



T.C

SAĞLIK BAKANLIĞI

ANKARA NUMUNE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

1. CERRAHİ KLİNİĞİ

Klinik Şefi: Doç. Dr. SÜLEYMAN HENGİRMEN

**TOTAL VASKÜLER EKSKLÜZYONUN
SIÇAN KARACİĞERİNDE SEGMENTER DÜZEYDEKİ ETKİLERİ.
(DENEYSEL ÇALIŞMA)**

Dr. Erdal Polat

GENEL CERRAHİ UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Op. Dr. SERDAR TOPALOĞLU

ANKARA 2006

TOTAL VASKÜLER EKSKLÜZYONUN SIÇAN KARACİĞERİNDE SEGMENTER DÜZEYDEKİ ETKİLERİ

Özet

Total vasküler eksklüzyon(TVE) karaciğerde sıcak iskekiye neden olur. Selektif TVE esnasında karaciğerin inflow ve outflow oklüzyonuna bağlı gelişen olaylar şimdiye kadar yapılan çalışmalarda tam olarak aydınlatılamadı. Bu çalışmanın amacı rat karaciğerinde inflow-outflow obstrüksiyonun karaciğer hasarına olan etkilerini araştırmaktır.

Materyal-metod:

Kırk adet Wistar-Albino rat dört gruba ayrıldı. Karaciğer inflow oklüzyonu (group A ve C) veya inflow-outflow oklüzyon (grup B ve D) 30 dakika boyunca uygulandı. Örnekler iskeki periodunun sonunda toplandı. Karaciğer dokusunda oksidatif hasarı ve karaciğer histopatolojisini inceledik.

Bulgular:

TVE uygulamasında oksidatif stres ve histopatolojik değişiklikler daha belirgindi. Hepatik superoxide dismutase, glutathione, and glutathione S-transferase seviyelerinde anlamlı değişiklikler gösterildi. Rat karaciğerinin santral segmentleri inflow oklüzyonundan anlamlı olarak etkilenirken, dome segmentleri inflow-outflow oklüzyonundan anlamlı olarak etkilendi.

Sonuç:

Karaciğerin inflow-outflow oklüzyonu sadece inflow oklüzyonuna kıyasla karaciğerde daha fazla doku hasarı oluşturdu. TVE'ye bağlı hasarın dağılım paterni diğer iyi bilinen iskeki-reperfüzyon hasarlarına göre farklılık gösteriyor izlenimi veriyor.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

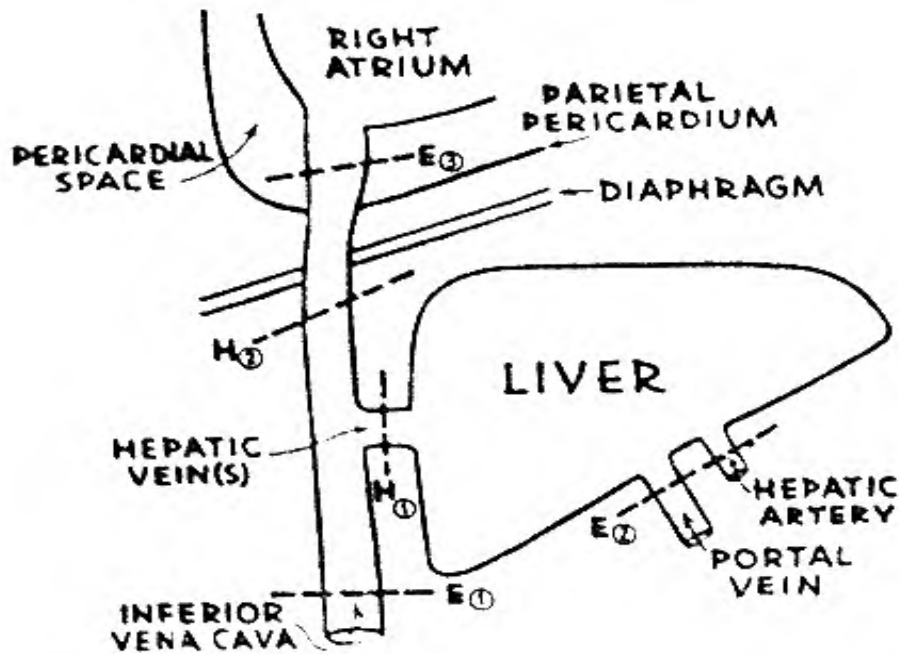
Karaciğer rezeksiyonunda özellikle sağ lob posterior bölgede, kaudat lobda ve vena kava komşuluğunda yer alan tümörlerin rezeksiyonu sırasında kanamayı azaltmaya yönelik çalışmaların sonucunda tanımlanmış olan total vasküler eksklüzyon yöntemi, ancak karaciğer cerrahisi ile uğraşan ve ileri derecede deneyime sahip kliniklerde uygulama yeri bulabildiği için yöntemin uygulama süresi, şekli ve karaciğer fizyolojisi üzerine olan etkileri araştırmak amacıyla yapılmış yayınlar oldukça kısıtlı sayıda bulunmaktadır.

Kliniğimizde daha önce yapılan deneysel çalışmalarda; TVE tekniğinin karaciğer rejenerasyonu ve hücresel düzeydeki hasar üzerine olan etkileri ve oluşan hasarın nedenleri araştırılmıştır. Literatürde iskemi ve hipoksi sonrası oluşan karaciğer hasarının topografik dağılımına ilişkin kısıtlı ve çelişkili sonuçların olması üzerine daha önceki deneysel çalışmalarımızla ilişkili olarak, klasik portal iskemi ve TVE sonrası gelişen karaciğer hasarının topografik dağılımını araştırmak amacı ile bu çalışmamız planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

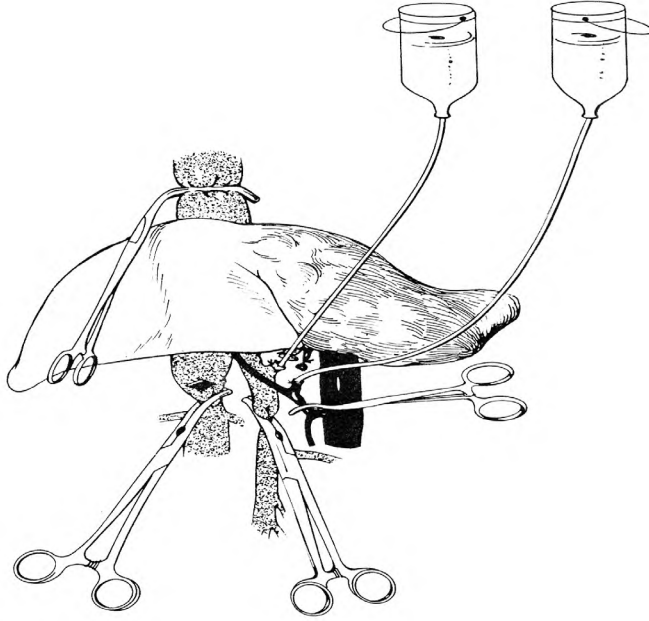
2.1. Total Vasküler Eksklüzyonun Tarihçesi

Karaciğerin vasküler izolasyonu ile ilgili çalışmalar 1960' lı yıllardan bu yana devam etmektedir. Heaney ve arkadaşları supra ve infrahepatik vena kavayı, portal triadı ve aortayı klempler vasıtası ile kontrol ederek literatürdeki ilk TVE şeklini tanımlamışlardır (1), (şekil 1).



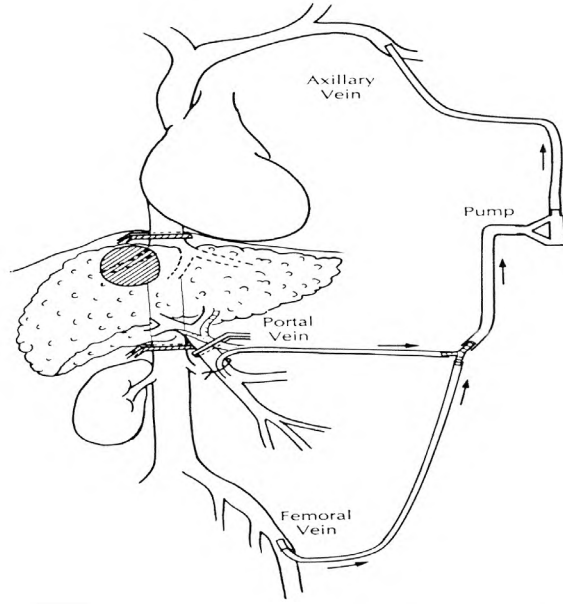
Şekil 1: Heaney ve arkadaşlarının tanımladıkları TVE yönteminin şematik çizimi

Hipotermik perfüzyon tekniğinin TVE yöntemine adaptasyonu Fortner ve arkadaşlarının çalışmaları sonucu 1974 yılında tariflenmiştir (2), (şekil 2).



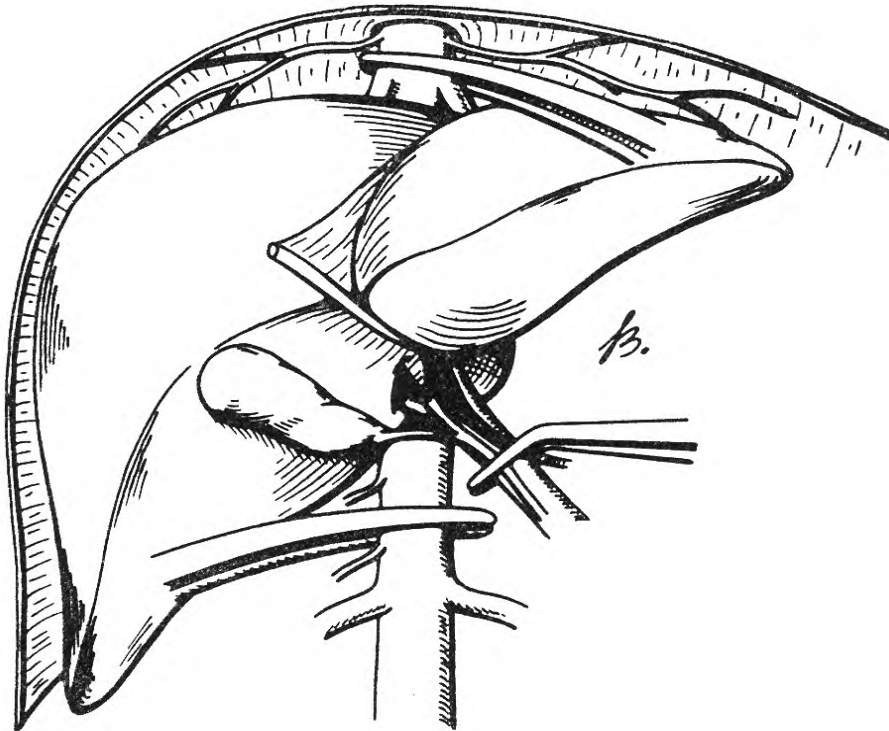
Şekil 2: Hipotermik perfüzyon tekniğinin TVE yöntemine adaptasyonu.

Normotermik ortamda TVE yönteminin uygulanması ise Huguet ve Bismuth' un yaptığı çalışmalar sonucu yaygınlaşmıştır (3, 4, 5, 6). Transplantasyon cerrahisinde yaşanan gelişmeler TVE tekniğini de etkilemiştir. Hannoun ve Delriviere TVE sırasında klemp süresini uzatmak amacı ile karaciğeri Wisconsin Üniversitesi Solüsyonu infüze ederek soğutmuşlar (7). Venöz by-pas tekniğinin TVE yöntemi sırasında kullanımı ise Yamaoka ve arkadaşları tarafından portal ve femoral venlerden aksiler vene uzanan eksternal devre ile sağlanmıştır (şekil 3) (8).



