmemektedir⁸⁹. Bilindiği üzere, hücre iç kalsiyum $[Ca^{2+}]_i$ arttıkça bazı PKC izoformlarını aktive etmek için gerekli olan fosfolipid hidrolizi azalmaktadır⁹³. Bu yüzden kalsiyum oynamaları önkoşullamanın indüksiyonunda görev almaktadır⁸⁹. Adenosinin etkisi sonucu K_{ATP} kanallarının aktifleşmesi ile iskemik önkoşullama-aracılı adaptasyon oluşmaktadır. Deneysel çalışmalar aktif K_{ATP} kanallarının I/R hasarı sırasında Ca^{2+} girişini sınırlandırdığını göstermektedir.

Miyawaki ve grubu adenosin A_1 -uyarımlı önkoşullama ile Ca^{2+} yüklenmesinin azaldığını öngörmüşlerdir. Adenosin A_1 aktivasyonu K_{ATP} kanallarını açarak miyoziti hiperpolarize etmekte ve Ca^{2+} girişini azaltmaktadır. Böylece reseptör aracılı iyon transport sistemi, miyokardial I/R hasarı sırasında homeostazisi sağlamaktadır⁸⁹.

Adenosin

İskemik miyokardda adenosinin birçok yararlarından bahsedilmektedir^{7,12,53}. Hipoperfüzyon durumunda adenosinin koruyucu etkileri, koroner arterde vazodilatasyonu sağlayarak gelen oksijen miktarını arttırmak ve negatif inotropik etki yaparak miyokardın oksijen ihtiyacını azaltmaktır⁶⁶. Adenosin kardiyak etkilerini A_1 ve A_2 reseptörleri aracılığıyla göstermektedir¹¹⁸. Adenosin A_1 reseptörünün farmakolojik antagonizması iskemik önkoşullamanın koruyucu etkisini ortadan kaldırmaktadır. Adenosin A_1 reseptörünün adenosinle veya selektif adenosin A_1 reseptör agonistleri ile uyarılması da iskemik önkoşullama gibi miyokardial I/R hasarını azaltıcı etki yapmaktadır. Adenosinle oluşturulan korumanın mekanizmasında PKC ve K_{ATP} kanal aktivasyonu birçok hayvan türünde ve insanlarda rol oynamaktadır^{20,21}.

Norepinefrin

Önkoşullamanın mekanizmalarında α_1 -adrenoseptörlerinin de yeri olduğu gösterilmiştir^{21,5,88}. Miyokardial stres norepinefrin salınımına neden olmaktadır. Banerjee ve arkadaşları norepinefrinin erken korumada reseptör-aracılı sinyal iletiminde etkili olduğunu bildirmişlerdir⁵. Gerçekten de önceki çalışmalar katekolaminlerin barsak ve karaciğerde stres sırasında yararlı metabolik değişiklikler oluşturduğunu gözlemlemişlerdir^{101,102}. Bunu destekleyen gözlemler şunlardır⁵.

i) Kısa süreli, iskemi miyokardial adrenerjik nöronlardan norepinefrin açığa çıkarmaktadır.

ii) İskemik önkoşullamanın etkisi önceden rezepin verildiğinde tamamen kaybolmaktadır.

iii) Eksojen norepinefrin verilmesi iskeminin koruyucu etkisini açığa çıkarır.

iv) Geçici iskemiden önce veya hemen sonra selektif α_1 -adrenerjik bloker verildiğinde önkoşullama ortadan kalkar.

v) Selektif α_1 -adrenerjik blokaj eksojen norepinefrinin oluşturduğu koruyucu etkiyi kaldırır.

vi) Fenilefrin ile selektif α_1 -adrenerjik stimulasyonu iskemik önkoşullamaya eşit düzeyde koruma oluşturmaktadır.

Kalsiyum

Adenozin veya adrenerjik yollardan birisinin aktivasyonu PKC aktivasyonu ile sonuçlanır. İntrasellüler Ca^{2+} , PKC aktivasyonunda rol alan önemli intrasellüler sinyallerden birisidir. Kalsiyum homeostazisi birçok sinyal sistemleri tarafından sağlanır^{79,82}. İntrasellüler Ca^{2+} yüklenmesi İ/Ra bağlı hücre disfonksiyonu ve ölümün esas nedeni sayılmaktadır^{106,17,111,112}. Hasarlı miyositlerin postiskemik disfonksiyona ve ölümcül hasardan yüksek $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sorumlu tutulmaktadır^{111,112}. Ashraf ve grubu³ kısa süreli Ca^{2+} paradoks yüklenmesinin kalbi daha ciddi Ca^{2+} yüklenmelerinden koruduğunu göstermişlerdir. Gerçekten de birçok farklı stresle başlatılabilen önkoşullama(iskemi, norepinefrin, adenozin) sonucu $[\text{Ca}^{2+}]_i$ seviyesi yükselmektedir^{78,81,82,89}.

i) İskemik önkoşullama verapamil ile engellenmektedir⁸⁹

ii) sarkoplazmik retikulumda ryanodine-duyarlı Ca^{2+} kanallarının iskemi öncesi geçici olarak açılması global iskemi ve reperfüzyon hasarı sırasında kalpte oluşan fonksiyonel bozuklukları azaltmaktadır⁷⁸.

iii) Farmakolojik olarak $[Ca^{2+}]_i$ artırılması PKC'yi aktive eder; bu iskemik önkoşullamanın bilinen mediatörüdür⁷⁸.

Buradan çıkan sonuca göre, preiskemik dönemde hücre içi kalsiyum artırılarak sonraki reperfüzyon döneminde sınırsız, aşırı kalsiyum girişi engellenmektedir. Önkoşullama mekanizmalarının farmakolojik olarak uyarılması stratejilerinde Ca^{2+} aracılı mekanizmalar da göz önünde bulundurulmalıdır⁷⁷.

Protein kinaz C

Eksojen uyarılarla(adenozin, bradikinin, noradrenalin, asetilkolin, endotelin-1, opiatlar)^{81,118} iskemik önkoşullama gibi miyokardial koruma sağlamaktadır. Bu uyarılar sonucu intrasellüler sinyaller guanozintrifosfat(GTP)-bağımlı-protein-bağılantılı reseptörler ve fosfolipaz C ve muhtemelen fosfolipaz D şeklinde protein kinaz C ailesinin bir veya birden fazla izozimlerini harekete geçirerek muhtemel hedef proteinlerin fosforilasyonunu sağlarlar³⁰. Bu hedef proteinler K_{ATP} kanallarının açılmasını düzenler, ekto-5'-nükleotidazı aktifleştirirler veya "heat shock" proteinlerin açığa çıkmasını sağlarlar^{29,54}. Örneğin iskemik önkoşullama uyarımı verildiğinde K_{ATP} kanalları açılmakta iken, bu kanalların blokajı iskemik önkoşullamayı önlemektedir³⁷. Ancak mitokondrium, sarkoplazmik retikulum veya nükleusdaki K_{ATP} kanallarının spesifik blokeri olan dofetilide verildiğinde önkoşullama etkilenmemektedir⁷⁷. Kitakaze ve grubunun⁵⁴ çalışmasına göre iskemik önkoşullama ekto-5'-nükleotidaz aktivitesini arttırmaktadır, protein kinaz C arttıkça ekto-5'-nükleotidaz aktivitesi de artmaktadır.

5'-nükleotidaz

Kitakaze ve arkadaşları^{53,54} yaptıkları çalışmalar sonucunda 5'-nükleotidazın akut önkoşullamanın mediatörü olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmalarda ekto-5'-nükleotidazın engellenmesinin iskemik önkoşullamayı bozduğu, direkt olarak uyarılmasının ise korumayı başlattığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, PKC'nin aktivasyonu sonucu oluşan miyokardiyal korumanın ekto-5'-nükleotidaz-bağımlı mekanizma olduğu tespit edilmiştir^{53,54,55}. Hipotezlerine göre, ekto-5'-nükleotidaz geçici iskemi sırasında PKC-bağımlı mekanizmayla aktifleştirilmekte ve bu artmış aktivite adenosin üretimini arttırarak K_{ATP} kanal bağımlı korumayı başlatmaktadır.

Geç Önkoşullamanın Mekanizmaları

İskemi- reperfüzyon hasarına karşı endojen miyokardial koruma, akut ve geç mekanizmalarla önkoşullamanın erken ve ikinci penceresi olarak tanımlanmaktadır⁹¹. Erken ve ikinci önkoşullama farklı adaptasyon mekanizmaları ortaya koymaktadır^{91,119,131}. Erken önkoşullama dakikalar içinde oluşur, geçicidir ve *de novo* protein sentezinden bağımsızdır¹¹⁹. Önkoşullamanın ikinci penceresinin başlaması için saatler gereklidir^{74,84,85}. Geç miyokardial adaptasyon veya korumanın ikinci penceresi geçici iskemi¹³¹, endotoksemi⁷⁴, inflamatuvar mediatörler¹¹, hipertermi²⁹ ventriküler "pacing"¹¹⁶ ve α_1 -adrenoseptör uyarımı⁸⁵ gibi etkilerden 24 saat veya daha uzun süre sonra açığa çıkmaktadır. Endotoksin dışında interlökin-1, tümör nekrozis faktör(TNF) ve endotoksinin Lipid A parçası kardiyoprotektif etkileri uyarmaktadır^{11,92}.

Hücre zarı sinyallerinin başlaması ile oluşan miyokardial adaptasyon için gerekli olan geç yanıt mekanizmaları oldukça karmaşıktır. Geç korumada gen transkripsyonu ve sonra koruyucu miyosellüler proteinlerin translasyonu oluşmaktadır¹³¹.

Gerçekten de son yapılan çalışmalar geç koruma için protein sentezi gerekliliğini ortaya koymaktadır⁸⁰. Bu bulgulara göre bu iki farklı mekanizma paralel çalışarak miyokardial fonksiyonları optimumda korumaya çalışmaktadır. Her ne kadar farklı mekanizmalar olsa da bazı özellikleri ortaktır. Mei ve arkadaşları hem erken hemde geç korumada K_{ATP} kanal aktivasyonunun gerekliliğini göstermişlerdir⁷⁶. Ayrıca tek başına adenozinin geç korumayı K_{ATP} kanallarının reaktivasyonu ile uyardığı görülmüştür⁷. (Şekil 3)

Teknik

Esas organ önkoşullama

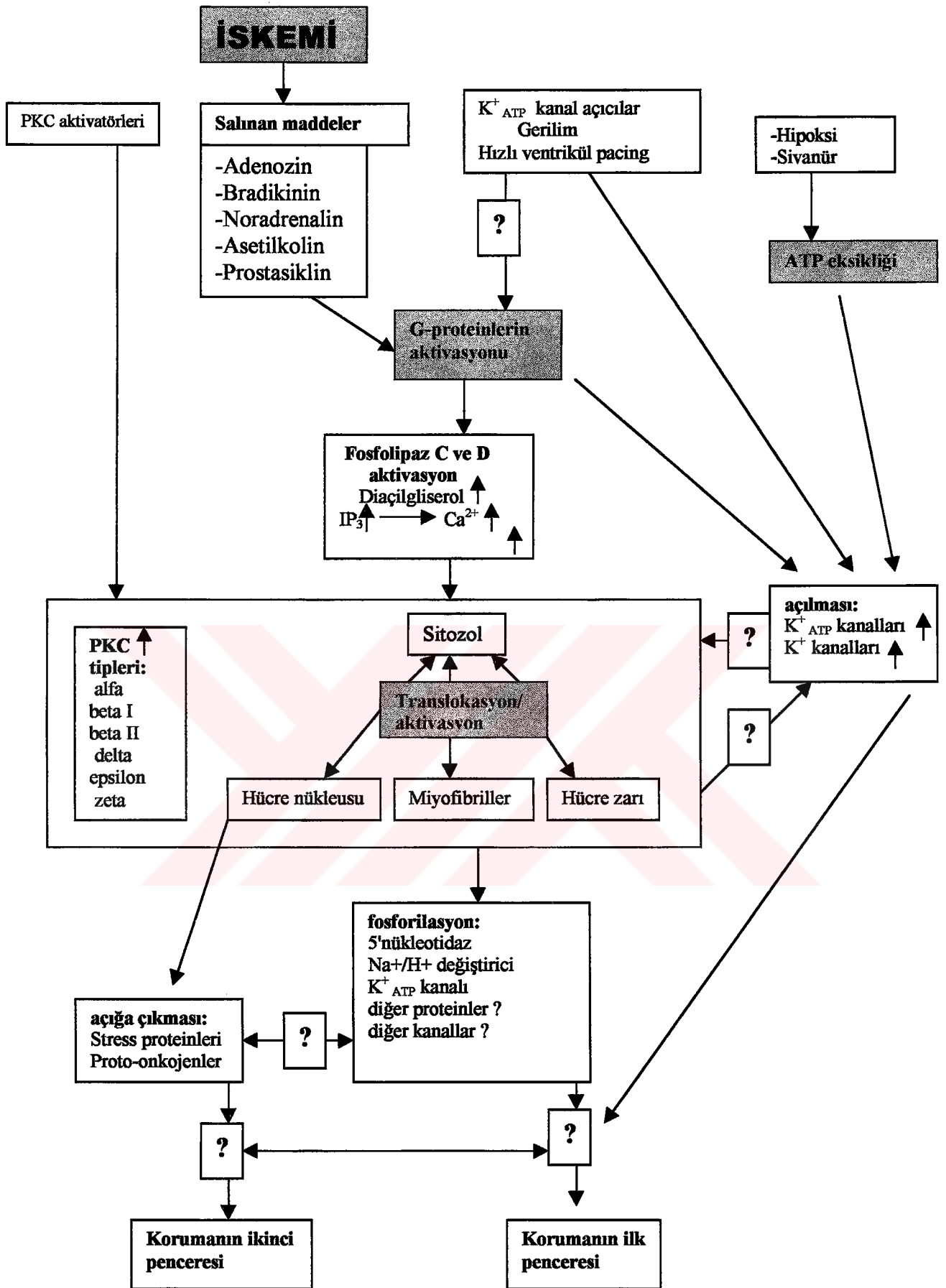
Esas organ önkoşullama (EOİÖ) için kullanılan iskemi süreleri kesin süreler olmamakla birlikte 2 ile 10 dakika arasında değişmektedir, fakat önkoşullamayı oluşturan kesin bir süre henüz saptanmamıştır^{48,59,63,91}. İskemiye takip eden reperfüzyon süresi de aynı miktarda tutulmaktadır^{62,71}. Daha uzun sürelerde ise koruma etkisi kaybolmaktadır⁶⁴. Bazı çalışmalar bu korumanın 1 saatlik süre sonunda azalarak kaybolduğunu gösterse de, Koning ve grubunun⁶⁰ yaptığı çalışmada bu etkinin ya hep/ya hiç prensibiyle birdenbire kaybolduğu ortaya konmuştur. Yirmidört saat sonra ortaya çıkan ikinci pencere etkisinde de aynı özellikler tespit edilmiştir^{62,71}. Bundan başka tekrarlayan iskemi-reperfüzyon sikluslarının önkoşullamanın koruyucu etki süresini uzatmadığı saptanmıştır¹⁰⁵. Kısaca,