Şekil 3: Venöz -venöz by-pass tekniğinin TVE yöntemi sırasında kullanımı

Edwards ve Bentley ise femoral ven ile aksiler ven arasında veno-venöz by-pass uygulamışlar (9). Ancak veno-venöz by-pass yöntemi diğer araştırmacılar arasında yaygın kullanım alanı bulmamıştır. Benzer şekilde TVE sırasında uygulanan eş zamanlı aort klemplenmesi de Stephen ve arkadaşlarının çalışmalarına rağmen nadiren tercih edilmiştir (10, 11). Günümüzde TVE uygulaması sırası ile portal akımın kesilmesi, infrahepatik vena kavanın klemplenmesi ve takiben suprahepatik vena kavanın klemplenmesi yolu ile yapılmaktadır (şekil 4).



Şekil 4: En yaygın kullanım şekli ile TVE yöntemi.

Metodun ilk tanımından bu yana geçen süre içerisinde infra ve suprahepatik vena kavanın tam blokajı neredeyse tüm uygulamarda tekniğin vazgeçilmez bir parçası olmuştur. Ancak, TVE sırasında vena kavanın tam obstrüksiyonuna bağlı gelişen olumsuz etkileri azaltacak yöndeki girişimler Elias ve arkadaşlarının çabaları ile yeni bir ivme kazanmıştır (12). Bu çalışmalarında araştırmacılar hepatic venleri sonlandıkları bölgede (vena kava ile birleşim bölgesi) vasküler loop yardımı ile dönerek askıya almışlar, böylece vena kava akımını etkilemeden vasküler kontrolü sağlamışlardır (şekil 5).

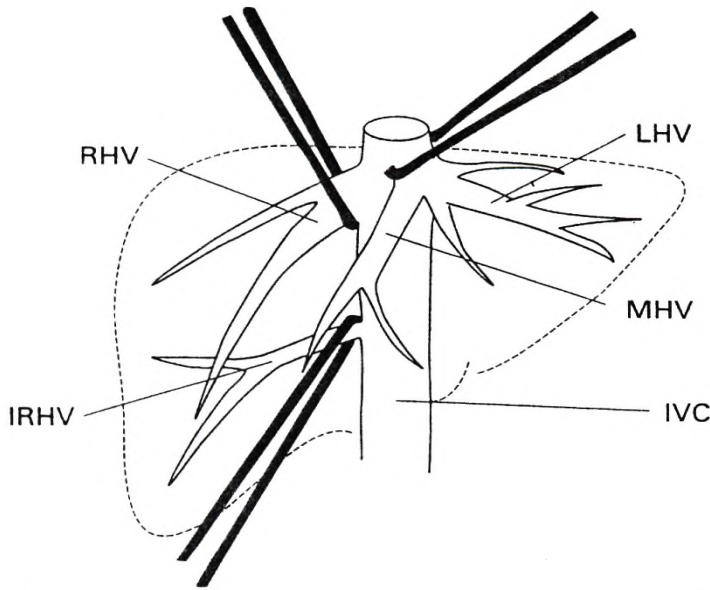
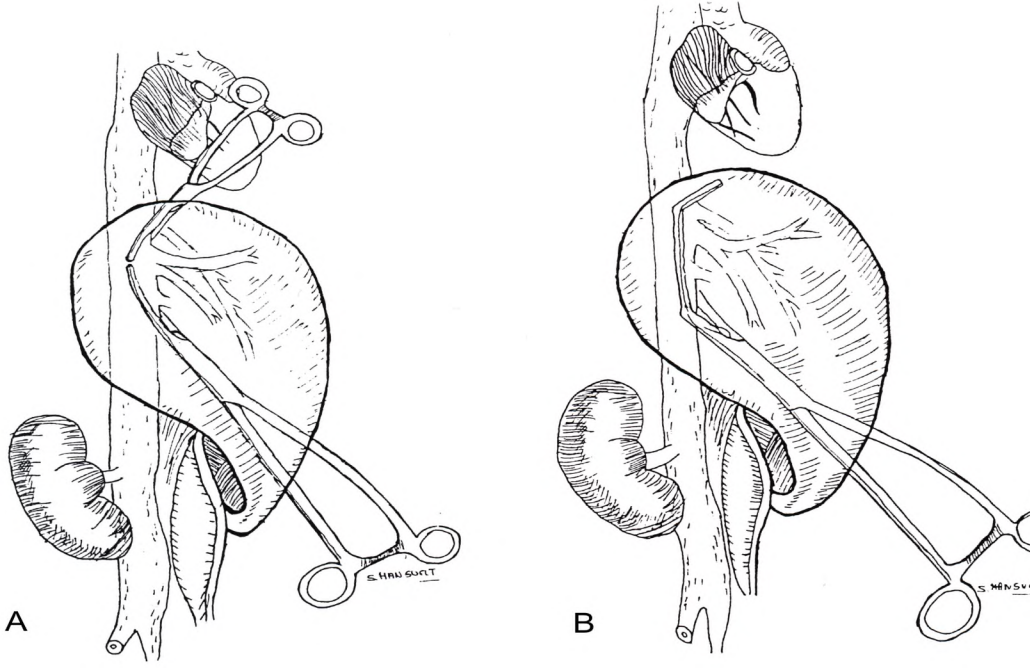


Fig. 1 Looping of the hepatic veins. The loops have been passed around the right hepatic vein (RHV), an inconstant inferior right hepatic vein (IRHV) and the common trunk of the middle hepatic vein (MHV) and left hepatic vein (LHV). IVC, inferior vena cava

Şekil 5: Elias ve arkadaşlarının tariflediği selektif TVE yöntemi.

Mansvelt ve arkadaşları ise iki vasküler klemp veya daha geniş tek vasküler klemp yardımı ile vena kavayı inkomplet şekilde tıkayarak; hem akımın devamına izin vermişler, hem de yeterli hepatic vasküler kontrolü sağlamışlardır (13) (şekil 6A ve 6B).



Şekil 6: Mansvelt ve arkadaşlarının tariflediği vena kavanın inkomplet şekilde kontrol edilerek TVE' nin uygulanması.

2.2. Total Vasküler Eksklüzyon Metodu

TVE metodu parankimal transeksiyon sırasında kanama kontrolü için pringle manevrasına bir alternatiftir. Bu teknikte karaciğer, inferior vena kava (karaciğer üstünden ve altından), portal ven ve hepatik arterler kontrol edilerek izole edilir (Şekil-4). Sırası ile portal triad, infrahepatik vena kava ve son olarak suprahepatik vena kava klemplenir, işlem sonunda da sıralamanın sonundan başlayarak klempler sırası ile açılır.

TVE'nin vena kava ya da hepatik venlere bası yapan geniş hepatik tümörlerin cerrahisinde önemli rolü vardır. Vasküler eksklüzyonu genişletebilmek için, splenik kanı sistemik dolaşıma katan veno-venöz by-pass kullanılabilir (8, 9, 14). Vasküler eksklüzyon sırasında oluşabilecek karaciğer hasarını azaltmak için soğuk organ koruma solüsyonları kullanılabilir (14). Geniş vasküler invazyonu olan ve major vena kaval yada hepatik venöz rekonstrüksiyon gereken durumlarda, bazı yazarlar karaciğerin veno-venöz by-pass sırasında çıkarılabileceğini, rezeksiyon ve rekonstrüksiyonun ekstrakorporal yapılabileceğini belirtmişlerdir (14).

Veno-venöz by-pass ve ex-vivo rezeksiyonun gerek duyulduğu klinik durumlar olabilmesine rağmen pratikte bu tekniğe çok nadir gerek duyulur. Major hepatik venlerin alt kısmında retrohepatik vena kavanın katıldığı tümör varlığında etkilenen segmenti kapsamayan (15), basit eksizyon yapılabilir. Ancak bu işlem komplet obstrüksiyon varlığında kollateral sirkülasyon sağlandıysa yapılabilir.

2.3. Total Vasküler Eksklüzyon Metodunun Klinik Etkileri

TVE ile ilgili bilgilerin büyük bir kısmını klinik çalışmalar oluşturmaktadır. Yöntem sadece deneyimli karaciğer cerrahları tarafından veya özel yapılandırılmış enstitülerde uygulanmaktadır. Daha önce bahsedildiği gibi, TVE yönteminin endikasyonunun sınırlı olması randomize çalışmaların yapılmasını zorlaştırmaktadır. Buna karşın operasyon sırasında ve postoperatif dönemde gerçekleşen gerek hemodinamik tablodaki gerekse de karaciğer fonksiyonlarındaki TVE yöntemine bağlı değişiklikler ile ilgili önemli bilgiler bu çalışmalar sonucunda elde edilmiştir.

Karaciğer rezeksiyonuna maruz kalan hastalar üzerinde Belghiti ve arkadaşlarının yaptığı karşılaştırmalı çalışmada pulmoner arter basıncında (portal triad sıkıştırılması sırasında %5 azalma, TVE sırasında %25 azalma) ve kardiyak indekste (portal triad sıkıştırılması sırasında %10 azalma, TVE sırasında %40 azalma) izlenen düşüşler yanı sıra, sistemik vasküler dirençte (portal triad sıkıştırılması sırasında %40 artış, TVE sırasında %80 artış) artış olduğu rapor edilmiştir (16). TVE yönteminin, hastaların hemodinamik tablosu ve hastanede yatış süresi üzerine olan olumsuz etkileri bu çalışmada vurgulanmıştır. Aynı çalışmada, gruplar arasında postoperatif karaciğer fonksiyonları açısından bir farklılık izlenmemiştir. Ancak bu çalışmadaki hastaların randomizasyonu ile ilgili tartışmalar sürekdedir (17). Ayrıca karaciğer rejenerasyon kapasitesi ile ilgili herhangi bir inceleme de bu çalışmada yapılmamıştır. TVE uygulanan hastalardaki karaciğer fonksiyon testlerindeki değişiklikler pek çok çalışmada incelenmiştir (7, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24). İşlem sırasında ve erken dönemde karaciğer fonksiyon testlerindeki bozulma ve takip sürecindeki iyileşme bu çalışmalar sonrasında rapor edilmesine karşın, TVE veya portal triad sıkıştırılması yoluyla yapılan karaciğer rezeksiyonları bu yönden karşılaştırılmamıştır. 1996 yılında yapılan prospektif çalışmada, total vasküler eksklüzyonun diğer yöntemlere bir üstünlüğünün olmadığı gösterilmiştir (16, 17).

2.4. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI

Dokunun kan yolu ile beslenmesinin kesilmesi iskekiye yol açarken, bu durumun düzeltilmemesi infarkt ile sonuçlanır. Ancak karşıt olarak, kan desteğinin restorasyonu iskemik hasarı ağırlaştırarak dokuda daha ileri hasarın oluşmasına neden olabilir. Bu mekanizma iskeki-reperfüzyon (I-R) hasarı olarak adlandırılır (17). Klinik uygulamalar içinde karaciğerde I-R hasarına genellikle hemorajik şok (25), sepsisin geç dönemi (26), büyük travmaya yönelik cerrahi girişim (27) veya büyük tümöral kitlelerin rezeksiyonu (28) ve karaciğer transplantasyonu (29) sırasında rastlanmaktadır.

Reperfüzyonun başlamasını takiben oluşabilecek karaciğere yönelik hasar iki fazda incelenebilir. Reperfüzyonun erken safhalarında, endotelial hücre şişmesi (30), vazokonstriksiyon (31), lökosit tuzaklanması (32) ve muhtemel intravasküler hemokonsantrasyon (33) sonucunda mikrosirkülasyonda bir yetersizlik gelişir. İkinci faz ise inflamatuvar sitokinler (34) ve serbest oksijen radikallerinin (35) üretilmesi ile ilgilidir. Hipoksi veya iskemi periyodunun uzamasından sonra intrasellüler reaktif oksijen oluşumu belirlenebilir. İntrasellüler reaktif oksijen oluşumu hepatosit için ciddi bir iskemik hasarın göstergesidir (36).

İn-vivo başlangıç reperfüzyon fazında hepatik damarlardaki oksidan strese karşı reaktif oksijenin kaynağı olarak kupfer hücreleri belirir (37). Kupffer hücreleri reperfüzyon sırasında salınan sitokinlerin de (TNF- α ve IL-1) asıl kaynağıdır (38). Bulgular nötrofilleri aktive etmekte dominant etkenin bu primer sitokinlerde olduğunu göstermiştir. Tekrar akımın başlamasından saatler sonra nötrofillerin oluşması en güçlü hipotezdir. Öncelikle kupffer hücreleri aktive olurken nötrofiller daha sonra aktive olur. İndüklenen nötrofillerin transmigasyonu ve parankimal hücrelere yapışması adezyon moleküllerinin artması ile sağlanır.

P selektin (39) ve ICAM-1 (40) postsinüsoidal venüllerde nötrofil-nötrofil adezyonunu sağlarken endotoksemi ve iskemi-reperfüzyon sırasında nötrofillerin sinusoidlerde akümüle olmalarını kanıtlamak için daha güçlü veriler gerekmektedir (41). İzole perfüze edilen sıçan karaciğer sisteminde sinusoidlere sıkışan çok sayıda nötrofilin sinusoidal perfüzyonu etkilenmemektedir (42). Sinusoidal nötrofil sekastrasyonu direkt olarak perfüzyon yetersizliğine neden olmaz. Vazokonstrüktör ve vazodilatörlerin oluşması ve hastalık bağımlı vasküler yanıtsızlığın artması lokal imbalans ve sonuçta iskemik hasara neden olur (43).

Nitrik oksid ve Endotelin-1 sinusoid konstrüksiyonu yaparak ve ito hücrelerinin kontraksiyonu ile perfüzyon yetmezliğine neden olur (44).

2.4.1. Karaciğer İskemisi

Kompleks karaciğer yaralanması (3.-5. derece), tümörler, kist ve granülomların cerrahisi esnasında parankimal kanamayı azaltma ve cerrahi tekniği uygulama kolaylığı açısından sıklıkla portal triadın klemp vasıtası ile sıkıştırılması (pringle manevrası) tercih edilmektedir. Pringle manevrası boyunca sıcak iskemi süresinin uzaması karaciğer perfüzyonunu bozarak hepatik nekroz ile sonuçlanacak olaylar zincirinin başlamasına sebep olmaktadır. Pringle manevrası organizmada hemodinamik değişikliklere sebep olmaktadır. Bu manevra sonrası splenik kanın porto-sistemik dolaşıma dönebilme olanağı da vardır. Bu

nedenle insanlarda portal triadın klempenmesinden sonra denek hayvanlarında sıkça görülen kardiyovasküler kollaps görülmez (45).

Karaciğerdeki iskemi ve iskemi-reperfüzyon hasarını azaltmak için değişik metodlar da denenmiştir. Bunlar operasyon sırasında aralıklı portal triad klempajı yapılarak perfüzyonun sağlanması (46) ve operasyon sırasında karaciğere topikal hipotermi uygulanması (47) olarak sayılabilir.

Karaciğer tarafından tolere edilebilen normotermik iskeminin üst süresi tam olarak bilinmemektedir. Fakat önceden kabul edilen 15-20 dakikalık süre artık geçerli değildir. Huguet ve arkadaşları (48), portal klempaj sırasında uygulanan normotermik iskemi sürelerini karşılaştıran bir çalışmada 30-60 dakika ile 60-85 dakika arasında komplikasyonlar açısından fark olmadığını bildirmişlerdir. Günümüzde normotermik, elektif şartlarda yapılan hepatik cerrahide portal triad klempajında sıcak iskemi zamanının 90 dakikaya kadar uzatılabileceği kabul edilmektedir (49). İskeminin 90. dakikasından sonra ise karaciğerdeki değişikliklerin geri dönüşsüz olduğu da çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (50).

30 veya 45 dakika karaciğer sıcak iskemisini takiben perfüzyon oluşturulan rat modelinde kupffer hücreleri perfüzyonun ilk dakikalarından sonra saatlerce reaktif oksijen radikallerinin en çok salındığı hücrelerdir (51, 52). Reperfüzyondan sonraki 6-24. saatlerde nötrofillerin reaktif oksijen radikal salınımına katılımı önemsenmeyebilir. Bu vakalarda hasarlı hepatositlerden reaktif oksijen radikal salınımı çok daha sonra beklenmektedir. Takip eden genişletilmiş karaciğer rezeksiyonundan sonra endotoksemi gelişebilir ve bu da nekrozu artırır (53).

2.4.2 Karaciğer İskemisinin Patofizyolojisi

Karaciğerdeki iskemi-reperfüzyon hasarına yol açan faktörler oksijen radikalleri, lökosit migrasyonu ve aktivasyonu, endotelial hücre hasarı, mikrosirkülasyondaki düzensizlikler ve koagülasyon sisteminin aktivasyonu olarak özetlenebilir. İskemi-reperfüzyon sonucunda kupffer hücreleri aktive olur ve bu hücrelerden proteazlar, TNF- α ve lökotrienler gibi toksik medyatörler ortaya çıkar. Ayrıca aktive olmuş kupffer hücrelerinin prostoglandin ve tromboksanları da salgıladığı bilinmektedir, reperfüzyon sırasında kupffer hücrelerinden salınan serbest radikaller de ağır parankimal hücre hasarına sebep olmaktadır (54). Bununla birlikte, lipid peroksidasyonu hücre membranında ortaya çıkan fonksiyon bozukluklarının hepatosit ölümünden sorumlu olup olmadığı tartışmalıdır (55).

Ayrıca hepatositlerin serbest radikal oluşumunu sınırlayabilme, radikal oluşumları nötralize edebilme ve zarar görmüş hücresel elemanlarını tamir edebilme gibi koruyucu mekanizmalara sahip olduğu varsayılmaktadır (56). İnsan hepatositlerinde reperfüzyon

sonrası lipid peroksidasyonu ve buna bağılı olarak şiddetli hasarın oluşması için tahminen 2,5 saatten uzun bir anoksi periyoduna gereksinim duyulduğu tahmin edilmektedir (57).

2.4.3 Serbest Radikaller ve Türleri

Serbest radikaller çok yüksek reaktivite gösterirler, stabil değildirler ve yarı ömürleri çok kısadır (58). Molekülün yapısına göre serbest radikaller; oksijen merkezli (O_2^- ; süperoksit radikali), karbon merkezli (CCl_3^- , triklorometil radikali) olarak isimlendirilirler. SOR terimi sadece oksijen merkezli serbest radikalleri değil aynı zamanda hidrojen peroksit gibi elektron kısıtlaması ortadan kalkmış, yeterince enerji yüklenmiş, oksijenin radikal olmayan fakat organizma için potansiyel tehlike oluşturan ve oksijen radikali üretiminde işlev gören türevlerini de içermektedir. Oksijen merkezli süperoksit radikali insan vücudunda en sık rastlanandır. SOR hücrel metabolizmanın normal ürünleri olarak sürekli oluşmaktadır.

SOR'nin başlıca endojen kaynakları şunlardır; nötrofiller, mitokondrial elektron transport sistem, mikrozomal elektron transport sistemi, oksidan enzimler (ksantin oksidaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz), vasküler endotel (spontan olarak NO üretmektedir), endojen substratların otooksidasyonu, diğer kaynaklar (ürat oksidaz, yağ asidi koenzim A gibi hidrojen peroksit ortaya çıkaran enzimler) ve tamsizyon metalleri (demir ve bakır).

Karaciğer iskemi – reperfüzyon hasarında rol oynadığı düşünülen başlıca serbest oksijen radikalleri şunlardır:

Süperoksit (O_2^-): Lipid peroksidasyonu başlatabilen bir SOR türüdür.

Hidrojen peroksit (H_2O_2): Süperoksit sulu ortamlarda dismutasyona uğrayarak SOD enzimi varlığında H_2O_2 oluşturur. H_2O_2 zayıf bir oksidandır.

Hidroksil Radikali (OH^-): SOR içinde en aktif ve en toksik olanıdır. Oksidan hasardan sorumludur.

Singlet Oksijen (O_2): Oksijen molekülünün çok reaktif bir formudur.

Azot oksitleri: Nitrik oksit (NO^-) ve nitrojen dioksit (NO_2^-) tek sayıda elektron taşıdıkları için serbest radikallerdir, nitroz oksit (N_2O) ise radikal değildir.

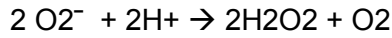
Hipokloröz Asit ($HOCl$): Organizmada aktive olan nötrofiller tarafından oluşturulan hipokloröz asit güçlü bir oksidandır.

2.4.3.1 Hücrel Antioksidan Sistem:

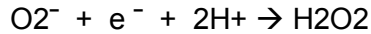
2.4.3.1.1. Enzimatik Antioksidan Sistem:

Süperoksit dismutaz (SOD): Ökaryot hücrelerde O_2^- hidrojen peroksite iki metal içeren SOD izoenzimleri tarafından metabolize edilir. Mitokondride bulunan Mn-SOD

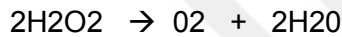
80kDa'luk tetramerik bir yapıdır. Sitozolde bulunan Cu/Zn-SOD 32 kDa'luk dimerik bir yapıdır. SOD ile katalizlenen reaksiyonda, iki molekül süperoksit, hidrojen peroksit ve moleküler oksijen oluşturulur. SOD ile katalizlenen reaksiyon son derece hızlıdır.



Süperoksit redüktaz (SOR): Süperoksiti doğrudan indirgenmesini katalizleyen enzim demir içerir ve anaerobik sülfat-indirgeyici bakterilerde bulunur.



Katalaz: Çoğu organizmadaki katalazlar hem içeren proteinlerdir. Memeli hücrelerinde en fazla peroksizomlarda bulunurlar ve hidrojen peroksitin suya ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalizler.



Peroksiredoksin (Prx): Hidrojen peroksit ve farklı alkil hidroperoksitler gibi peroksitleri doğrudan indirgeyen enzimlerdir.

Glutasyon peroksidaz (Gpx): Glutasyon peroksidazların tümü, glutasyonu substrat olarak kullanarak H_2O_2 'nin indirgenmesini katalizler. Ayrıca diğer peroksitleri alkollere indirgerler. İki molekül GSH, GSSG'e oksitlenir ve ardından GSSG, glutasyon redüktaz tarafından (GR) indirgenir.



GSH- türevli sistemler: Glutasyon (GSH) hücreler arasında en çok bulunan tiyol kaynaklı antioksidandır. Glutasyon serbest radikallerle direkt reaksiyonla, GSH peroksidazlara ve GST'lere substrat olması ile bir antioksidan olarak davranır (59). Okside glutasyonlar (GSSG), NADPH bağımlı flavoenzim glutasyon redüktaz (GR) ile indirgenirler.