esas organ önkoşullama işleminde organı besleyen damarların 10 dakikalık klempajı ile iskemi oluşturmak, daha sonra eşit süre için klempini açmak yeterlidir.

Uzak organ önkoşullama

Przylenk¹⁰³ uzak bölge önkoşullamasının miyokardın diğer bölümlerini koruduğunu göstermesinden sonra Gho³⁵ ve ekibi iskemik önkoşullamanın uzak organda yapılmasının (barsak, böbrek) miyokardial iskemi reperfüzyon hasarını azalttığını göstermiştir. Burada teknik olarak mezenter artere 15 dakika iskemi 10 dakika reperfüzyon uygulanmış ve takibeden 60 dakikalık miyokardial iskemi ve reperfüzyon sonrası infarkt alanının %50 azaldığı görülmüştür.





Şekil 3: İskemik önkoşullamanın muhtemel mekanizmalarının şeması

Karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarı

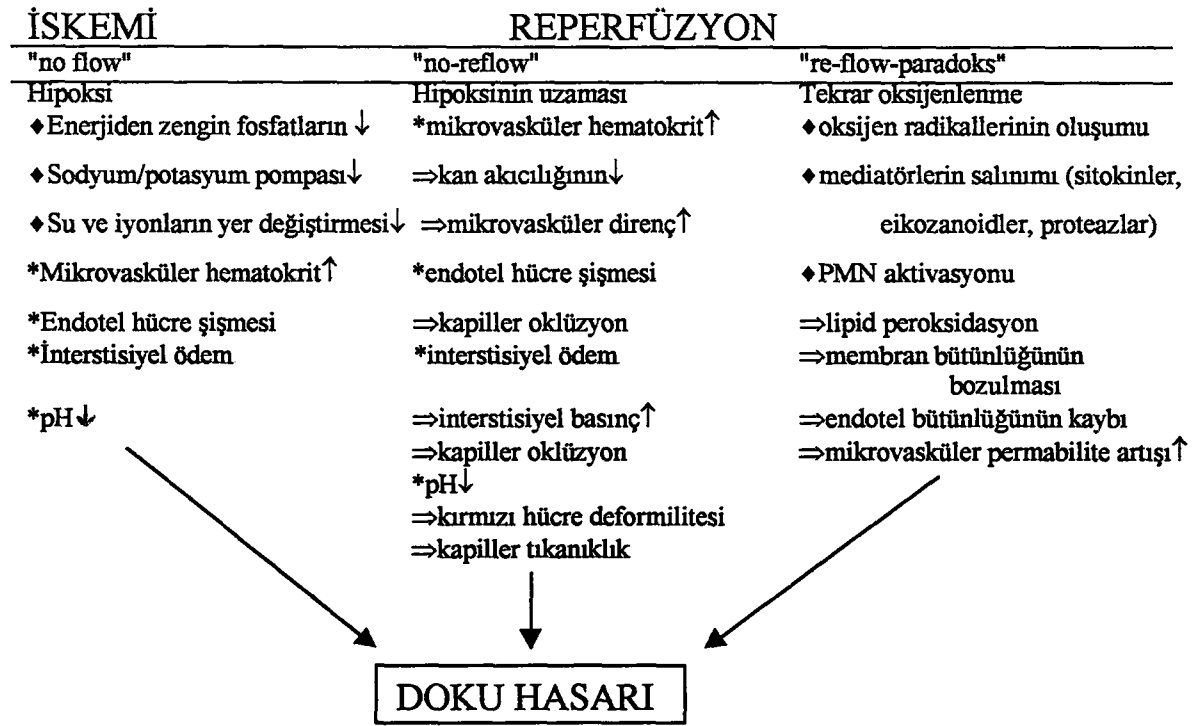
Karaciğer kan akımı ciddi travma veya tümör rezeksiyonları sırasında sıklıkla kesilmesi gerekmektedir^{4,49,72}. Transplantasyon sırasında da karaciğer kaçınılmaz olarak komplet iskemiye maruz kalmaktadır. Karaciğer kan akımı hemorajik şok, ciddi travma ve sepsisin geç dönemlerinde de azalmaktadır¹²².

İskemi-Reperfüzyon

Hepatik iskemi sırasında gelişen birçok metabolik ve yapısal bozulmaların önlenmesi ve düzeltilmesi için reperfüzyon mutlak gereklidir. Ancak, iskemiye bağlı değişiklikler iskemi sonrası (reperfüzyon döneminde) devam etmektedir. Böylece iskemik olarak hasarlı organlarda reperfüzyon iki amaca hizmet etmektedir. Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı ile ilgili birçok çalışmalar yapılmış ve lezyonların patogenezinde reaktif oksijen türevlerinin çok önemli olduğu gösterilmiştir^{4,44,49,72,86,95,113,115,121,134}. Polimorfonükleer nötrofiller (PMN) birçok akut patolojik olayda mikrovasküler endotelial hasardan sorumlu santral mediatördür^{36,126}. PMN'ler reperfüzyon hasarında da sorumlu ajanlar olarak tespit edilmiştir^{36,50,115,126,134}. Ayrıca, PMN ve vasküler endotel arasında adeziv etkileşimde rol alan sitokinler ve hücre adezyon molekülleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır^{68,107} (Şekil 4).

Hepatik iskemi ve reperfüzyon sırasında serbest radikal oluşumu

Karaciğer; parankimal(hepatosit) ve nonparankimal(kupffer hücreleri ve endotel) hücrelerden oluşmuştur. Hepatosit, toksik oksijen metabolitleri tarafından hasarlanan hücredir. Bu metabolitler adenozin trifosfat (ATP)'ın yıkımı⁴ ve reperfüzyon sırasında indirgenen ikincil oksidatif stres sonucu oluşan ürünlerdir^{4,86}. Endotelial hücreler, PMN ve hepatositler oksijen radikal türevlerinin kaynağıdır^{4,86,99,1,25}. Yakın zamanlarda yapılan çalışmalar Kupffer hücrelerinin karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında rol oynadığını göstermektedir^{13,49,86}.



Şekil 4: Mikrovasküler ve hücresel hasarın iskemi ve postiskemik reperfüzyon dönemlerindeki hasar mekanizmaları

İskemi sırasında ATP hipoksantine döner; ksantin dehidrogenaz(KD) ksantin oksidaza(KO) çevrilir^{4,75}. İskemik organın tekrar kanlanmasıyla reoksijenizasyon sağlanır. KO hipoksantini ksantine çevirir ve bu işlem sırasında süperoksit anyon ortaya çıkar. Bu olay sonucu diğer reaktif oksijen metabolitleri ortaya çıkar^{4,75}. Hepatositler ve endotelde reaktif oksijen türevlerinin oluşumu da bu yolla^{4,99}.

Fagositik hücreler örneğin PMN ve kupffer hücreleri de süperoksit anyon ve hidrojen peroksit üretmektedir^{25,86}. Membran bağımlı nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz sistemi(NADPH) aktifleşmiş fagositlerle oksijen radikalleri üretimine katkıda bulunmaktadır⁸⁶.

Nötrofil

Reperfüzyon hasarı PMN'lerin aktivasyonu, adezyonu ve diapedezi ile karakterize inflamatuvar yanıtla çok yakın ilişkilidir¹²⁹. Karaciğer İ/R çalışmalarında reperfüze dokuda PMN arttıkça İ/R hasarının da arttığı görülmüştür¹²². PMN'lerin monoklonal antikorlarla baskılanması hasarı azaltmıştır⁵⁰. Suzuki yaptığı çalışmada karaciğer İ/R sırasında PMN infiltrasyon düzeyi ile karaciğer fonksiyonel ve yapısal bozulmasının ilişkili olduğunu göstermiştir¹¹⁵. Aktifleşmiş PMN'lerden toksik oksijen türevleri açığa çıkmakta ve

membranda lipid peroksidasyona neden olmaktadır¹²². Ayrıca aktif PMN'ler azurofil granüllerden miyeloperoksidaz ve elastaz gibi birçok enzimler salgılamaktadır^{33,39,57,128}. Miyeloperoksidaz, tahrip edici etkisi yüksek hipoklorik asit ve serbest oksijen ile indirekt olarak doku hasarına neden olmaktadır³³. Elastaz proteolitik bir enzimdir ve mikrovasküler geçirgenliği artırarak endotel hücre ve ekstrasellüler matriks arasına PMN'lerin göç etmesini sağlar¹²⁸.

Sitokinler

Hepatik İ/R hasarındaki moleküler mekanizmalar hala iyi bilinmemektedir. Sitokinler bir grup polipeptid mediatörlerdir ve normal homeostazisin parçası değildirler, ancak birçok patofizyolojik olaylarda biyolojik etkileri vardır³⁴. Tümör nekrozis faktör(TNF) ve İnterlökin-1(İL-1) PMN'leri inflamasyon bölgesine çeker^{24,28,87}, ancak sadece TNF respiratuar zincirleri direkt olarak uyararak reaktif oksijen türevi serbest radikaller ve bunların metabolitlerinin oluşmasını sağlar⁵⁶ ve vasküler endotel'in nötrofil aracılı saldırısına karşı hassasiyetini artırır¹²⁵. Bundan başka TNF'e maruz kalan endotel hücreleri inflamatuvar mediatörlerden IL-1 ve platelet aktive edici faktör(PAF) salgırlar^{24,28}. İL-1, makrofaj kökenli sitokindir ve septik şokta mediatör olarak önemli rol oynar⁸. Aktifleşmiş kupffer hücreleri İL-1 salgılayarak endotelden diğer sitokinlerin salgılanmasını sağlar^{14,122}. İL-1, TNF etkisiyle aktif PMN'ler tarafından üretilmektedir¹²⁰. İL-1, PMN'lerin inflame dokularda damar dışına çıkmasını sağlayan bilinen en güçlü ajandır²⁴. Bu sitokinler genel inflamatuvar yanıt oluşturarak PMN'lerin toplanmasını ve aktivasyonunu sağlar, böylece iskemi reperfüzyon sonrası hepatik lezyonlara neden olur. Kupffer hücre-kökenli sitokinler (İL-1, TNF) hepatositlerde lökosit kemotaktik peptid İL-8 üretimine neden olarak PMN ve endotel arası etkileşimlerin artmasını sağlarlar^{9,117}.