Glutasyon S-Transferazlar (GST): Redükte glutasyonun (GSH) toksik ve karsinojenik bileşiklerin ve ksenobiyotiklerden biyotransformasyonla oluşan elektrofilik yapıların konjugasyonunu katalizleyen bir grup multigen enzim ailesidir (59). GST, E.coli'den memelilere kadar birçok organizmada bulunmakta olup insan, fare, sığır, sıçan gibi hayvanların karaciğer, akciğer, plasenta, eritrosit ve barsak mukozasından izole edilmiş ve özellikleri çalışılmıştır (60). GST izozimleri, insanda çeşitli organlarda farklılaşarak eksprese

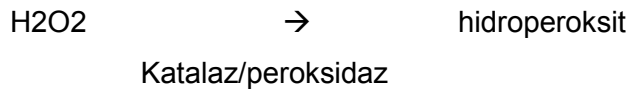
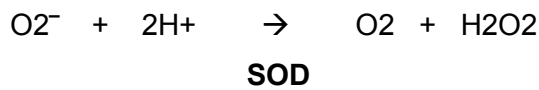
edilmektedir. Bir organın birden fazla GST izozimini eksprese etmesi mümkündür. İnsan karaciğeri GST alfa ve mu formunu eksprese ederken, GST mu formu adrenal bezde, böbrekte, testis ve karaciğerde de eksprese edilmektedir. GST kimyasal stres ve karsinogenezis ile sonuçlandığı bilinen çeşitli bileşiklerin yapıları tarafından indüklenebilir. GST'yi indükleyen bileşiklerin bazılarının enzimin kendi substratı olduğu bilinmektedir.

2.4.3.1.2. Nonenzimatik Antioksidan Sistemleri:

Vitamin C, vitamin E, selenyum bileşikleri, lipoik asit ve ubikuinon içeren düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin antioksidan olarak biyolojik önemi vardır.

2.4.3.2. Oksidatif Streste Antioksidan Sistemin Önemi

Aşırı dozda oksidana maruz kalma veya antioksidan kapasitedeki azalma gibi nedenlerle oluşan oksidatif stres, kaynağından bağımsız olarak hücre fonksiyonlarını etkilemekte (61, 62) ve lipid peroksidasyonuna, dolayısıyla ciddi sitopatolojik sonuçlara yol açmaktadır (63). Major antioksidan glutatyon (GSH) oksidasyon-redüksiyon tepkimelerinde indirgeyici güç olarak rol alır. Total GSH seviyesini muhafaza etmek için glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon transferaz (GST) gibi antioksidan enzimler birlikte hareket etmelidirler (64). GR okside glutatyonun redükte glutatyona dönüşümünü sağlayan NADPH bağımlı reaksiyonu katalizleyen bir flavoproteindir. GP GSH' u donör substrat olarak kullanarak H₂O₂' yi suya kadar indirgemektedir. SOD, O₂⁻ radikalini yakalayarak H₂O₂ ve suya dismutasyonunu katalizleyen bir metaloproteindir. Katalaz ve peroksidaz bir takım gibi çalışarak:



dönüşümünü gerçekleştirir. Bu enzimlerin eksikliğine veya inhibisyonuna yol açan olay yada bileşikler, hücrelerde redoks dengesini bozarak oksidan düzeyinin artmasına neden olur ve çoğu kez tersinmez hücre hasar ve ölümüne yol açarlar (65-67).

2.4.3.3. Nitrik Oksit

Nitrik oksit yan esansiyel aminoasit olan L-Arginin'den NOS enzimi aracılığı ile sentezlenir. L-arginin'in guanido grubunun terminal nitrojenine moleküler oksijen girerken nitrik oksit ve yan ürün olarak sitrulin oluşur (68).

NOS enzim ailesinin molekül ağırlıkları 120-160kDa arası değişen üç izoformu tespit edilmiştir (69). İzofom 1; başlıca nöron ve epitel hücrelerinde, izofom 2; başlıca makrofajlarda, izofom 3; başlıca endotel hücrelerinde bulunur. İzofom 1, 2, 3 sırasıyla nöral tip (nNOS) , akrofaj tipi (mNOS), endotel tipi (eNOS) olarak isimlendirilir ve yine sırasıyla 7, 12 ve 17. kromozomlarda genleri lokalize olmuştur (70). NOS' un üç izoformu yapısal veya indüklenebilir olarak ifade edilir. İzofom 1 ve 3 yapısal olarak bulunurken, izofom 2 indüklenebilir tiptedir. Yapısal NOS (cNOS) kalsiyum kalmodulin bağımlıdır ve çeşitli uyarılarla geçici olarak artan intrasellüler kalsiyuma yanıt olarak az miktarlarda (pikomol) NO salınımına yol açar (71). Vasküler endotel düz kas trombositler, sinir dokusu, akciğerdeki epitel hücreleri, adrenal medulla mezengial hücreler, renal makula densa, pankreasın beta hücreleri ve non-adrenerjik non-kolinerjik nöronlardan cNOS aracılığıyla pulsatil NO salınımı söz konusudur (72).

İndüklenebilir NOS (iNOS) enzimi ise esas olarak aktive olmuş makrofajlarda bulunurken, ayrıca nötrofillerde, vasküler endotelde, vasküler düz kas hücrelerinde ve astrositlerde bulunur (71). Hücrelerin TNF- α , IL-1 β ve interferon gama gibi inflamatuvar sitokinlere ve endotoksine maruz kalmalarıyla iNOS uyarılır. Birkaç saat içinde gen ekspresyonu gerçekleşen iNOS 4-24 saat aktif kalır ve kalsiyum kalmodulinden bağımsız olarak, cNOS'dan 100 kat fazla miktarda (nanomol) NO salınımına yol açar (68-71). cNOS enzimi glukokortikoidlerle inhibe edilemezken, iNOS enzimi glukokortikoidlerle inhibe edilerek masif miktarlarda NO salınımı önlenir. iNOS ayrıca transforming growth faktör beta, IL-4 ve IL-10 tarafından da inhibe edilir (68-71).

Süperoksit radikali ile reaksiyona girerek temizleyici rol oynayan NO; ortamda fazla miktarlarda olduğunda, süperoksitle etkileşip çok toksik olan peroksinitrit radikali oluşumunu sağlar (73). Oksidan stresin arttığı patolojik durumlarda gelişen doku hasarında en önemli rolü peroksinitrit oynar.

2.4.3.4 Karaciğerde Nitrik Oksit Oluşumu

Hepatik I-R hasarında önemli rol oynadığı düşünülen iki NOS formundan bahsedilmektedir. Endotelyal NOS (eNOS), sinüsoidler ve diğer epiteliyal hücrelerde yapısal olarak bulunmaktadır ve aktivitesi intrasellüler kalsiyum seviyeleri ile yakından alakalıdır (74). İndüklenebilir NO (iNOS), hepatositler tarafından olabileceği gibi sıklıkla inflamatuvar mediyatörlere bir cevap olarak kupffer hücreleri, nötrofiller gibi inflamatuvar hücrelerce de

salınabilirler. Bu aktive nükleer faktörler (NF)- κ B, iNOS geninin ekspresyonunda pivot rolü oynayan, yüksek ökaryotik transkripsiyon faktörüdür (75). iNOS aktivite açısından intrasellüler kalsiyum seviyelerinden bağımsızdır. Ve NO üretimi anlamında eNOS formuna göre birkaç kat daha önemlidir (76, 77). Bu nedenle indüklenebilir form eNOS'a göre patofizyolojik yönden daha önemli görünmektedir.

Karaciğer içerisinde, sinüsoidal epiteliyal hücrelerce salınan bazal bir NO seviyesi vardır ve bu eNOS aktivitesi kaynaklı NO akıma olan cevapla artış gösterir (74). Hepatositler ve kupffer hücreleri, IL-1'e cevap olarak hayli yüksek konsantrasyonlarda NO sentezi yaparlar (76). Kupffer hücrelerince IL-1'e karşı sentezlenen TNF- α hepatositlerden NO üretimini destekler (76). Her iki hücrede NO üretimi, (NF)- κ B aktivasyonu ile gelişen iNOS sunumunun sonucudur (77). NO, (NF)- κ B inhibisyonu ile iNOS gen transkripsiyonunu down regüle edebilir. Hepatositlerden NO üretimini azaltan prostoglandin E2, NO'nun makrofajlardan sentezini de etkilemektedir (78). IL ve TNF- α 'nın hepatik I-R sırasında arttığı bilinmektedir ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda da IL-1 antagonistleri ve anti-TNF- α antikorları verilmesi halinde I-R hasarının hafifletildiği görülmüştür (35,79).

2.4.4. İskemi-Reperfüzyon Hasarında Serbest Oksijen radikallerinin rolü

Normal şartlarda atom orbitalleri üzerinde biri saat yönünde, diğeri de ters yönde hareket eden iki elektron taşırlar. Eğer orbital bir elektron taşıyorsa buna eşlenmemiş elektron denilmektedir. Serbest radikaller bir yada daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan atom yada moleküllerdir (80).

Güçlü bir oksidan ajan olan moleküler oksijen, spinleri aynı yönde olan eşlenmemiş iki elektron taşıdığından kararsız yapıda olup, dışardan elektron alarak kararlı yapıya dönme çabasıdadır. Aerob canlılarda oksijenin %90'dan fazlası mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi aracılığı ile dört elektron alarak suya redüklenmektedir. Moleküler oksijenin (O_2) tamamen suya redüklenmesi dört basamakta gerçekleşir. Geriye kalan oksijen ise kısmi indirgenmeyle süperoksid radikali (O_2^-), hidrojen peroksid (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH) gibi serbest oksijen radikallerine dönüşmektedir. Serbest oksijen radikalleri, süperoksid dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzimleri ile etkileşerek su ve oksijene çevrilir (81).

Aerob canlılar hayatlarının devamı için oksijene ihtiyaç duyarlar. Normal havaya göre daha yüksek konsantrasyondaki oksijen, bu canlılarda hasara neden olur (82). İskemi-Reperfüzyonda oluşan bu hasar oksiradikallerin etkisiyle olmaktadır. Oksiradikaller; nükleik asitler, proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve bazı bağ dokusu makromoleküllerinin

biyokimyasal yapılarında geri dönüşlü yada dönüşsüz hasara yol açarlar. Serbest oksijen radikallerinin aşırı derecede artışına yol açan önemli faktörlerden birisi doku iskemisidir. İskeminin başında anaerobik metabolizma ile bu artış geçici bir süre için önlenirse bile, iskemi süresi uzadığında hücresel enerji kaynaklarının tükenmesiyle hücre ölümü olmaktadır. Bu durumu ortadan kaldırmak için tekrar kan akımının sağlanması ile hücrelerin yenilenmesi ve toksik metabolitlerin temizlenmesi beklenirken, karışık olarak reperfüzyon hasarı oluşmaktadır. Reperfüzyonla oluşan hasar, iskemi süresinde oluşandan daha fazla olmaktadır. Zimmermann; üç saat iskemi ve bir saat reperfüzyon oluşturulduğunda, dört saatlik iskemiyeye göre daha fazla hasar oluştuğunu bildirmektedir (83).

İskemiye takiben ortaya çıkan SOR mikrovasküler yapıda permeabilite bozukluğuna yol açmaktadır. Mikrovasküler yapıdaki permeabilite bozukluğu iskemi-reperfüzyon hasarının derecesini göstermede duyarlı bir parametre olarak kabul edilmektedir. Hipoksik reperfüzyonun postiskemik mikrovasküler hasarı azalttığı da bilinmektedir (81). SOR hem kemotaksisi arttırmakta, hem de doğrudan membran fosfolipidlerine toksik etki göstermektedir. Endotelial hücre membranındaki hasar, lipid peroksidasyonu ve membranöz hiyalüronik asidin azalması ile açıklanmaktadır. Kemotaksisin artması sonucunda ise endotel-lökosit etkileşmesi ile doku hasarı artmaktadır (84).