Hücre adezyon molekülleri

Tümör nekrozis faktör ve İL-1 endotel yüzeyinde hücre adezyon molekülleri denen adezyon reseptörlerinin üretimini uyararak nötrofillerin tutunmasını kolaylaştırırlar^{47,69}. Yakın zamanda intersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve endotelyal lökosit adezyon molekülü-1 (ELAM-1) gibi birçok adezyon molekülü tanımlanmıştır⁶⁹. Adezyon molekülleri yapılarına göre 3 majör aileye ayrılır; selektinler, integrinler ve immünglobulin süperailisi⁶⁹. Selektin ailesi E-selektin(önceleri ELAM-1), P-selektin ve L-selektindir. İntersellüler adezyon molekülü-1 ve VCAM-1 immünoglobulin süperailisine aittir⁶⁹.

PMN'lerin endotele yapışmasında esas olarak PMN-bağımlı veya endotelial bağımlı mekanizmalar veya herikisinin aracı olduğu gösterilmiştir⁶⁸. Deneyler reperfüzyon hasarında PMN-bağımlı mekanizmaları desteklemekte ve intestinal iskemi sonrası mukozal hasarın CD11/CD18 denilen glikoprotein kompleksine karşı geliştirilen monoklonal antikorla önlenemediğini göstermektedir³¹. Ayrıca Jaeschke ve grubu karaciğer İ/R hasarında PMN-bağımlı mekanizmanın mevcudiyetini göstermiştir⁵⁰. Reperfüze dokuya PMN infiltrasyonu birçok sıralı mekanizmayla olmaktadır¹⁰⁴. Küçük venüller boyunca endotele marjinalasyon ve sıralanma ile damar duvarında film adezyon oluşur. Bu olayları diapedez ve daha sonra ekstravasküler dokuya göç izler¹⁰⁴. Selektinler, PMN'lerin aktive endotelde ilk adezyonu veya sıralanmalarını sağlar¹⁰⁹. Nötrofil glikoprotein kompleksi CD11/CD18 B₂ integrindir ve film adezyon işleminde önemli rolü vardır^{68,104,109}.

Vedder ve grubu¹²⁶ ICAM-1 için nötrofil ligandı olan nötrofil adezyon molekülü CD18'e karşı monoklonal antikor kullanarak şok veya resüsitasyon sonrası reperfüzyon hasarındaki PMN yapışmasını önlemişlerdir. Endotelial ICAM-1'in B₂ integrinler gibi transendotelial göçte önemli rolü vardır¹⁰⁹. Kritik adezyon fazının engellenmesi çok spesifiktir ve PMN-aracılı hasarı azaltmak için uygulanan nötrofil ablasyonu veya antiinflamatuvar ajanlardan daha avantajlıdır. Anti ICAM-1 monoklonal antikorların hepatik¹¹⁴, miyokardial⁷⁰ ve spinal kord¹⁹ iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede yararlı olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular endotelial bağımlı mekanizmaların İ/R hasarından sorumlu olduğunu göstermektedir.

Lipid Peroksidasyon

Biyolojik sistemlerde, doymamış yağ asitlerinin serbest radikal oksidasyonu lipid peroksidasyon olarak adlandırılır^{6,18,23,38}. Lipid peroksidasyon reaksiyonuna en duyarlı bileşikler, membran fosfolipidlerinin yapısında yer alan doymamış uzun zincirli yağ asitleri(PUFA), özellikle araşidonik asid ve dekoheksaenoik asiddir. Bu nedenle lipid peroksidasyonunun yol açtığı en önemli hasar hücre membranında gerçekleşir^{6,108}.

Membranların zedelenmesine neden olan lipid peroksidasyon, hücrelerde iki mekanizmayla hasar oluşturmaktadır; membranların anatomik bütünlüğünün bozması ve üretilen toksik bileşiklerin üretildiği yerden diffüzyonla diğer yerlere ulaştırılarak hasar meydana getirmesi bu mekanizmayı oluşturur. Yoğun şekilde peroksidasyon, biyolojik membranlarda, membran akıcılığının kaybolmasına, spesifik olmayan iyon geçirgenliğinde artışa (K⁺, Ca⁺² gibi) neden olarak, membranlardaki enzimlerin aktiviteleri için gerekli olan

tiollerin okside olmasını ve membran transport mekanizmasının bozulmasını sağlayarak membranların bütünlüğünü ve işlevini bozar^{6,38}.

Aldehit ve malondialdehid (MDA) gibi lipid peroksidasyon sonucu oluşan ürünler diffüzyonla oluştukları yerden salınırlar. Toksik olan aldehidler birçok hücre fonksiyonunu ve enzimi inhibe ederek hasar oluştururlar⁶. Doku hasarının göstergesi günümüzde lipid peroksidasyon ölçümü olarak kabul edilmekte, MDA, alkanlar, lipid hidroperoksitler, dien konjugatları gibi ürünlerin ölçümü lipid peroksidasyonun göstergesi olarak kullanılmaktadır^{38,43,97,98}.

Glutasyon

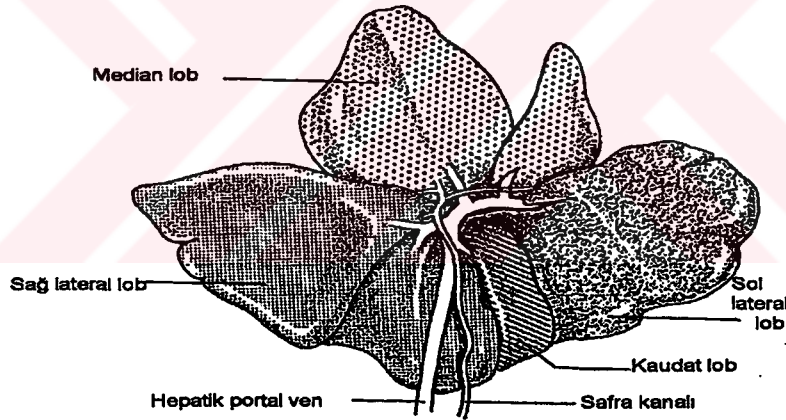
Glutasyon glutamat, sistein ve glisinde oluşan bir tripeptiddir ve reaktif oksijen metabolitlerine karşı vücuttaki en önemli savunma sistemidir^{27,65}. Hücre içerisinde nonenzimatik olarak kolayca okside olabilen sülfidril gruplarına sahiptir⁵¹. Glutasyon (GSH) redoks siklusu endojen antioksidan olarak membran lipid peroksidasyonunu önler⁴¹. Lipid peroksidazlarla girdiği reaksiyon sonucu oksitlenmiş olan (GSSH) hücreler için toksiktir ve bu yüzden NADPH'a bağımlı glutasyon redüktaz tarafından tekrar glutatyon (GSH) indirgenir¹²⁷. İskemi reperfüzyon deneylerinde sıklıkla oksijen radikallerinin hücre içi etkilerini gözlemlemek için kullanılmaktadır^{51,65,127}. İskemi reperfüzyon sırasında açığa çıkan GSSH doku ve plasmada GSH'a göre çok az miktarlarda bulunmaktadır. GSSH (okside glutasyon)'ın iskemik hasar değerlendirmelerinde GSH'a göre çok daha sensitif olduğu ve GSH ile tespit edilemeyen değişimleri çok daha iyi yansıtabildiği gösterilmiştir⁵¹.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmada Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi deney hayvanları yetiştirme bölümünden ağırlıkları 175-250 g arasında değişen, her iki cinsten 40 adet Wistar sıçan kullanıldı. Sıçanlar deney öncesi gıda ve su alımları serbest bırakıldı. Sıçanlar randomize olarak 3 gruba ayrıldı.

Gruplar

1. Kontrol karaciğer sol lob iskemi(90 dakika iskemi-180 dakika reperfüzyon) (n=10)
2. Aynı organ İÖ(Karaciğer pedikülü 10 dakika iskemi-10 dakika reperfüzyon) + karaciğer sol lob iskemi(90 dakika iskemi-180 dakika reperfüzyon) (n=15)
3. İntestinal İÖ (Süperior Mezenterik Arter 10 dakika iskemi-10 dakika reperfüzyon) + karaciğer sol lob iskemi (90 dakika iskemi-180 dakika reperfüzyon) (n=15) (Şekil 5, 6), (Resim 1, 2, 3).



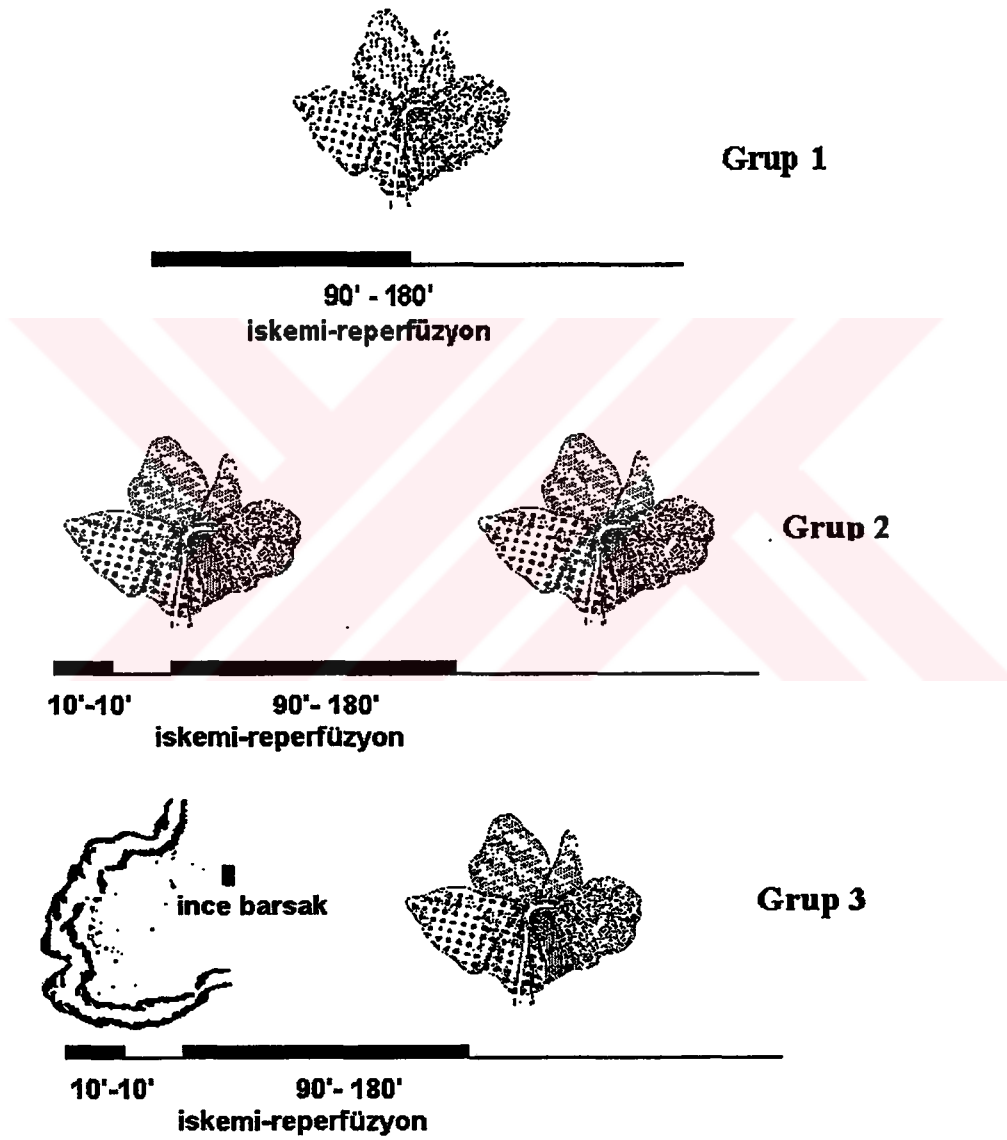
Şekil 5: Sıçan karaciğer anatomisi

Uygulanan Operasyon

Tüm hayvanlar karın cildi traşını takiben intramüsküler olarak 50 mg/kg dozda ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı AŞ.) anestezisi uygulanarak semisteril koşullarda orta hat laparotomi yapıldı.

Birinci grup hayvanlarda porta hepatitis ortaya kondu, sol ve median loba giden arter ve ven 90 dakika boyunca atravmatik mikrovasküler klempe (vascu-stattsII, midi düz 1001-532; Scanlan Int., Minn., USA) ile klempe edildi. Daha sonra 180 dakika boyunca reperfüzyona bırakıldı. Reperfüzyon sonrası hemen doku örnekleri alındı.

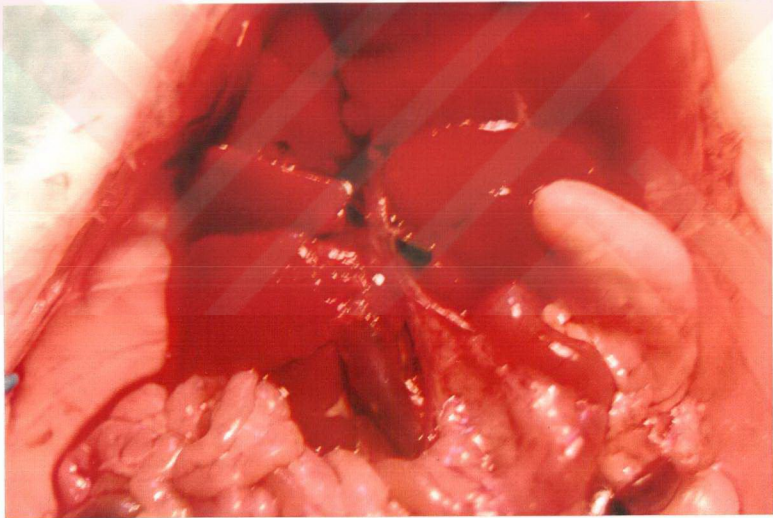
İkinci grupta karaciğer sol ve median lob damarları bulundu ve iskemik önkoşullama işlemi için 10 dakika iskemi 10 dakika reperfüzyon yapıldı. Önkoşullama sonrası yine aynı damarlar kullanılarak 90 dakika iskemi 180 dakika reperfüzyon yapıldı. İşlem sonrası doku örnekleri alındı.



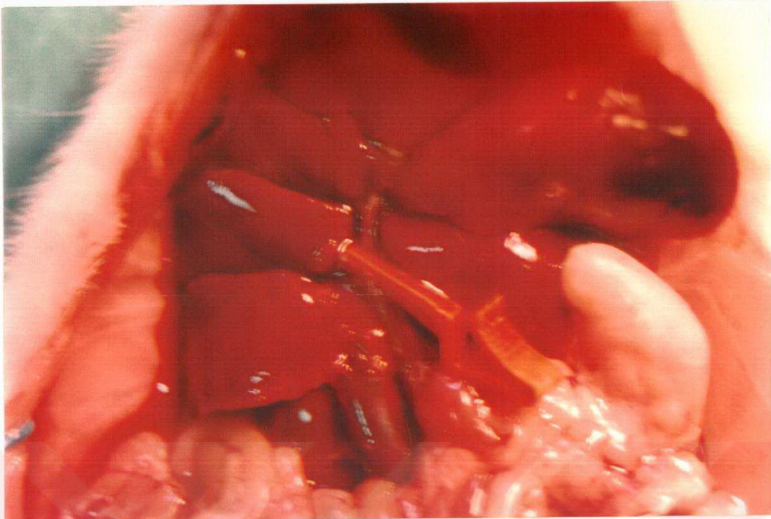
Şekil 6: Deney gruplarına uygulanan önkoşullama ve iskemi/reperfüzyon işlemleri

Üçüncü grupta ince barsaklar sol tarafa yatırıldı. Süperior mezenterik arter aorta çıkışında klempe edildi. Bu işlem sırasında süperior mezenterik artere 10 dakika iskemi 10 dakika reperfüzyon uygulandı. Daha sonra karaciğer sol ve median loba 90 dakika iskemi 180 dakika reperfüzyon yapıldı. İşlem sonrası doku örnekleri alındı.

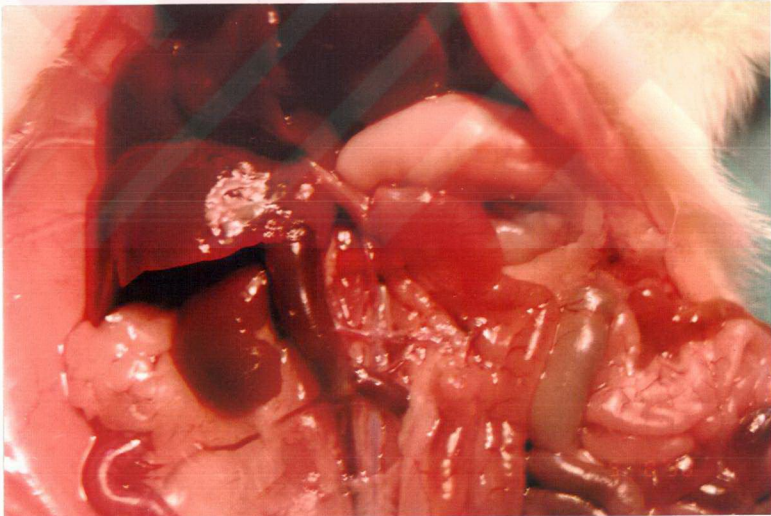
Sıçanlardan alınan karaciğer dokusu patoloji için %10'luk formaldehit içerisine kondu. Biyokimyasal inceleme için ayrılan karaciğer serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra alüminyum folyoya sarılarak sıvı azotta donduruldu ve deney gününe kadar -70°C'deki derin dondurucuda saklandı.



Resim 1: Median ve sol loba giden damarların arka tarafına yerleştirilmiş siyah lastik görülmektedir.



Resim 2: Resim 1'de görülen damarların kleplenmiş durumu.



Resim 3: Uzak organ önkoşullama için kullanılan süperior mezenterik arterin aorta çıkışının arka tarafına kırmızı lastik yerleştirilmiştir.

Lipid peroksit ölçüm tekniği

Lipid peroksidasyonunun son ürünü malondialdehit(MDA) düzeyi, 1,1,3,3-tetraethoksiopropan'ın standard olarak kullanıldığı tiyobarbitürik asit(TBA) testi ile belirlendi. TBA testi, "TBA reaktive substance" olarak nitelendirilen lipid peroksitlerin (MDA) TBA ile girdiği reaksiyon sonucunda oluşan pembe renkli maddenin konsantrasyonunun kalorimetrik olarak ölçülmesi prensibine dayanır(Uchiama1978).

Deneyin yapılışı

- Ayrılan karaciğer dokularından bir bölümü tartılarak 1:9(ağırlık: hacim) oranında %1.15 soğuk KCl solüsyonu ile homojenize edildi.
- 0.5 ml homojenat, 3 ml fosforik asit ve 1 ml TBA solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra 45 dakika kaynayan su banyosunda bekletildi.
- Tüpler hızla soğutulduktan sonra 4 ml n-butanol eklendi ve 3500 rpm'de 10 dakika santrifuj edilerek n-butanol fazı ayrıldı.
- Spektrofotometre de 535 ve 520 dalga boyunda supernatantın absorbansı ölçüldü.
- Standart olarak 0.5 ml 0.5 nmol tetraethoksiopropan numune gibi çalışıldı.

İki absorbans değeri arasındaki fark **nmol/gr** biriminde doku malondialdehit(MDA) miktarı olarak belirlendi.

Karaciğer dokusunda Glutasyon tayini

Doku glutasyon tayini Ellman'ın(Ellman1959) tanımladığı doku sülfidril miktarı tayinine göre yapıldı. Alkali ortamda p-nitrofenil disülfidin alifatik tiyol bileşikleri ile reaksiyonu sonucunda her mol tiyol başına oluşan p-nitrofenol anyonunun miktarını ölçme esasına dayanır.

Deneyin yapılışı

- Elde edilen karaciğer dokusu örneklerinden bir bölümü 5:1(hacim/ağırlık) oranında 0.5 M metafosforik asit ile dilue edilip homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra 3500 rpm'de 10 dakika santrifuj edilen süpernatanda glutasyon tayini yapıldı.
 - 2.4 Ellman reaktifine 0.2 ml süpernatant, 0.3 ml fosfat tamponu, 0.1 ml distile su eklenerek 410 nm'de köre karşı absorbans değeri ölçüldü.
 - süpernatanda Lowry yöntemi ile protein tayini yapıldı.
- Glutasyon miktarı **nmol GSH/mg protein** olarak verildi.

Histopatolojik inceleme

Yapılan çalışmada tüm gruplardaki hayvanlardan alınan karaciğer dokuları %10'luk formalinle tespit edildi. Parafin bloklama yapılarak 4µ'luk kesitler alındı ve hematoksil-eozin ile boyandı. Histopatolojik değişiklikler sinüzoidal; konjesyon, kupffer hücre hiperplazi-hipertrofisi, inflamasyon. Parankimde hepatositlerde vakuolizasyon, hidropik dejenerasyon, belirgin atrofi, nekroz (Zon III perivenüler), fokal nekroz alanları Zon 3'te değerlendirildi. Ayrıca portal inflamasyon ve terminal hepatik venül ile portal vende endotelialitis varlığı araştırıldı. Bulgular yaygınlığı ve ağırlığına göre semikantitatif derecelendirildi. Grade I-hafif (1), Grade II- orta (2) ve Grade III-şiddetli (3) olarak değerlendirildi..Tüm vakaların grade *ortancaları* alınarak diğer gruplarla istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Sonuçların analizi

Deney sonucunda elde edilen veriler ortalama ve standart hatası ile ($\text{Ort} \pm \text{SEM}$) verildi. Gruplar arası verilerin değerlendirilmesinde Mann Whitney U testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı, $p < 0.001$ ise ileri derecede anlamlı olarak kabul edildi.

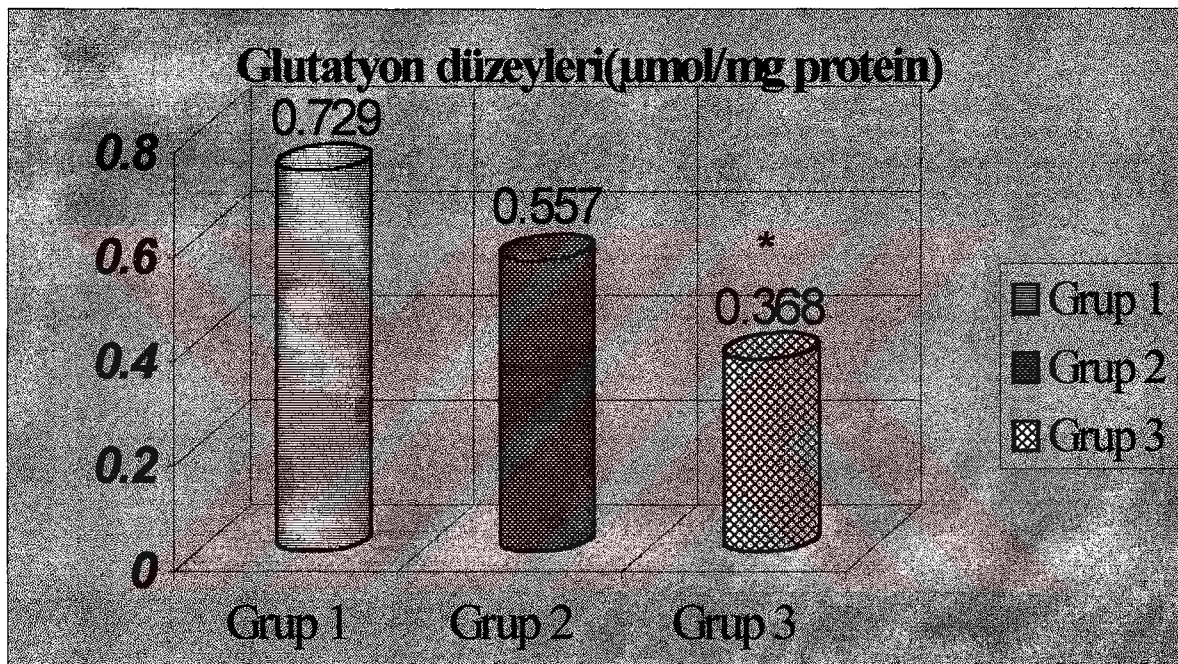
Patolojik değerlendirmede tüm grupların gradeleri tek yönlü Kruskal Wallis varyans analizi ile karşılaştırıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Glutasyon, lipid peroksit (malondialdehit, MDA) deęerleri ve istatistiksel deęerlendirmeleri:

Glutasyon

Grup 1 (0.729 ± 0.20) ve Grup 2 (0.557 ± 0.23) ile Grup 2 (0.557 ± 0.23) ve Grup 3 (0.368 ± 0.08) doku glutasyon düzeyi açısından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak bir farka rastlanmamıştır. Ancak 3. grubun doku glutasyon düzeyi (0.368 ± 0.08) 1. gruba göre (0.729 ± 0.20) istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p < 0.05$) (şekil 7).