İskemi-reperfüzyon hasarında polimorf nüveli lökositlerin aktivasyonu önemlidir. Ksantin oksidazın oluşturduğu oksidanlar, inflamatuvar ajanların üretimini ve salınımını başlatır. Bunlar polimorf nüveli lökositlerin migrasyonu ve kümelenmesine neden olur. Kümelenen lökositler proteazların salınımına, endotelial bariyerin bozulmasına yada her ikisinin etkisi sonucunda mikrovasküler hasara yol açar. Sonuçta lokal mikrovasküler tıkaçlar oluşur ve birtakım toksik maddelerin salındığı yeni iskemik alanlar ortaya çıkar. Aktive olmuş nötrofiller endotel hücreleri ile etkileşerek yeniden SOR oluşmasına neden olmaktadır (84, 85). Komplemanlar, sitokinler, arazişonik asit metabolitleri ve nötrofiller gibi sistemik inflamatuvar mediyatörler akciğer, karaciğer ve barsaklarda hasar oluşumuna sebep olmaktadır (84, 86). Adult respiratuvar distres sendromu, karaciğer yetmezliği ve çoklu organ yetmezliği gibi sistemik komplikasyonlar da ortaya çıkmaktadır. Karaciğer reperfüzyonunda görülen oksidatif hasar kupffer hücreleri aracılığıyla ekstrasellüler olarak oluşturulmaktadır (56, 87). Karaciğerde SOD aktivitesinin, ksantin oksidaz aktivitesinden daha fazla olmasından dolayı; akciğer ve ince barsağa göre hipoksiye daha az duyarlı olduğu ve reperfüzyondan daha az etkilendiği bilinmektedir (81).

2.4.5 Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarının kontrollü ortamda deneysel modellerde oluşturulması

Karaciğerde iskemi reperfüzyonda en sık üç model kullanılmaktadır. Birincisi invivo iskemi reperfüzyon modelidir. Bu modelde; doku hasarı hasarlı endotelyum ve adheran hücreler, reaktif oksijen ürünleri ve inflamatuvar mediatörler arasındaki etkileşim sonucu oluşmaktadır (88). İkinci model izole karaciğer perfüzyon sisteminde no-flow / reflow modelidir. Karaciğer oksijen yokluğuna ve ardından reoksijenizasyona ancak kan-endotelyum etkileşimini önleyen buffer sayesinde dayanabilmektedir. Bu modelde; doku hasarı endotel hücrelerde mekanik hasara yol açan akım azlığına bağlıdır (89). Üçüncü model; izole karaciğer perfüzyon sisteminde devamlı akım ve N₂ induksiyonlu hipoksi oluşturularak oksijenizasyon tekrar sağlandığındaki akımın kesilmesi ve mekanik stres engellenmiştir. Birinci modelde; invivo ortamda anestezi altındaki ratların karaciğer sol lob medial ve laterale ait portal ven ve hepatik arter dalları 60 dakika süreyle klemplenir. Ve bu süre sonunda klempler açılarak reperfüzyon sağlandıktan sonraki 0., 2. ve 30. dakikalarda karaciğerden parça alınır. Bilindiği gibi; 60 dakikalık karaciğer iskemisinden sonraki 24 saatlik reperfüzyon fokal nekroza yol açmaktadır (90).

İkinci ve üçüncü modellerde kullanılan izole karaciğer perfüzyon sisteminde; sodyum fenobarbital ile uyutulan ratlarda karaciğer cerrahi ile çıkartılır ve portal ven kanule edilerek buradan karaciğer dokusuna yeterli oksijeni sağlayabilen Tris-Buffer fizyolojik tuz solüsyonu (TBS) verilir (91). İkinci modelde; izole karaciğerin oksijenizasyonu 30 dakika boyunca TBS ile sağlandıktan sonra akım 20 dakika süreyle kesilir. Bu no-flow hipoksi periodu sonunda karaciğer reperfüzyonu 0, 2 veya 60 dakika oksijenize TBS ile sağlanır. Üçüncü modelde ise; 30 dakikalık ilk oksijenizasyon periodunun ardından, karaciğer hipoksik TBS (%100 N₂ ile sature) ile 20 dakika süreyle perfüze edilir. Bu hipoksik periodun sonunda karaciğer oksijenize TBS ile 0, 2 veya 60 dakika süreyle perfüze edilir.

2.4.6. Karaciğer Hasarının Biyokimyasal Parametreler ile Ölçümü

Karaciğer hasarı hakkında alanin-amino-transferaz (ALT), aspartat-amino-transferaz (AST), laktat dehidrogenaz (LDH) gibi enzimler bir parametre olarak kullanılabilir. Bu enzimler parankim hasarının olduğu dönemden itibaren yükselmeye başlar. Ezaki ve arkadaşlarının (92) yaptıkları çalışmada; artan enzim değerleri, operasyondan sonra ortalama 10 gün içinde normal düzeye dönmüştür. İnsanlarda ve deney hayvanlarında bu artış farklı olabilir. Karşılaştırmalı deneysel bir çalışmada; LDH artışı rat hepatositlerinde 8 kat olurken, insan hepatositlerinde 3 kat olmuştur. Hepatositler, serbest radikalleri sınırlayabilen, radikal oluşumlarını nötralize edebilen ve zarar görmüş hücresel komponentleri tamir edebilen koruyucu mekanizmalara sahiptir (93). Başka bir çalışmada iskemik karaciğerde ortaya çıkan bu enzimlerdeki yükselmenin antioksidan madde verilmesiyle normale daha yakın değerlere düştüğü gözlenmiştir (94).

Lipid peroksidasyonunun değişik safhaları ilk kez 1820'lerin sonunda Saussure tarafından tanımlanmasına karşılık poliansature yağ asitlerinin moleküler oksijen ile otooksidasyonu veya peroksidasyonu ilk defa 1940'larda tarif edilmiştir. Bununla birlikte lipid peroksidasyonunun biyoloji ve tıp ile ilişkisi ancak 1950'lerden sonra anlaşılmaya başlamıştır (94).

İnsanlarda birçok hastalığın etyopatogenezinde, lipid peroksidasyonuna bağlı olarak organ ve dokularda açığa çıkan hücre membranı hasarı suçlanmaktadır. Lipid peroksidasyonuna neden olan serbest oksijen radikalleri, eksojen yada endojen kaynaklı olabilir. Antibiyotikler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar, sigara dumanı, iskemi, hiperoksijenizasyona maruz kalma, inflamasyon, antineoplastik ajanlar, hava kirliliği ve radyasyon serbest oksijen radikallerinin eksojen kaynaklarıdır. Bu radikallerin endojen kaynakları ise mitokondriyal elektron transport zinciri, peroksizomlar, mikrozomal sistem, çeşitli sitozolik enzimler, plazma membranları, fagositoz olayı ve bazı küçük moleküllerdir (95).

Lipid peroksidasyonu ile oluşan ürünlerin tiobarbitürik asit ile reaksiyona girmeleri sonucu malondialdehit (MDA) oluşur. MDA; lipid peroksidasyonunun son ürünüdür; mutajenik, genotoksik ve karsinojeniktir (96). Eikosanoid sentezi ve yağ asidi oksidasyonu sonucu oluşan siklik endoperoksitler MDA'nın asıl kaynağını oluşturmakla birlikte hemoglobin ve miyoglobin aracılığı ile de oluşum gerçekleşebilir. Hemoglobin ve miyoglobinin H₂O₂ ile etkileşmesi halinde hemoprotein aracılığı ile radikaller oluşur. Oluşan bu radikaller lipid peroksidasyonuna yol açar. Hb-H₂O₂ kompleksi oluştuğunda ortamda araşidonik asitte varsa MDA oluşumu gerçekleşir (97).

MDA proteinlerin amino gruplarına, fosfolipidlere veya nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini göstermektedir. MDA doku, kan ve vücut sıvılarında ölçülerek lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (98).

2.4.7. İskemi-Reperfüzyon Hasarında Apoptozis

İlk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından tanımlanan farklı morfolojideki hücre ölümüdür (79, 99). Apoptozis, plazma membran bütünlüğünün kaybı ile karakterize diğer hücre ölüm şekli olan nekroz ile karşılaştırıldığında, ciddi bir yaralanma sonucu meydana gelmemekte hatta ölümü beklenen veya normal olan hücrelerde de görülmektedir. Nekrozdan daha fizyolojik bir hücre ölümü olduğu için eski yunancada ağaçtan düşen yapraklar anlamına gelen apoptozis (apo-uzak; ptozis- düşmek) adı verilmiştir (100).

Apoptozis spesifik gen ürünlerinin sentezlendiği, nükleer fregmentasyon ve sitoplazmik yoğunlaşma, şişme ile sonuçlanan bir dizi biyokimyasal ve morfolojik olayların programlı şekilde gerçekleştiği hücre ölümüdür (99-102). Apoptozis tipik olarak inflamatuvar

reaksiyon yokluğunda genelde fagositler (103) tarafından yok edilen tek hücrelerde gelişir. Apoptozisteki en karakteristik olaylardan birisi de Southern blotting tekniği ile tespit edilebilen nükleer DNA' nın internükleozomal fregmentasyonudur (104). Apoptozisin bu karakteristik ve morfolojik özellikleri onu şimdiye kadarki iyi bilinen hücre ölümünün ikinci formu olan nekrozdan ayırmaktadır (105, 106). Apoptozisin aksine nekroz; nükleer ve sitoplazmik lizis ile karakterize, enerjiden bağımsız ve pasif bir olaydır. Nekroz genelde büyük hücrelerde görülür ve lokal inflamatuvar cevabı indükler. Apoptozis ve nekrozis onları indükleyen faktörler ile farklılık gösterirler. Daima nonfizyolojik hasara bağlı oluşan nekrozun aksine apoptozis doku homeostazisinin devamında esas rol oynayan ve hücre proliferasyonun regülasyonuna katkıda bulunan öncelikle fizyolojik bir olaydır (79, 101). Fakat yine de; apoptozis nekroz gibi çeşitli hücre hasar tipleri tarafından indüklenebilir ve dejeneratif hastalıklar, viral hastalıklar, ilaca bağlı toksik hasar, immün bağımlı reaksiyon gibi çok değişik hastalıkların patogenezesinde önemli rol oynamaktadır (107).

Uzun zamandır bilindiği gibi anoksi ve hipoksi, onkosis olarak da bilinen, tipik hücre nekrozunu asıl olarak indüklerler (106). Yine de son çalışmalarda, erken morfolojik gözlemlere göre anoksinin apoptozis için güçlü bir stimulator olduğu düşünülmektedir. Böbrek (108, 109), kalp (110, 111) ve beyin (112-116) gibi organlarda kısa süreli iskemi daha sonra doku infarktına neden olabilecek nekroz ile ilişkili parankimal hücre apoptozisini indükleyebilir. Buna karşılık apoptozisin karaciğerin iskemisine etkisi az bilinmektedir (117-120).

Anoksi ve reperfüzyonun her ikisi de apoptozisi birbirinden bağımsız mekanizmalarla uyarsalar da, Borghi-Scoazec ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada anoksinin apoptozis oluşumunda ana faktör olduğu saptanmıştır (121). Rat karaciğerinde yapılan deneysel çalışmalar hepatositlerdeki apoptotik sürecin ortalama 4 saat sürdüğünü göstermiştir (122).

Apoptozis daima hepatositlerde tespit edilse de istisna olarak biliyer epitel hücrelerinde de gözlenmektedir. Bu; iki epitelyal hücre tipinin iskemiye farklı yatkınlıkta olduğunu gösterir. Deneysel çalışmalarda biliyer epitelin anoksiye hepatositlerden daha dirençli olduğu gösterilirken diğer taraftan reperfüzyona karşı daha hassas olduğu gözlenmiştir (123). Ayrıca, biliyer epitelyal hücrelerinin aksine, epitelyal hücre kültüründe hipoksiye bağlı apoptozisi kısıtlamak için yapılan çalışmada yetişkin hepatositlerinde bcl -2 (124, 125) ve bcl-xL (126) gen ürünlerine az yada tespit edilemeyecek kadar az düzeyde olduğu gösterilmiştir (127-129).

Sonuç olarak; biliyer epitel hücreleri ile karşılaştırıldığında, hipoksi tarafından indüklenen apoptozise ilerleyebilen immün bağımlı apoptozisin (130) iyi bilinen uyarıcısı olan Fas antijenin yüksek düzeyde hepatositlerde tespit edilmiştir (124,131).

İnsan karaciğer allogreftlerinin postreperfüzyon biyopsilerinde apoptotik hepatositlerin dağılımı halen bilinmemektedir. İskemik hasar için en riskli bölge olan karaciğerin subkapsuler bölgesinde nekrotik hücrelerle de ilişkili olduğu düşünülen çok sayıda apoptotik hücre tespit edildi (121). Beyin (116), kalp (111) böbrek (109) ve karaciğer (120)'de daha önce gösterildiği gibi; tam doku hasarında apoptotik ve nekrotik hücreler tipik olarak beraber izlenmektedir. Subkapsuler bölgenin aksine karaciğer lobüllerinde sadece apoptotik hücreler gözlenmiştir. Karaciğer iskemisinin daha önce de tariflendiği diğer durumlarda olduğu gibi (120), apoptozis belirgin olarak hepatik lobüllerin sentrilobuler zonunda tespit edilmiştir. Yine de, apoptotik hepatositler periportal zonda da tespit edilmektedir ve bunların sayısı sentrilobüler bölgedekine yakın korelasyon göstermektedir. Bu bilgilere göre aynı apoptozis indükleyici stimulus tüm lobülü etkilerken, bu etki sentrilobüler bölgedeki düşük hepatik perfüzyon ve düşük oksijen basıncı gibi spesifik faktörlerle artmaktadır (132). Diğer ek bir faktör de hepatositlerin apoptozise yatkınlığının zonal farklılık göstermesi olabilir. Rat karaciğerinde daha detaylı yapılan çalışmaların da desteklediği (133) normal insan karaciğerinde yapılan önceki çalışmalar (134) fizyolojik apoptozisin normal karaciğerde sentrilobüler hepatositlerde kısıtlı kaldığını göstermektedir. Yine de bu bildiriler halen tartışma konusudur (135, 136). Nonfizyolojik apoptozise sentrilobüler hepatositlerin periportal hepatositlerden daha duyarlı olduğunu söyleyebilmek için daha fazla sayıda çalışma gereklidir.

2.4.8 İskemi-Reperfüzyonun Topografik Dağılımı

Bazı yazarlar araştırmalarını iskemik ve hipoksik karaciğerde hasarın topografik dağılımı üzerine yoğunlaştırmışlardır (137- 147). Karaciğerin iskemi reperfüzyonunda selüler hasarın dağılımı halen tartışma konusudur. Daha önce bölüm 2.4.5.'te özetlendiği üzere oluşturulan her üç iskemi-reperfüzyon modelinde de hasarın karaciğerdeki dağılımı araştırılmıştır. Shibayama invivo deneysel modelinde, iskemik karaciğer hasarının primer lezyonları olan karaciğer hücresinde şişme ve sinusoidlerde kollapsın periportal ve midzonal alanlarda olduğunu raporlamıştır (138). İzole karaciğer perfüzyon sisteminde yapılan çalışmalarda hipoksi sonucunda hücre yüzeyinde bleb formasyonu ile yapısal değişiklik ve hücre ölümleri özellikle midzonal ve perisentral alanlarda gözlenmiştir (139, 140, 141, 142, 143).

Reperfüzyon periyodunun başlangıcı ile birlikte oluşan karaciğer hasarının zonal dağılımının karakteri hakkındaki görüşler iki kola ayrılmaktadır. Bazı araştırmacılar hasarın iskemi dönemindekine paralel olduğunu savunmaktadır (139, 140, 141, 142, 143). Diğerleri ise in-vivo ve izole karaciğer perfüzyon sistemlerinden edindikleri izlenimler doğrultusunda reperfüzyon hasarının periportal alanda yoğunlaştığını rapor etmişlerdir (144, 145, 146).

1980'li yıllardan itibaren irreversible hipoksik hasara cevap mekanizması yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Ksantin oksidaz – oksijen bağımlı serbest radikal formasyonuna özellikle dikkat çekilmiştir (139, 141-145, 147). Suematsu sentrilobüler bölgede mitokondrial disfonksiyonun hipoksi boyunca erken midzonal oksidatif doku hasarına yol açan en önemli olay olarak görmektedir. Bu değişim ATP yıkımına ve ksantin oksidaz yayılımı ile midzonal bölgede hücre hasarına neden olmaktadır (142, 143).

2.5. Total Vasküler Eksklüzyonun Patofizyolojisi

TVE yöntemi sırasında oluşan hasarın temelinde venöz ve arteriyel kan akımının aynı anda bloke edilmesi yatmaktadır. Oluşum mekanizması açısından bu hasar karaciğerin sadece arteriyel blokajı ile oluşan hasardan daha farklı bir yapıya sahiptir (148). Önceki bölümlerde karaciğerin iskemi-reperfüzyon hasarı ile ilgili ayrıntılı literatür birikimi özetlenmiştir. Ancak aynı bilgi birikiminin hepatik arteriyel ve venöz blokaj modelinde olduğunu söylemek oldukça zordur. Klasik olarak uygulanan TVE metodu sıcak karaciğer iskemisine neden olmaktadır. Hasarın oluşumu hakkında iki ayrı teori öne sürülmektedir. Topaloğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar sonucunda hepatik iskemiye bağlı oluşan karaciğere zararlı metabolitlerin ve inflamatuvar hücre kaynaklı sitokinlerin sistemik dolaşıma atılmalarında venöz oklüzyona bağlı olarak bir gecikme olduğu gösterilmiştir (150, 151). Bu araştırmacılar karaciğerdeki hasarın reaktif metabolitlere uzun süre maruz kalmaya bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir (151).

Hasarı açıklayabilecek diğer teori ise; Japonya'dan Hiratsuka ve arkadaşları tarafından öne sürülmüştür (152). Yaptıkları deneysel çalışmada sadece hepatik hiler iskemi uygulanan deneklerdeki doppler incelemelerinde hepatik venden geriye yönelik akımın olduğunu görmüşlerdir. Bu akımın sadece portal oklüzyon uygulanan hayvanlarda, TVE uygulanan hayvanlara göre daha az hasarın oluşmasına etken olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu patofizyolojiye yönelik çalışmaların yanısıra yapılan klinik çalışmalarda Badia ve arkadaşları TVE uygulanmış hastalarda artmış bir sistemik cevabın varlığını gözlemlemişlerdir (149). TVE yönteminin portal oklüzyon yoluyla oluşturulan karaciğer hasarından daha şiddetli bir seyir izlediğine dair bilgiler ise Jungraitmayr ve Topaloğlu' nun yaptığı deneysel çalışmalarda da gösterilmiştir (151). Ancak hasarın patofizyolojisi tam olarak aydınlatılamamış ve klasik portal iskemi reperfüzyon hasarı ile arasındaki farklılıklar ortaya konulamamıştır. Yine bu çalışmada TVE sonrası reperfüzyon dönemindeki değişikliklerin klasik portal iskemi reperfüzyon hasarındaki değişikliklere paralel bir seyir gösterdiği gözlemlenmiştir (151).

3. MATERYAL VE METOD

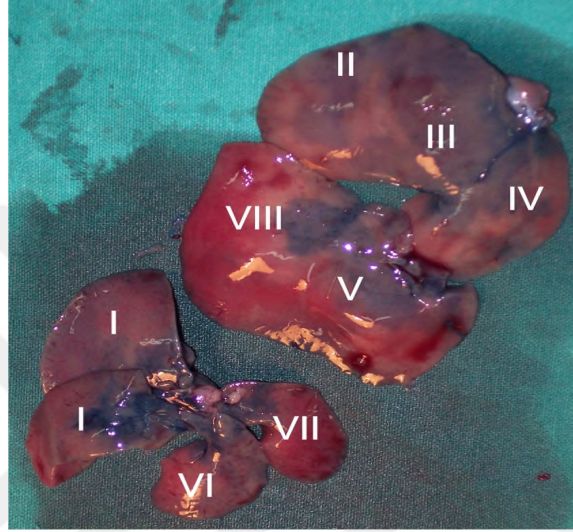
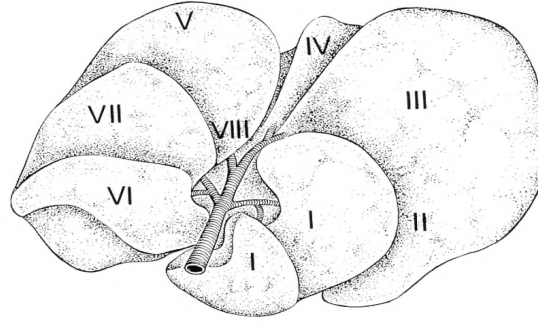
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulundan onay alındıktan sonra çalışmamız gerçekleştirildi. Çalışmada ağırlığı 180-200gr olan 40 adet erkek Wistar-Albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Araştırma Laboratuvarında rutin laboratuvar şartlarında saklanmıştır. Sıçanlara standart laboratuvar yemi ve su verilmiştir.

3.1. Deneysel Model

Hayvanlar 4 gruba (n=10) ayrıldı; Grup A'daki sıçanlara 30 dakika süresince portal oklüzyon yolu ile karaciğer iskemisi uygulandı ve biyokimyasal analiz için doku örnekleme yapıldı; Grup B'de 30 dakika süresince portal oklüzyon yolu ile karaciğer iskemisi uygulandı ve mikroskopik analiz için doku örnekleme yapıldı; Grup C'de 30 dakika süresince karaciğerin arteriel ve venöz akımı bloke edilerek total vasküler eksklüzyon uygulandı ve biyokimyasal analiz için doku örnekleme yapıldı; Grup D'de 30 dakika karaciğer süresince karaciğerin arteriel ve venöz akımı bloke edilerek total vasküler eksklüzyon uygulandı ve mikroskopik analiz için doku örnekleme yapıldı. Tüm gruptaki hayvanlar iskemi periodunun sonunda total hepatektomi yolu ile öldürüldü.