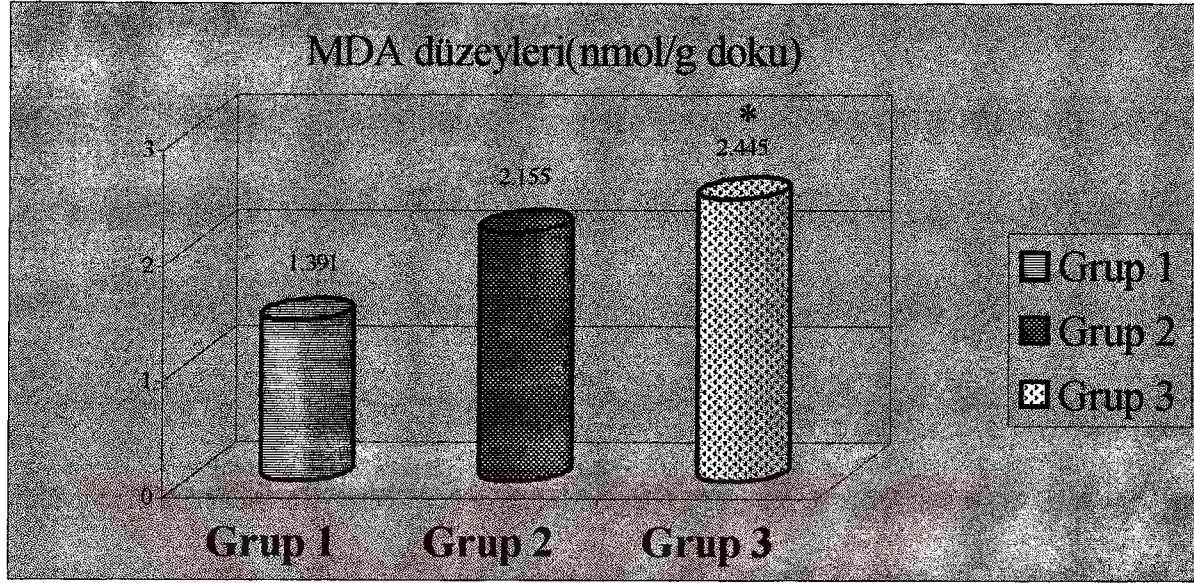


şekil 7:Doku glutasyon düzeylerinin gruplara göre dağılımı.

* $p < 0.05$ (grup 3 ile grup 1 arasında)

Lipid Peroksid(MDA)

Grup 1 (1.391 ± 0.24) ve Grup 2 (2.155 ± 1.26) ile Grup 2 (2.155 ± 1.26) ve Grup 3'ün (2.445 ± 0.78) doku MDA düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı. Ancak Grup 3'ün doku MDA düzeyi 1. gruba göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p < 0.001$, Şekil 8).



Şekil 8: Doku MDA düzeyleri

* $p < 0.001$ (grup 1 ve grup 3 arasında)

Patoloji

Yapılan incelemede ağırlıklı olarak **nekroz** (Zon III perivenüler), **atrofi** (Zon III perivenüler), ve **endotelialitis** (santral ven) parametrelerinde 1. grupta 2. ve 3. gruba göre anlamlı fark saptandı ($p<0.05$).

Sinüzoidal konjesyon: Gruplar arası fark gözlenmedi (**Resim 4**).

Atrofi: Grup 1 ve grup 3 arasında fark gözlenmektedir ($p<0.001$). Diğer gruplar arası istatistiksel incelemede anlamlı fark gözlenmesede grup 1 ve grup 2 arasında fark görülmektedir (**Resim 5**).

Sinüzoidal inflamasyon: Gruplar arası fark gözlenmedi (**Resim 6a**).

Endotelialitis: tüm gruplarda gruplar arası fark gözlendi ($p<0.05$) (**Resim 6b**).

Vakuolizasyon: Sadece grup1 ve grup 3 arasında anlamlı fark gözlendi ($p<0.05$).

Kupffer hiperplazisi: grup 1 ve grup 2 arasında anlamlı fark göstermektedir ($p<0.05$). Grup 1 ve 3 arasında istatistiksel anlamlı fark gözlenmezken grup 2 ve grup 3 arasında istatistiksel olarak fark gözlendi ($p<0.05$) (**Resim 7**).

Hidropik dejenerasyon: Gruplar arası fark göstermemektedir.

Nekroz: Grup 1 ile grup 3 arasında istatistiksel olarak fark gözlendi ($p<0.05$). Grup 1 ve grup 2 arasında da istatistiksel anlamlı olmasa da değerlendirme yapıldığında fark gözlenmektedir (**Resim 8**).

Portal inflamasyon: Gruplar arası istatistiksel fark gözlenmedi.

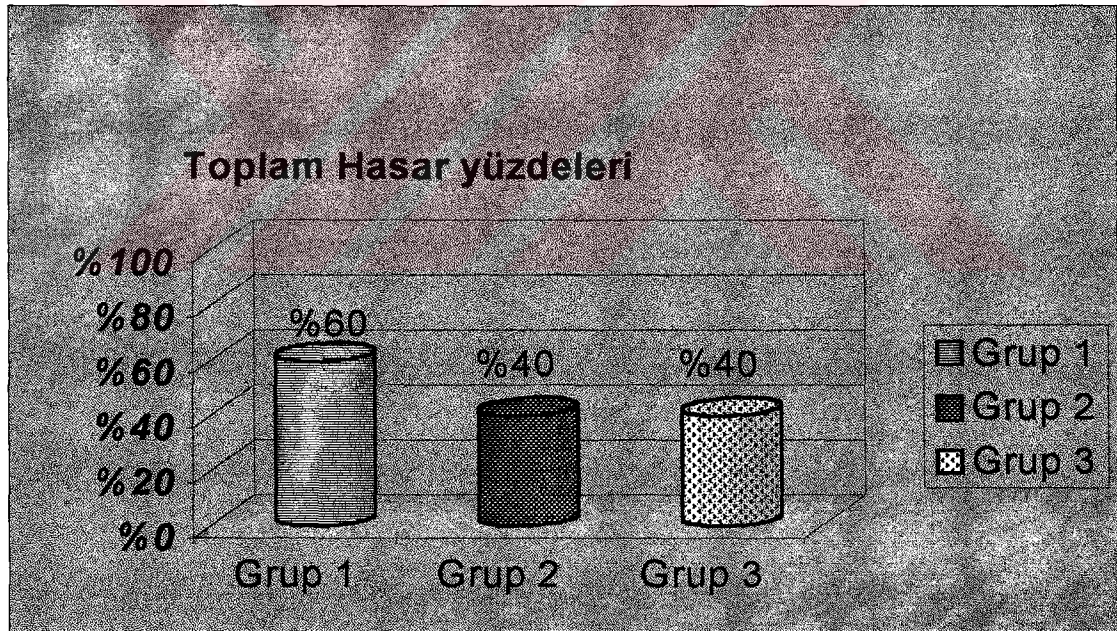
Bu sonuçla 1. gruptan farklı olarak önceden iskemik önkoşullama uygulanan 2. ve 3. gruplar 1. gruba(kontrol) göre iskemiye daha dirençli oldukları histopatolojik olarak saptandı (**Tablo 1**).

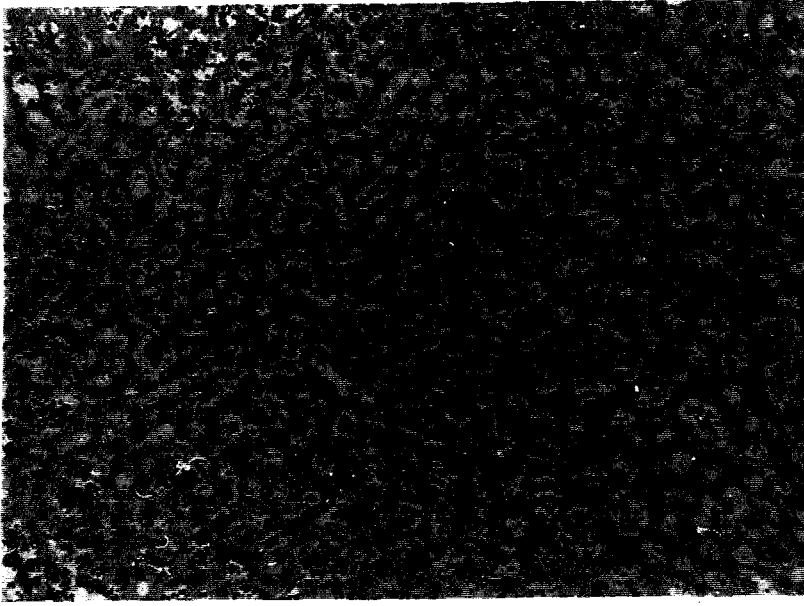
Toplam hasar değerlendirmesi (*maksimum 30*) bakımından 1. grupta hasar derecesi (18/30) %60 iken grup 2'de (12/30) %40, grup 3'te ise (12/30) %40 olarak bulundu.

Buradan, her iki önkoşullama yönteminin de karaciğer iskemi reperfüzyon hasarını %33 oranında azalttığı tespit edildi (**Şekil 9**).

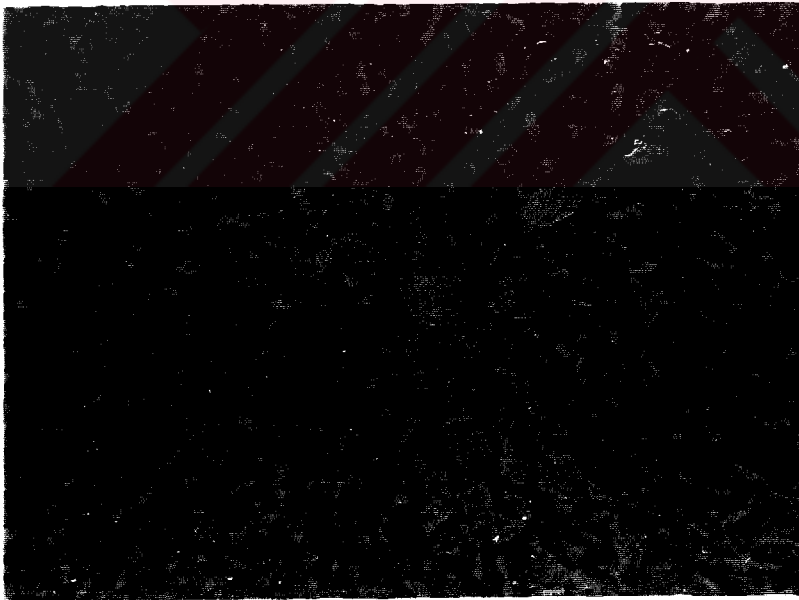
Tablo 1: Grupların histopatolojik değışikliklerinin derecelendirilmesi(gradelemesi)

	Grup 1	Grup 2	Grup 3
Sinüzoidal konjesyon	2	2	2
Kupffer hiperplazi/hipertofi	3	2	3
Sinüzoidal inflamasyon	3	2	2
Vakuolizasyon	1	1	0
Hidropik dejenerasyon	1	1	1
Nekroz(Zon III perivenüler)	1	0	0
Atrofi	2	1	1
Fokal nekroz	2	2	1
Endotelialitis	1	0	1
Portal inflamasyon	2	1	1
Toplam	18/30	12/30	12/30

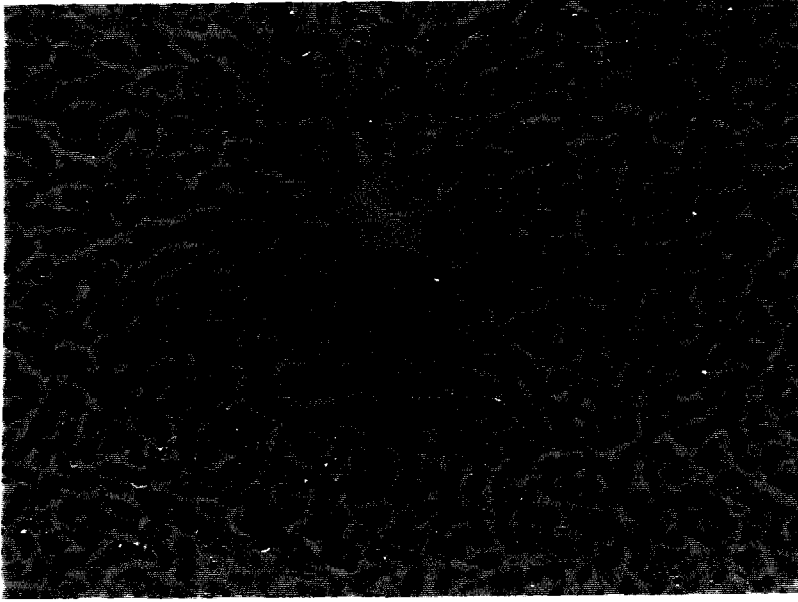
**Şekil 9:** Grupların toplam histolojik gradeleme skorlarının yüzdeleri.



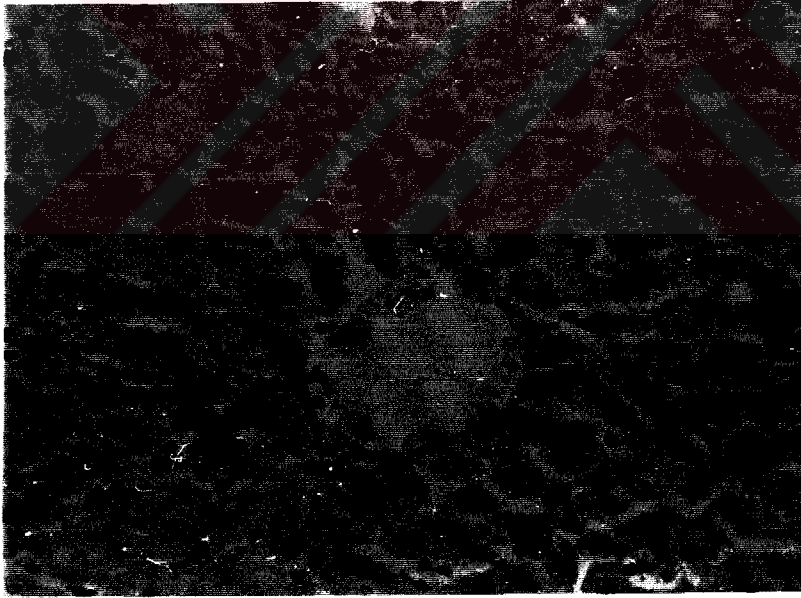
Resim 4: Ağır sinüzoidal konjesyon, grup 1, (HEx200).