3.2. Cerrahi Teknik

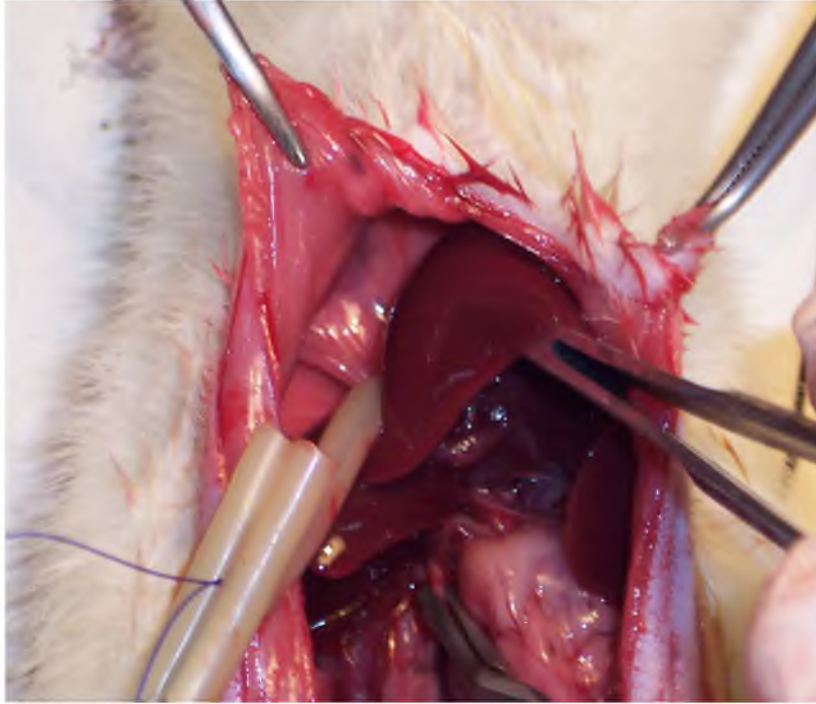
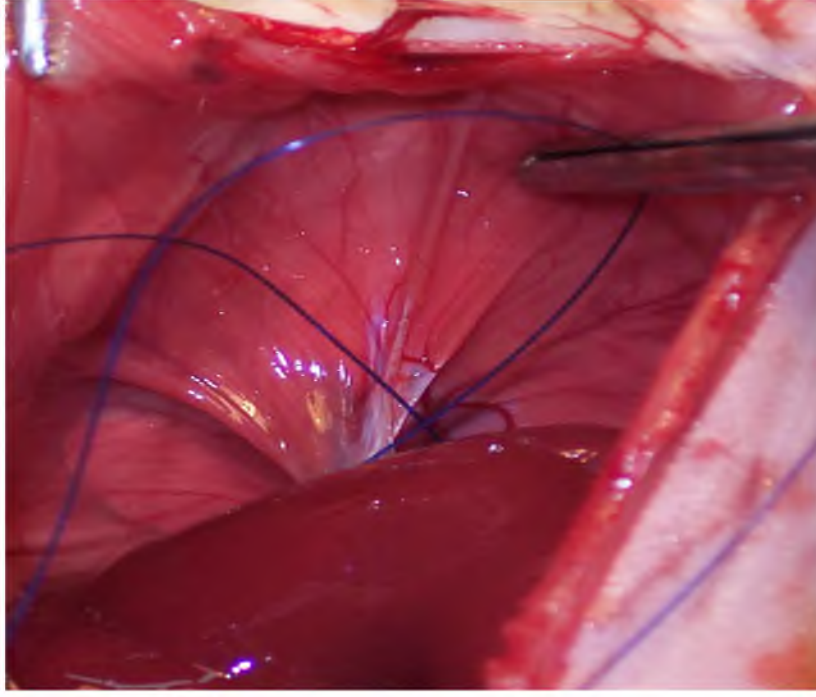
Hayvanlar deneyden önce 12 saat süre ile aç bırakıldı, fakat su içmelerine izin verildi. Tüm cerrahi uygulamalar 40 mg/kg ketamine (Ketalar, Parke-Davis Inc., Ann Arbor, MI) ve 4 mg/kg xylazine (Rompun, Bayer AG, Germany) anestezisi altında yapıldı. Laparotomi için orta hat abdominal insizyon tercih edildi. Grup A ve B' de portal pedikül 30 dakika boyunca ezmez vasküler klemplerle tıkandı. İskemik periyodun sonunda total hepatektomi uygulandı. Daha önce sıçan karaciğerinde yapılan deneysel iskemi-reperfüzyon modellerindeki değerlendirme metodlarından farklı olarak çalışmamızda karaciğerin bir veya iki segmenti yerine karaciğerin tamamı değerlendirildi. Grup A' daki sıçan hepatik segmentlerin makroskopik sınıflandırılması Köckerling'in tariflediği gibi yapılmıştır (şekil-7) (153).



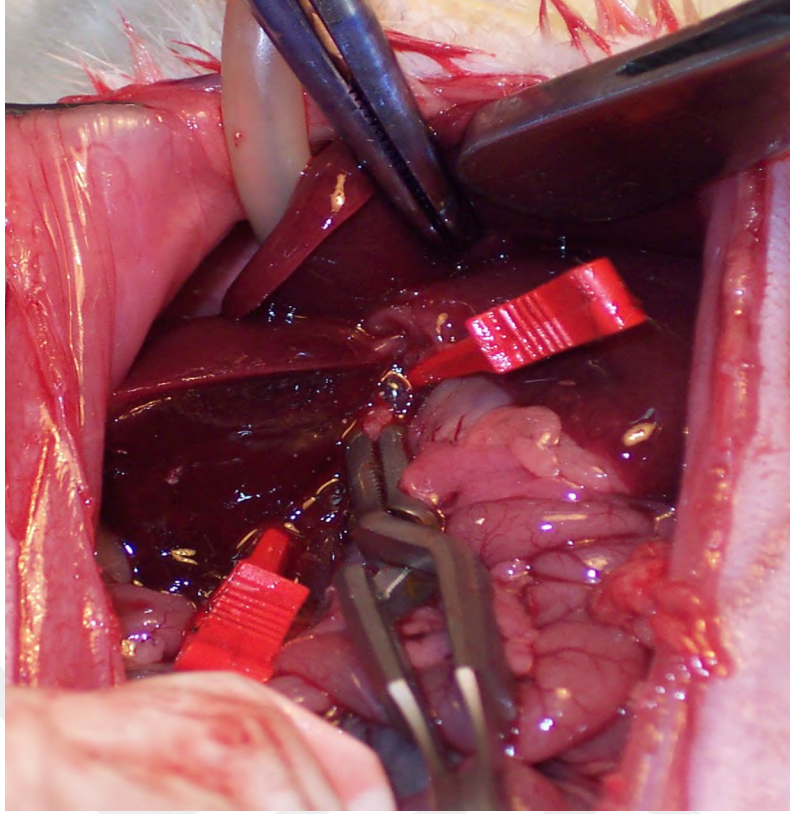
Köckerling'in Tariflediği Sıçan Hepatik Segmentlerin Makroskopik Sınıflandırılması (Şekil-7) (153).

Karaciğer üç parçaya ayrılmıştır. Segment 1, 6 ve 7 hiler segmentler; segment 5 ve 8 santral segmentler; segment 2, 3 ve 4 ise kubbe segmentleri olarak adlandırılmıştır (şekil-7). Grup A'daki tüm karaciğer parçaları oksidatif stres değerlendirilmesinde gerekli biyokimyasal analiz için -20°C'de saklandı. Grup B'de tripan mavisi ile boyama yapıldı ve mikroskopik analiz için karaciğer parçalara ayrıldı. TVE metodu daha önceki çalışmalarımızda tarif edildiği gibi uygulandı (150,151). Falsiform ligamant kesilerek karaciğer hepatik venlerin bileşkesine dek karın ön duvarından ayrıldı. Karaciğerin sağ karın duvarı ile olan ilişkisi kesilerek serbestleştirildi. Aynı şekilde hepatogastrik bağlantılar da serbestleştirildi. Daha sonra 3/0 prolon loop santral hepatik venlerin etrafından geçirildi (şekil-8).

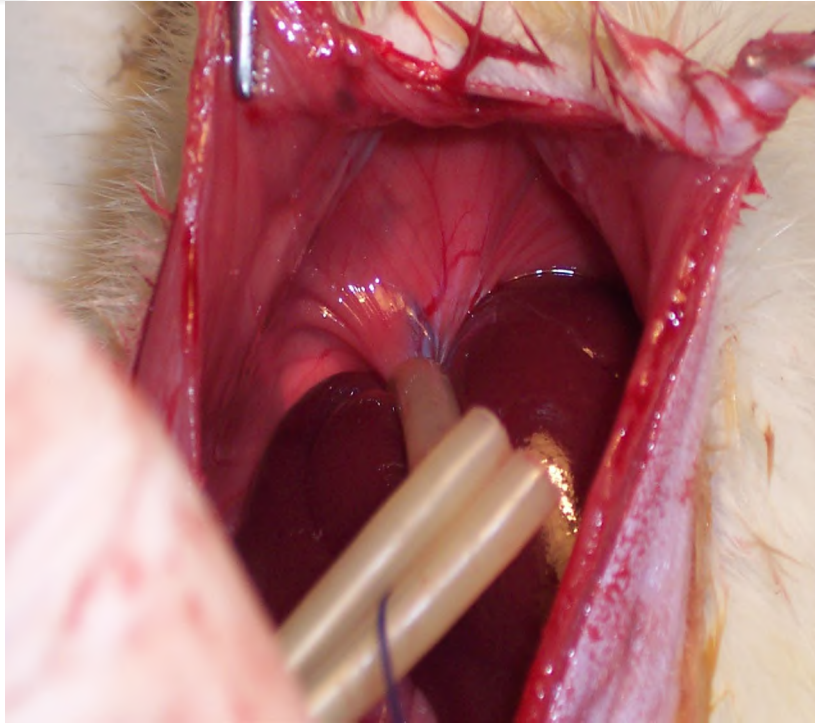
3/0 prolon loopun santral hepatik venlerin etrafından geçirilişi (şekil-8).



Portal triada klemp konuluđu (şekil-9).



Sol, sağ ve kaudat segmentlere ait venlere klemp konuluđu (şekil-10).

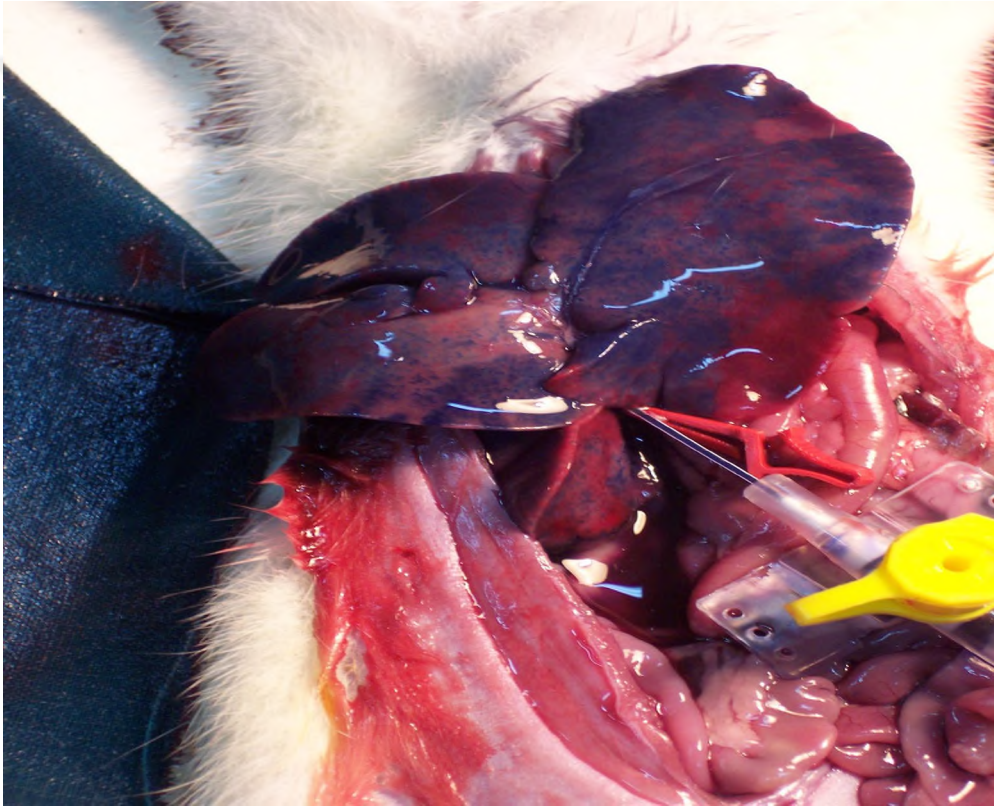


Santral hepatik veni kontrol eden loopun sıkıştırılması (şekil-11).