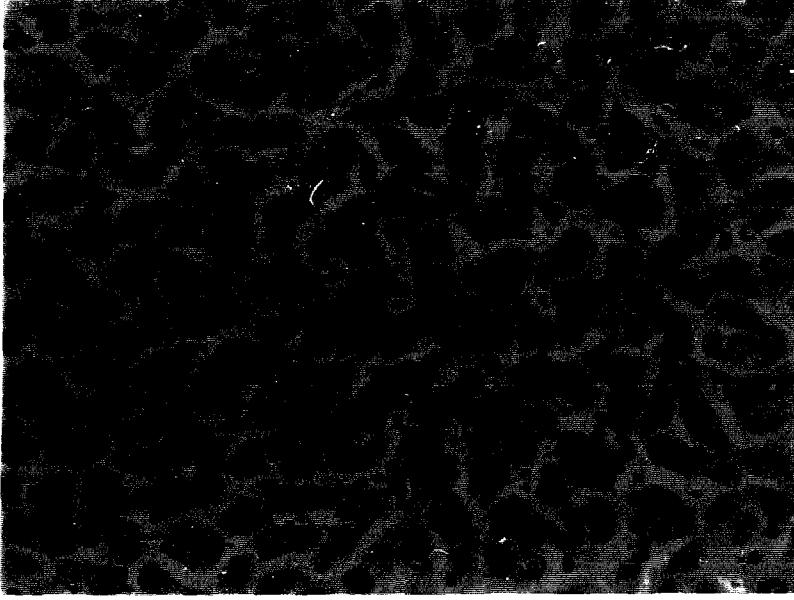
Resim 5: Perivenüler hepatositlerde kayıp, atrofi, sinüzoidal inflamasyon, endotelialitis, grup 1, (HEx200)



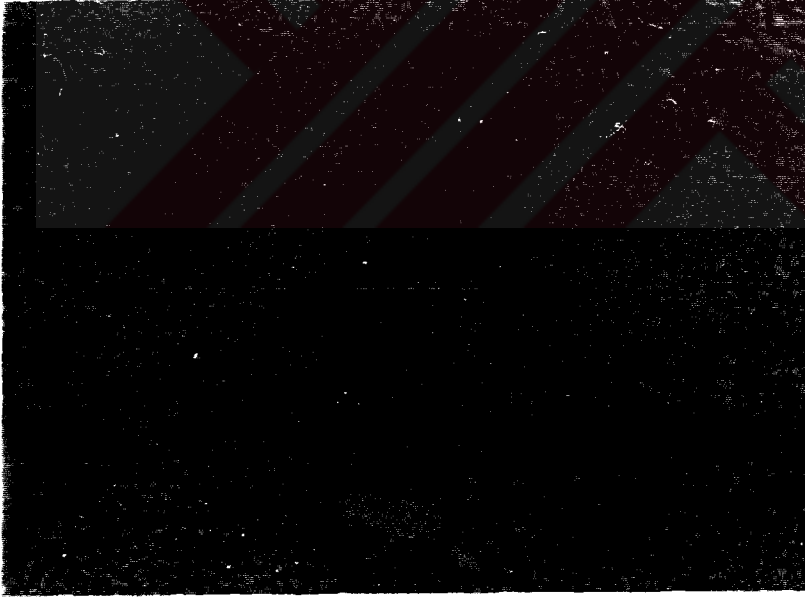
Resim 6a: Perivenüler belirgin sinüzoidal inflamasyon, nötrofil agregatları, grup 1, (HEx200).



Resim 6b: Aynı alanın büyük büyütmesi, santral vende hafif derecede endotelialitis, grup 1, (HEx400).



Resim 7: Kupffer hücre hipertrofisi/hiperplazisi, grup 2, (HEx400).



Resim 8: Perivenüler alanlarda iskemik nekroz, grup 1, (HEx100).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yaklaşık 10 yıldır literatüre iskemik önkoşullama yöntemi olarak geçen bu fenomen, organizmanın günümüze kadar farkedilmemiş olan bir savunma mekanizmasıdır. İlk kez kardiyoloji klinik uygulamaları sırasında farkedilen önkoşullamanın mekanizmaları deneysel modellerle aydınlatılmaya çalışılmıştır^{22,73}. Önkoşullamanın sadece kalbe özgü olmadığı ve böbrek¹³³; karaciğer⁶⁷; beyin⁵² ve iskelet kası⁹⁰ gibi organlarda da varlığı gösterilmiştir. Yöntem olarak önkoşullama ile korunması istenen bölgeye önkoşullama yapılmaktaydı. İlk kez Przylenk¹⁰³ aynı organın önkoşullama yapılmayan diğer bölgelerinin de korunabildiğini keşfetmiş, ardından Gho³⁵ uzak organda yapılan önkoşullamanın kalbi koruduğunu göstermiştir.

Kalp dışında karaciğerin de cerrahi uygulamalar açısından(rezeksiyon, transplantasyon) iskemi reperfüzyon hasarının sıklıkla gözlendiği bir organ olması nedeniyle önkoşullamanın en fazla incelendiği ikinci organ olmuştur^{40,61,100,132}. Ancak şimdiye kadar bütün çalışmalar da karaciğer için aynı organ önkoşullama kullanılmıştır^{40,61,100,132}.

Bu çalışmada ilk kez kalp için geçerli olan uzak organ önkoşullamasının koruyucu etkisinin karaciğer için geçerliliği ve esas organ önkoşullama yöntemi ile de karşılaştırarak aralarındaki farklar araştırılmıştır.

Önceleri karaciğerin kalıcı hasar oluşmadan iskemiye en fazla 15-20 dakika dayanabileceği düşünülmekteydi¹²². Ancak deneysel hepatik iskemi çalışmaları bu geri dönüşü olmayan sürenin sıçanlar için 60-120 dakika, babun ve domuzlar için 90-120 dakika olduğunu tespit etmişlerdir¹²². Hepatik rezeksiyon yapılan hastalarda da 65 dakikaya kadar iskemik kalan karaciğerin sorunsuz geriye döndüğü bildirilmiştir^{26,45}. Karaciğer iskemik hasarı konusunda daha önceden yaptığımız önçalışmalarda 45 dakikalık iskemi süresi ile ışık mikroskopunda ayırd edilebilecek düzeyde yeterli değişiklik gözlemlenemedik, bu yüzden literatüre de uygun olarak 90 dakikalık iskemi süresini kullandık. Daha kısa süreli iskemi uygulandığında elektron mikroskopik inceleme daha aydınlatıcı olabileceği bildirilmektedir¹²².

Karaciğer iskemi-reperfüzyonunda hasar ve koruma mekanizmalarını incelemek için birçok deneysel modeller kullanılmıştır¹²². Geçmişte total karaciğer iskemisi ve/veya portosistemik şant modeli sıklıkla kullanılmaktaydı¹²². Ek olarak değişik derecelerde parsiyel iskemi oluşturarak bölgesel karaciğer iskemi modelleri de kullanılmıştır¹⁰⁰.

Günümüzde artık kullanılan en uygun metod mezenterik venöz konjesyon oluşturmada uygulanabilen karaciğer iskemi-reperfüzyon modelidir. Böylece mezenterik venöz dolaşım bozulmadan ve dolayısıyla barsaklarda konjesyon-iskemi oluşturmada izole karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarı daha iyi değerlendirilebilmektedir¹²².

Önkoşullama işlemi ile literatür uygulamaları farklılık gösterse de, karaciğer için uygulanan önkoşullama genellikle 10'ar dakikalık iskemi reperfüzyon siklusu şeklindedir. Bunun yanında 5'er dakikalık uygulamalarda mevcuttur⁴². Böbrekte yapılan bir önkoşullama çalışmasında 4 dakika iskemi 11 dakika reperfüzyon modeli kullanılmış ve başarılı bir koruma elde edilememiştir⁴⁶. Burada muhtemelen korumayı uyaracak şiddette yeterli bir iskemi süresi sağlanamamıştır. Ayrıca böbrek gibi dolaşan kanın %25'ini alan bir organ için 4 dakika yetersiz kalmış olabilir.

Önkoşullama organlara göre değişebilmektedir. İskelet kası ile yapılan bir çalışmada¹⁶ iki siklus olmak üzere 30 dakika iskemi ve 10 dakika reperfüzyonla ancak koruma sağlanabilmiştir. Biz de çalışmamızda esas organ önkoşullaması için bilinen ve uygulanan 10'ar dakikalık iskemi reperfüzyon yöntemini(grup 2 için) seçtik. Gho'nun kalp için yaptığı çalışmayı örnek alarak mezenterik artere bir kez 10'ar dakikalık iskemi ve reperfüzyon(grup 3) uyguladık ve uzak organ karaciğer için koruma sağlamayı başardık³⁵. Çalışmamızda her iki yönteminde hasarı yaklaşık %33 oranında azaltmış olması yöntemimizin karaciğer için uygunluğunu göstermektedir.

Karaciğer iskemi ve reperfüzyonu sırasında oluşan hasarın çoğu reperfüzyon döneminde olmaktadır¹²⁹. Bu dönemde hem dolaşımdan gelen, hem de dokudaki makrofajlar(kupffer hücresi) karaciğer hasarı oluşturmaktadır^{4,86}. Yapılan çalışmalarda reperfüze dokuda PMN miktarı arttıkça İ/Rhasarının arttığı görülmüştür¹²². Çalışmamızda yapılan patolojik incelemede endotelialitis(PMN infiltrasyonu) parametresinin grade'lerinde kontrol grubunun diğer gruplara göre belirgin fark göstermiş olması ve kontrol grubundaki doku hasarının şiddetinin fazlalığı buna bağlanmıştır.

Histolojik incelemede kullanılan her parametre iskemi ve reperfüzyon sırasında karaciğer dokusunda oluşan hasarın ayrıntılı incelenmesinin bir göstergesidir.

Bu parametreler yapısal olarak gözle görülür şekilde gruplar arası farkı belirgin olarak ortaya koymaktadır. Bu parametreler doğrultusunda önkoşullama gruplarında(grup2 ve grup 3) kontrol grubuna göre yaygın nekroz gözlenmemiştir. Ayrıca atrofi, fokal nekroz, endotelialitis ve sinüzoidal inflamasyon kontrol grubunda iskemi grubuna göre daha fazla

gözlenmiştir. İskemi reperfüzyon hasarından sorumlu kupffer hücre hiperplazisi ve sinüzoidal inflamasyon kontrol grubunda grup 2'ye göre anlamlı farklıdır. Bu incelemeye göre endotelialitisin önkoşullama gruplarındaki azlığı korumanın bu parametre üzerinden etki edebildiğini düşündürmektedir.

Patolojik skorlama total olarak değerlendirildiğinde ise önkoşullama yapılan iki grup arası fark olmadığı görülmektedir. Buradan UOİÖ ile EOİÖ'nün karaciğeri eşit düzeyde koruyabildiği ortaya çıkmaktadır. Ancak her iki grup arasında kupffer hiperplazisi, vakuolizasyon ve endotelialitis parametrelerinde istatistiksel anlamlı farklar tespit edilmiş olması bu iki yöntemin etki mekanizmalarında farklılıklar olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim Gho³⁵ tarafından yapılan çalışmada, ganglion blokeri hekzametonyumun mezenterik arter ile yapılan uzak organ önkoşullamanın kalbi koruyucu etkisini bozduğu görülmüştür. Buradan da uzak organda koruma oluşumunda nöral yolların etkin olarak rol aldığı bildirilmektedir. Bu mekanizma da henüz aydınlatılamamıştır. Bundan başka aynı organ farklı bölgedeki önkoşullamayı hekzametonyum etkilememiştir. Kalp gibi zengin sinir ağları olan karaciğer için de bu nöral yollar söz konusu olabilir.

Hücre içi antioksidan sistemlerden birisi olan glutatyon İ/R çalışmalarında parametre olarak kullanılmaktadır^{51,65,127}. Bu çalışmada kontrol grubu ve grup 2 arasında ve önkoşullama gruplarının (grup2 ve grup 3) arasında istatistiksel fark saptanmamıştır. Kontrol grubu ve grup 3 arasında ise istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır($p<0.05$). Buradan iskemi reperfüzyon sırasında doku glutatyon düzeyinde kontrol grubu ve grup 2 arasında fark olmadığı, patolojik inceleme sonuçları göz önüne alındığında ortaya çıkan korumayı glutatyondan başka faktörlerin de etki etmiş olabileceği düşünülmektedir. Okuda ve grubunun⁹⁴ karaciğer (90 dakika iskemi) iskemi-reperfüzyon hasarı ile ilgili yaptığı çalışmada, serbest oksijen radikali oluşumunun çok düşük olduğunu ve oksidatif stres durumlarına glutatyonun majör intrasellüler defans sistemi olarak katılmadığını göstermiştir. Yine kardiyak iskemik önkoşullama yapılan bir çalışmada, antioksidan savunma sistemlerinin önkoşullama mekanizmalarına etki etmediği, korumanın başka faktörler üzerinden olabileceği gösterilmiştir¹²³. Doku lipid peroksit(MDA) düzeyleri ile yapılan değerlendirmelerde de iskemik dokularda oluşan fonksiyonel ve yapısal değişikliklerle MDA düzeyleri arasında ilişki saptanmamıştır¹⁵. Çalışmamızda önkoşullama gruplarında patolojik incelemede nekroz açısından belirgin fark saptanırken grup 1 ve grup 2 arasında lipid peroksit düzeyi açısından fark saptanmamıştır.

İskemik önkoşullama ile dokular kısa süreli de olsa kalıcı hasarlar oluşmadan iskemi ve reperfüzyona maruz kalmaktadır. Kullandığımız biyokimyasal parametreler fonksiyonel değişimleri, histopatolojik değerlendirme ise yapısal etkilenmeleri göstermektedir. Önkoşullama olarak kullanılsa bile, önkoşullamanın oluşturduğu dokudaki minimal travma nedeni ile doku lipid peroksit düzeyleri gruplar arası farkları göstermekte yetersiz kalmış olabilir. Yine, önkoşullama ile yapısal korunma bulunduğu halde glutatyonun düzeylerinde belirgin fark gözlenmemesi, bu parametrenin önkoşullama çalışmalarında tek başına yeterli olamayacağının göstergesi olabilir.

Sonuç olarak, karaciğerde iskemik önkoşullama ister aynı organda ister uzak organda olsun karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarını histopatolojik olarak %33 oranında azaltmaktadır. Burada uzak organ kullanmanın avantajı ve klinik uygulaması, transplantasyon veya rezeksiyonlar sırasında önkoşullama için aynı organda başka bir işleme gerek kalmadan yapılabilmesi veya bacak gibi iskelet kasları denenerek aynı etki oluşuyorsa bunların kullanılması şeklinde olabilir. Klinik çalışmalarla da desteklendiğinde, bu çalışmanın karaciğer cerrahisine katkıları olacaktır.

ÖZET

İskemik önkoşullama, kısa süreli tekrarlanan iskemi ve reperfüzyon dönemleri ile sonraki daha uzun süreli iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu, indüklenabilen güçlü bir endojen mekanizmadır. Bu mekanizmanın varlığı miyokard, böbrek, iskelet kası, beyin, ve karaciğerde gösterilmiştir. Uzak organda yapılan iskemik önkoşullama da miyokardial iskemi reperfüzyon hasarını azaltmaktadır. Buradan yola çıkarak bu çalışmada mezenterik arter veya karaciğer pedikülü kullanarak oluşturulan iskemik önkoşullama yöntemlerinin karaciğer iskemi reperfüzyon hasarını önleyici etkilerini araştırıldı.

Hepatik pedikülde (HA) 10 dakika iskemi, 10 dakika reperfüzyon yapılarak iskemik önkoşullama oluşturdu. Daha sonra karaciğer sol ve median lobunda 90 dakika iskemi 180 dakika reperfüzyon yapıldı. Diğer bir grup sıçanda iskemik önkoşullama işlemi için mezenterik arter (MA) kullanıldı ve iskemi reperfüzyon hasarı karaciğerin aynı loblarında(sol ve median) çalışıldı. İskemik reperfüzyon hasar değerlendirmesinde, doku glutatyon (GSH) ve doku lipid peroksit (MDA) düzeyleri çalışıldı. Ayrıca tüm hayvanlarda histopatolojik inceleme yapılarak hasar düzeyleri skorlandırıldı.

Doku GSH düzeyleri, MA ile önkoşullama yapılan gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu($p<0.05$). Diğer gruplar arası istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi. Doku MDA düzeyi kontrol grubuyla MA grubu arasında istatistiksel anlamlı yükseklik gözlenirken($p<0.001$), diğer gruplar arası istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi. Histopatolojik incelemede, kontrol grubunda %60 oranında hasar tespit edilirken önkoşullama yapılan her iki grupta da hasar oranı %40 düzeyindeydi.

Sonuçta, iskemik önkoşullama için HA veya MA kullanımı ile karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı heriki yöntemle de %33 oranında azalmaktadır. Kalp cerrahisinde başarıyla kullanılan bu yöntem, karaciğer operasyonlarında da (rezeksiyon, transplantasyon) yararlı olabilir.

KAYNAKLAR

1. Adkinson D, Hollwarth ME, Benoit JN: Role of free free radical in ischemia reperfusion injury to the liver. *Acta Physiol Scan* 548: 101-7, 1986.
2. Andreotti F, Pasceri V, Hackett DR, Davies GJ, Haider AW, Maseri A: Preinfarction angina as a predictor of more rapid coronary thrombolysis in patients with acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 334: 7-13, 1996.
3. Ashraf M, Suleiman J, Ahmad M: Calcium preconditioning elicits a unique protection against calcium paradox injury in rat heart: Role of adenosine. *Circ Res* 74: 360-8, 1994.
4. Atalla SL, Toledo-Pereyre LH, MacKenzie GH, Cederna JP: Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers. *Transplantation* 40: 584-590, 1985.
5. Banerjee A, Locke-Winter C, Rogers KB, Mitchell MB, Bensard DD, Brew EC, Cairns CB, Harken AH: Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an alpha-1 adrenergic mechanism. *Circ Res* 73: 656-63, 1993.
6. Basaga HS: Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 68: 989-98, 1990.
7. Baxter GF, Marber MS, Patel VC, Yellon DM: Adenosine receptor involvement in a delayed phase of protection 24 hours following ischemic preconditioning. *Circulation* 90: 2993-9, 1994.
8. Besund K, Lindsetmo RO, Rasmussen LT: Tumor necrosis factor and interleukin 1 appereance in experimental gram-negative septic shock. *Arch Surg* 126: 591-7, 1991.
9. Boggiolini M, Walz A, Kunkel SL: Neutrophil activating peptide-1/IL-8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 84: 1045-9, 1989.
10. Brown JM, , Repine J, Shanley P, White C, Grosso MA, Banerjee A, Bensard D, Harken AH: Neutrophils contribute to TNF induced myocardial tolerance to ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 24: 485-91, 1992.
11. Brown JM, White CW, Terada LS, Grosso MA, Shanley PF, Mulvin DW, Banerjee A, Whitman GJ, Harken AH, Repine JE: Interleukin-1 pretreatment decreases ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5026-33, 1990
12. Bullough DA, Magill MJ, Firestein GS, Mullane KM: Adenosine activates A₂ receptors to inhibit neutrophil adhesion and injury to isolated myocytes. *J Immunol* 155: 2579-87, 1995.
13. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y: Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers. Effect of reperfusion. *Hepatology* 13: 83-95, 1991.

14. Callery MP, Kamei T, Flye MW: Kupffer cell blockade increases mortality during intrabdominal sepsis despite improving systemic immunity. *Arch Surg* 125: 36-41, 1990.
15. Carnongi A, Pasini E, Cecuni C, Ferrari R, Curello S, Benigno M, Visioli: Is lipid peroxidation responsible for the damage caused by postischemic reperfusion. *Cardiologia* 36: 123-8, 1991.
16. Carrol CMA, Carrol SM, Overgoor MLE, Tobin G, Barker JH: Acute ischemic preconditioning of skeletal muscle prior to flap elevation augments muscle-flap survival. *Plast Reconstr Surg* 100: 58-65, 1997.
17. Chaudry IH: Cellular mechanisms in shock and ischemia and their correction. *Am J Physiol* 245: R117-21, 1983.
18. Cheeseman KH, Slater TF: An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 49: 481-93, 1993.
19. Clark WM, Madden KP, Rothlein R, Zivin JA: Reduction of central nervous system ischemic injury by monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule. *J Neurosurg* 75: 623-7, 1991.
20. Cleveland JC, Meldrum DR, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH: Adenosine preconditioning of human myocardium is dependent upon the ATP-sensitive potassium channel. *J Mol Cell Cardiol* 29: 175-81, 1997.
21. Cleveland JC, Wolmering M, Meldrum DR, Rowland RT, Rehring TF, Sheridan BC, Harken AH, Banerjee A: Ischemic preconditioning in human and rat ventricle. *Am J Physiol* 271: H1786-92, 1996.
22. Cotina A, Ambrose JA, Prieto-Granada J: Left ventricular function after myocardial infarction. Clinical and angiographic correlations. *J Am Coll Cardiol* 5: 619-24, 1985.
23. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA: Oxygen radicals and human disease. *Ann Int Med* 107: 526-45, 1993.
24. Cybulsky MI, Colditz IG, Movat HZ: The role of interleukin 1 in neutrophil leukocyte emigration induced by endotoxin. *Am J Pathol* 124: 367-72, 1986.
25. Dahm LJ, Schultze AE, Roth RA: Activated neutrophils injure the isolated, perfused rat liver by an oxygen radical-dependent mechanism. *Am J Pathol* 139: 1009-20, 1991.
26. Delva E, Barberousse JP, Nordlinger B: Hemodynamic and biochemical monitoring during major liver resection with use of hepatic vascular exclusion. *Surgery* 95: 309-28, 1984.

27. Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 257: L163-73, 1989.
28. Dinarello CA: Biology of interleukin 1. *FASEB J* 2: 108-115, 1988.
29. Donnelly T, Sievers R, Vissern F, Welch W, Wolfe C: Heat shock protein induction in rat hearts: A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion? *Circulation* 85: 769-78, 1992.
30. Downey JM, Cohen MV. Arguments in favor of protein kinase C playing an important role in ischemic preconditioning. *Basic Res cardiol* 92: suppl 2, 37-39, 1997.
31. Dreyer WJ, Michael LH, West MS: Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. *Circulation* 84:400-11, 1991.
32. Ellman GL: Tissue sulphidryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-7, 1959.
33. Faymonville ME, Pincemail J, Duchateau J, Baglioni C, Bussolino F: Myeloperoxidase and elastase as marker of leukocyte activation during cardiopulmonary bypass in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg* 102: 309-17, 1991.
34. Fong Y, Moldawer LL, Shires GT, Lowry SF: The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical injury. *Surg Gynecol Obstet* 170: 363-78, 1990.
35. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD: Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 94 (9): 2193-2200, 1996
36. Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN: Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 251: G567-74, 1986.
37. Gross GJ, Auchampach J: Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevent myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 70: 223-7, 1992.
38. Gutteridge JMC: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41: 1819-28, 1995.
39. Hammerschmidt DE, Harris PD, Wayland H: Complement induced granulocyte aggregation in vivo. *Am J Pathol* 102: 146-50, 1981.
40. Hardy KJ, McClure DN, Subwongcharoen S: Ischemic preconditioning of the liver: a preliminary study. *Aust N Z J Surg* 66:10; 707-10, 1996.
41. Harian JM, Levine JD, Callahan KS: Glutathione redox cycle protects cultured endothelial cells against lysis by extracellularly generated hydrogen peroxide. *J Clin Invest* 73: 706-13, 1984.

42. Heusch G, Schulz R: Endogenous protective mechanisms in myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 80: 26A-33A, 1997.
43. Hinder RA, Stein HJ: Oxygen derived free radicals. *Arch Surg* 126: 104-5, 1991.
44. Hirasawa H, Chaudry IH, Baue AE: Improved hepatic function and survival adenosine triphosphate-magnesium chloride after hepatic ischemia. *Surgery* 83: 655-62, 1978.
45. Huguet C, Nordlinger B, Bloch P, Conard J: Tolerance of the human liver to prolonged normothermic ischemia. *Arch Surg* 113: 1448, 1978.
46. Islam CF, Mathie RT, Dinneen MD, Kiely EA, Peters AM, Grace PA: Ischemia-reperfusion injury in the rat kidney: the effect of preconditioning. *Br J Urol* 79: 842-47, 1997.
47. Issekutz TB: Effects of six different cytokines on lymphocyte adherence to microvascular endothelium and in vivo lymphocyte migration in the rat. *J Immunol* 144: 2140-6, 1990.
48. Iwamoto T, Bai XJ, Downey HF: Preconditioning with supply-demand imbalance limits infarct size in dog heart. *Cardiovasc Res* 27: 2071-2076, 1993.
49. Jaeschke H, Farhood A: Neutrophil and kupffer cell induced oxidant stress and ischemia reperfusion injury in rat liver *Am J Physiol* 260: G355-62, 1991.
50. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW: Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 4: 3355-9, 1990.
51. Katz A, Oldham KT, Guice KS, Coran AG: Oxidized glutathione as a marker of ischemia reperfusion associated with single lung transplantation. *J Am Coll Surg* 180: 25-32, 1995.
52. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Ninobe M, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Mikoshiba K, Kamada T: "Ischemic tolerance" phenomenon found in the brain. *Brain Res* 528: 21-24, 1990.
53. Kitakaze M, Hori N, Kamada T: Role of adenosine and its interaction with alpha-adrenoceptor activity in ischemia and reperfusion injury of the myocardium: *Cardiovascular Res* 6: 631-9, 1993.
54. Kitakaze M, Minamino T, Node K, Kamamura K, Hori M: Activation of ecto-5'-nucleotidase and cardioprotection by ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 91: 23-32, 1996.

55. Kitakaze M, Node K, Minamino T, Kamamura K, Funaya H, Shinozaki Y, Chujo M, Mori H, Inoue M, Hori M, Kamada T: Role of activation of protein kinase C in the infarct size limiting effect of ischemic preconditioning through the activation of 5'-nucleotidase. *Circulation* 93: 781-9, 1996.
56. Klebanoff SJ, Vadas JM, Harlan JM, Smith WJ, Murphy MD. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol* 136: 4220-5, 1986.
57. Klempner MS, Dinarello CA, Gallin JI: Human leukocytic pyrogen induces release of specific granule contents from human neutrophils. *J Clin Invest* 61: 1330-5, 1978.
58. Kloner RA, Shook T. Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI-4: A clinical correlate to preconditioning. *Circulation* 91: 37-41, 1995.
59. Koning MMG, Simonis LAJ, De Zeeuw S, Nieukop S, Post S, Verdouw PD: Ischemic preconditioning by partial occlusion without intermittent reperfusion. *Cardiovascular Res* 28: 1146-1151, 1994.
60. Koning MMG, De Zeeuw S, Nieukop S, De Jong JW, Verdouw PD: Is myocardial infarct size limitation by ischemic preconditioning an "all or nothing" phenomenon? *Ann NY Acad Sci* 723: 336-336, 1994.
61. Kume M, Yamamoto Y, Saad S, Gomi T, Kimoto S, Shimabukuro T, Yagi T, Nakagami M, Takada Y, Morimoto T, Yamaoka Y: Ischemic preconditioning of the liver in rats: Implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 128: 251-8, 1996.
62. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, Kamada T, Tada T: Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circulation Res* 72: 1293-1299, 1993.
63. Lawson CS, Downey JM: Preconditioning: state of the art myocardial protection. *Cardiovascular Res* 27: 542-550, 1993.
64. Li YW, Whittaker P, Kloner RA: The transient nature of the effect of ischemic preconditioning on myocardial infarct size and ventricular arrhythmia. *Am Heart J* 123: 346-353, 1992.
65. Linas SL, Shanley PF, White CW: Oxygen metabolite mediated injury in perfused kidneys is reflected by consumption of DMTU and glutathione. *Am J Physiol* 253: 692-701, 1987.

66. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AM, Olsson RA, Downey JM: Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A₁ adenosine receptors in rabbit heart: *Circulation* 84: 350-6, 1991.
67. Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S: Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc* 25: 3303-3304, 1993.
68. Luscinkas FW, Brock AF, Arnaout MA, Gimbrone MA: Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1-dependent and leukocyte(CD11/CD18)-dependent mechanisms contribute to polymorphonuclear leukocyte adhesion to cytokine activated human vascular endothelium. *J Immunol* 142: 2257-2263, 1989.
69. Luscinkas FW, Cybulsky MI, Kiely JM: Cytokine activated human endothelial monolayers support enhanced neutrophil transmigration via a mechanism involving both endothelial-leukocyte adhesion molecule-1. *J Immunol* 146: 1617-25, 1991.
70. Ma X, Lefer DJ, Lefer AM, Rothlein R: Coronary endothelial and cardiac protective effects of a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 86: 937-46, 1992.
71. Marber MS, Latchman DS, Walker M, Yellon DM: cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 88: 1264-1272, 1993.
72. Marubayashi S, Dohi K, Kawasaki T: Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: Prevention of damage by tocopherol administration. *Surgery* 99: 184-92, 1986.
73. Matsuda Y, Ogawa H, Moritini K: Effects of the presence and absence of preceding on left ventricular function after myocardial infarction. *Am Heart J* 108: 955-8, 1984.
74. Maulik N, Watanabe M, Engelman D, Engelman RM, Kagan VE, Kisin E, Tyurin V, Cordis GA, Das DK: Myocardial adaptation to ischemia by oxidative stress induced by endotoxin. *Am J Physiol* 269: C907-13, 1995.
75. McCord JM: Oxygen derived free radical in postischemic tissue injury. *N Eng J Med* 312: 159-63, 1983.
76. Mei DA, Elliott Gt, Gross GJ: KATP channels mediate late preconditioning against infarction produced by monophosphoryl lipid A. *Am J Physiol* 271: H2723-9, 1996.
77. Meldrum DR. Mechanisms of cardiac preconditioning: Ten years after the discovery of ischemic preconditioning. *J Surg Res* 73: 1-13, 1997.

78. Meldrum DR, Cleveland JC, Mitchell MB, Sheridon BC, Robertson F, Harken AH, Banerjee A: Protein kinase C mediates Ca^{2+} induced cardioadaptation to ischemia-reperfusion injury: Am J Physiol 271: R1718-24, 1996.
79. Meldrum DR, Cleveland JC, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH: Calcium induced inotrophy is in part mediated by protein kinase C. J Surg Res 63: 400-13, 1996.
80. Meldrum DR, Cleveland JC, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH, Meng X: Early and delayed preconditioning: Differential mechanisms and additive protection. Am J Physiol 42: H725-29, 1997.
81. Meldrum DR, Cleveland JC, Sheridan BC, Meng X, Robertson F, Cain BS, Harken AH, Banerjee A: Protein kinase isoform diversity in preconditioning. J Surg Res 69: 183-194, 1997.
82. Meldrum DR, Cleveland JC, Sheridan BC, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH: Cardiac surgical implications of calcium dyshomeostasis in the heart. Ann Thorac Surg 61: 1273-82, 1996.
83. Meldrum DR, Mitchell MB, Banerjee A, Harken AH: Cardiac preconditioning: Induction of endogenous tolerance to ischemia-reperfusion injury. Arch Surg 128: 1208-1212, 1993.
84. Meng X, Brown JM, Ao L, Franklin W, Banerjee A, Harken AH: Heat shock protein 70 contributes to the induced cardiac resistance to bacterial lipopolysaccharide in the rat. Am J Physiol 271: C1316-24, 1996.
85. Meng X, Brown JM, Ao L, Banerjee A, Harken AH: Norepinephrine induces cardiac heat shock protein and delayed cardioprotection in the rat through α_1 -adrenoceptors. Cardiovasc Res 32: 374-80, 1996.
86. Metzger J, Dore SP, Lauterburg BH: Oxidant stress during reperfusion of ischemic liver: no evidence for a role of xanthine oxidase. Hepatology 8: 580-4, 1988.
87. Ming WJ, Bersani L, Montovani A: Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. J Immunol 138: 1469-74, 1987.
88. Mitchell MB, Meng X, Parker CG, Harken AH, Banerjee A: Preconditioning of isolated heart is mediated by protein kinase C. Circ Res 76: 73-8, 1995.
89. Miyawaki H, Ashraf M: Ca^{2+} as a mediator of ischemic preconditioning. Circ Res 80: 790-4, 1997.

90. Mousney RA, Pang CY, Forrest C: Preconditioning: a new technique for improved muscle flap survival. *Otolaryngology-Head and Neck Surg* 107: 549-552, 1992.
91. Murray CE, Jennings RB, Reimer KA: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 75: 1124-1136, 1986.
92. Nelson DW, Brown JM, Banerjee A, Bensard DD, Rogers KB, Locke-Winter CR, Anderson BO, Harken AH: Pretreatment with a nontoxic derivative of endotoxin(MPL) induces functional protection against cardiac ischemia reperfusion injury. *Surgery* 110: 365-72, 1991.
93. Nishizuka Y. Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-10, 1992.
94. Okuda M, Lee HC, Chance B, Kumar C: Glutathione and ischemia-reperfusion injury in the perfused rat liver. *Free Radic Biol Med* 12: 271-9, 1992.
95. Ontell SJ, Makowka L, Trager J: Pharmacologic modulation of experimental postischemic hepatic function. *Ann Surg* 209: 200-10, 1989.
96. Ottani F, Galvani M, Ferrini D, Sorbello F, Limonetti P, Pantoli D, Rusticali F. Prodromal angina limits infarct size: *Circulation* 91: 291-293, 1995.
97. Paller MS, Hebbel RP: Ethane production as a measure of lipid peroxidation after renal ischemia. *Am J Physiol* 251: F839-43, 1986.
98. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF: Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin invest* 74: 1156-64, 1984.
99. Patych RE, Chuknyiska RS, Bulkley GB: The primary localization of free radical generation after anoxia/reoxygenation in isolated endothelial cells. *Surgery* 102: 122-31, 1987.
100. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J: Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: Role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 25: 934-7, 1997.
101. Poggetti RS, Moore EE, Moore FA, Bensard DD, Parsons P, Anderson BO, Banerjee A: Gut and liver coordinated metabolic response following major torso injury. *J Surg Res* 52: 27-35, 1992.
102. Poggetti RS, Moore EE, Moore FA, Koike K, Tudor R, Anderson BO, Banerjee A: Quantifying oxidative injury in the liver. *Am J Physiol* 268: G471-7, 1995.

103. Przylenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P: Regional ischemic "preconditioning" protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 87: 893-899, 1993.
104. Raud J, Lindbom L: Leukocyte rolling and firm adhesion in the microcirculation. *Gastroenterology* 104: 310-4, 1993.
105. Sacks S, Mohri M, Arras M, Schwarz ER, Shaper W: Ischemic preconditioning-time course of renewal in the pig. *Cardiovasc Res* 27: 551-555, 1993.
106. Sayeed MM, Miatra SR: Effect of diltiazem on altered cellular calcium regulation during endotoxic shock. *Am J Physiol* 253: R549-57, 1987.
107. Schleimer RP, Rutledge BK: Cultured human vascular endothelial cells acquire adhesiveness for neutrophils after stimulation with Interleukin 1, endotoxin, and tumor-promoting phorbol diesters. *J Immunol* 136: 649-54, 1986.
108. Slater TF: Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 222: 1-15, 1984.
109. Smith CW, Kishimoto TK, Abbass O, Katz S, Skosey JL: Chemotactic factors regulate lectin adhesion molecule(LECAM)-dependent neutrophil adhesion to cytokine stimulated endothelial cells in vitro. *J Clin Invest* 87: 609-18, 1991.
110. Speechly-Dick ME, Grover GJ, Yellon DM: Does ischemic preconditioning in the human involve protein kinase C and ATP-dependent K⁺ channel?. *Circ Res* 77: 1030-42, 1995.
111. Steenbergen C, Fralix T, Murphy E: Role of increased cytosolic calcium concentration in myocardial ischemic injury. *Basic Res Cardiol* 88: 456-63, 1993.
112. Steenbergen C, Perlman ME, London RE, Murphy E: Mechanism of preconditioning: ionic alterations. *Circ Res* 72: 112-8, 1993.
113. Suzuki S, Nakamura S, Koizumi T: The beneficial effect of a prostaglandin I₂ analog on ischemic rat liver. *Transplantation* 52:978-83, 1991.
114. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH: Monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule 1 as an effective protection for liver ischemia and reperfusion injury. *Trans Proc* 26: 325-7, 1994.
115. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D: Neutrophil infiltration as an important factor of liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK 506 and cyclosporine. *Transplantation* 55: 1265-72, 1993.

130. Yellon DM, Alkhulaifi A, Pugsley WB: Preconditioning the human myocardium. *Lancet* 342: 276-278, 1993.
131. Yellon DM, Baxter GF: A second window of protection or delayed preconditioning: Future horizons for myocardial protection?. *J Mol Cell Cardiol* 27: 1023-32, 1995.
132. Yin DP, Sankary HN, Chong ASF, Ma LL, Shen J, Foster P, Williams JW: Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury. *Transplantation* 66: 152-7, 1998.
133. Zager RA, Baltes LA, Sharma HM, Jukowicz MS: Responses of the ischemic acute renal failure kidney to additional ischemic events. *Kidney Int* 26: 689-700, 1984.
134. Zhou W, McCollum MO, Levine BA, Olson MS: Inflammation and platelet activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology* 16: 1236-40, 1992.