30 dakikalık karaciğer arteriel ve venöz akım blokajını takiben klempler ters sıra takip edilerek açıldı ve reperfüzyon beklenmeden örnekleme yapıldı. Grup C' de biyokimyasal analiz için karaciğer segmentelere göre parçalandı. Grup D' de ise tripan mavisi ile boyamanın ardından mikroskopik analiz için karaciğer parçalara ayrıldı.

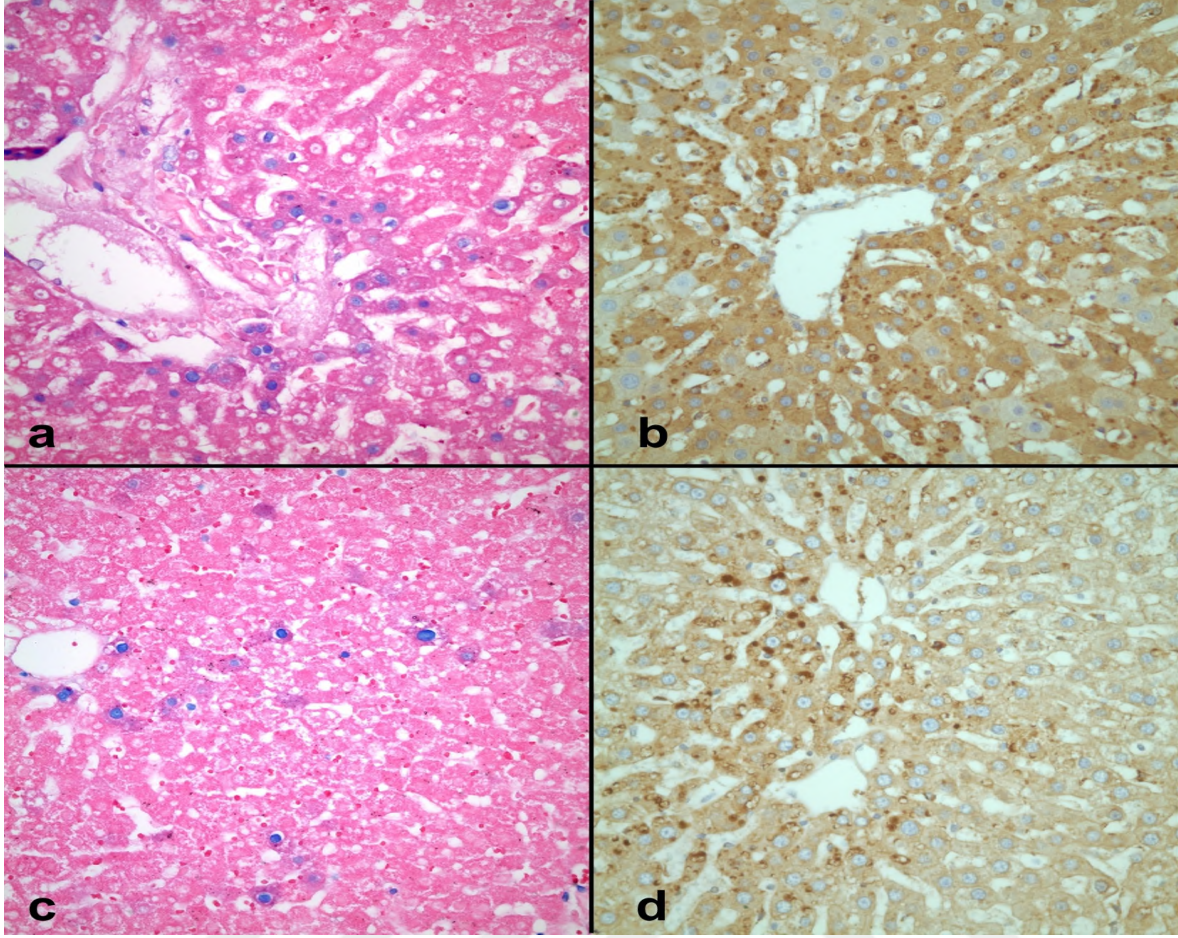
3.3. Histolojik Değerlendirme

Total hepatektomi yapıldıktan sonra portal ven kanülide edildi. Portal ven kanülünden izotonik salin infüzyonu ile karaciğer kandan temizlendi. Aynı kanülden 10 dakika süreyle tripan mavisi 0.2mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) infüzyonla verildi (şekil-12).



Tripan mavisi infüzyonu (şekil 12)

Ardından 5 dakika süreyle salin infüzyonu yapılarak boyanın fazlası dışarı atıldı. Daha sonra 6 dakika süreyle 1% paraformaldehide perfüze edilerek doku fiksasyonu sağlandı ve Thurman ve arkadaşlarının tariflediği gibi ışık mikroskopisinde incelendi (154). Histopatolojik değerlendirmenin daha iyi yapılabilmesi için karaciğerin her üç parçasından da kesitler alındı. Tripan mavisi ile işaretlenmiş membran hasarı olan hepatositlerin tespiti için 5 µm'lik kesitler deparafinize edilerek eosin ile boyandı (şekil 13a,c)



Kesitler deparafinize edilerek eosin ile boyanması (şekil 13a,c)

Hasarlı hücrelerin boyalı nükleuslarının tespiti için periportal, midzonal ve perisantral alanlar ışık mikroskopisinde (Zeiss, Germany) incelendi. Analiz için, her bir kesitte 10 ayrı alan 400 büyük büyütme alanında (x400 h.p.f.) incelendi ve her kesitte yaklaşık 1000 hücre sayıldı (146). Karaciğerde iskemiye bağlı gelişen patolojik değişiklikler histolojik derecelendirmeye tabi tutuldu (Tablo-1) (155). Bu skalada zonal hemoraji, konjesyon, sinüzoidlerde ve lenfatiklerde dilatasyon, zonal hepatoselüler vakualizasyon, şişme ve yağlanma değişikliği gibi parametreler kullanıldı ve bu parametrelerin analizi 50 büyük büyütme alanı altında yapıldı.

Tablo-1: İleri patolojik bulgular için HE ile boyalı kesitlerin değerlendirilmesi.

	Periportal zon		Midzonal zon		Perisantral zon	
	Grup B	Grup D	Grup B	Grup D	Grup B	Grup D
Hemoraji	1	2	2	2	2	3
Konjesyon	3	3	3	4	3	4
Sinüsoidal dilatasyon	2	3	3	4	3	4
Lenfatik dilatasyon	2	3	3	4	3	4
Vakualizasyon	2	3	3	3	3	4
Şişme	1	3	3	3	3	4
Yağlı değişiklik	1	2	3	3	3	4

İskemiye bağlı gelişen karaciğerdeki patolojik değişikliklerin HE ile boyalı kesitlerde histolojik derecelendirme skalası (0-yok, 1-minimal, 2-orta, 3-ileri, 4-şiddetli) .

3.4. İmmünohistokimyasal Analiz

Erken apoptozisi tespit etmek için daha önce Leers' in tariflediği gibi M30 monoklonal antikorunu (mAb) (Boehringer Mannheim, Germany) ile analiz edildi (156). Diğer metodlarla karşılaştırdığımızda M30 antikorunu ile apoptozis çok erken dönemde tespit edilebilmektedir (155). Apoptozisin erken döneminde, kaspazlar sitokeratin (CK) 18'i zedeleyerek, CK18'in üzerindeki epitop alanını açığa çıkarırlar. M30 antikorunu spesifik olarak CK18'in üzerindeki epitopunu tanıır. Bu bölge normal hücrelerde bulunan doğal CK18'de saptanamaz. Formalin ile fikse edilmiş 5µm kalınlığındaki parafinli karaciğer kesitleri deparafinize ve rehidrate edildi. Antijeniteyi tekrar kazanmak için kesitler sitratlı tampon (pH 6.0) içinde 15 dakika mikrodalgada ısıtıldı, ardından kesitler oda ısısında 1saat 1 µg IgG/ml konsantrasyonlu M30 antikorla inkübe edildi. Anti-mouse biotin Ig (Dako, Denmark)'i peroxidaz-işaretli streptavidin (Dako, Denmark) takip etti. Peroxidaz işareti 0.003% H₂O₂ içindeki diaminobenzidine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ile eken apoptosis kahverengi parçalar olarak gözlendi (şekil-13b,d). Arka plan boyaması hematoksin ile yapıldı. Apoptotik hücrelerin tespiti için periportal, midzonal ve perisantral alanlar incelendi. Analiz için her kesit 10 ardışık büyütmede (x400) incelendi (yaklaşık 1000 hücre sayıldı). Boyalı hücre oranı, o zondaki boyalı nükleus sayısını toplam hepatosit sayısına bölerek elde edildi (146).

3.5. Karaciğer Doku Biyokimyası

Karaciğerde superoksit dismutaz aktivitesi, kompleksin fenazin metosülfatı inhibe edebilmesi ile tespit edildi (157). Karaciğerde katalaz aktivitesi Ueda metodu ile tespit edildi (158). Karaciğer dokusundaki glutatyon içeriği 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asidin nikotinamid adenin dinükleotid fosfat ile indirgenmesi sonucu oluşan glutatyon (GSH) miktarının kinetik sayımı ile belirlendi (159). Karaciğer dokusundaki Glutatyon S-Transferaz (GST) aktivitesi ise konjuge GSH ve 1-chloro-2,4-dinitrobenzen' in 340nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümü ile belirlendi (160).

3.6. İstatiksel Analiz

Değerlerin anormal dağılımından dolayı grup C'deki katalaz, grup A'daki GSH ve SOD değerleri için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Çoklu karşılaştırma Bonferroni düzeltmesi eklenerek Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Histopatolojik değerler, grup A' da katalaz ve GST, grup C' de SOD, GST ve GSH değerleri normal dağılım gösterdikleri için tek değişkenli analiz testi kullanıldı. Bu parametreler için çoklu karşılaştırma Tukey testi ile yapıldı. $P < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik ve immünohistokimyasal bulgular

Grup B'de Tripan mavisi pozitif (TB+) ve M30 Ab pozitif (M30 Ab+) hepatositler perisantral ve periportal alanla karşılaştırıldığında midzonal alanda daha yoğun kümелendikleri gözlemlendi (tablo 2). Hafif şiddette konjesyon, hepatosellüler vakuolizasyon, sinusoid ve lenfatiklerde dilatasyon, şişme ve yağlanma gibi değişiklikler portal oklüzyon uygulanan hayvanların midzonal ve perisantral alanlarında gözlemlendi (tablo 1). Total vasküler eksklüzyon uygulanan hayvanlarda ise TB+ ve M30 Ab+ hepatositlerin zonal dağılımı portal oklüzyon uygulanan gruptakilerden farklılık göstermektedir. Grup D'de TB+ ve M30 Ab+ hepatositlerin yoğun olarak perisantral alanlarda kümелendiği gözlemlendi (tablo 2). Hasar yoğunluğunun midzonal ve periportal alanlarda azaldığı saptandı.

Tablo -2: Tripan mavisi ve M30 Ab pozitif hepatositlerin deneysel gruptaki mikroskopik zonal dağılımı.

Gruplar	Periportal zon (%)		Midzonal zon (%)		Perisantral zon (%)	
	TB+	M30 Ab+	TB+	M30 Ab+	TB+	M30 Ab+
Grup B	6.3±2.5	8.9±1.8	20.6±2.6*	24.5±0.4*	12.4±2.2 [#]	15.5±1.7 [#]
Grup D	12.5±0.2	11.8±0.9	19.2±1.2 [†]	17.0 ±1 [†]	40.0±0.6 [°]	35.7±0.5 [°]

* Aynı gruptaki diğer zonlardan anlamlı farklılık (p=0.01) görüldü.

[#] Grup B'deki periportal zona göre anlamlı farklılık (p=0.03) görüldü.

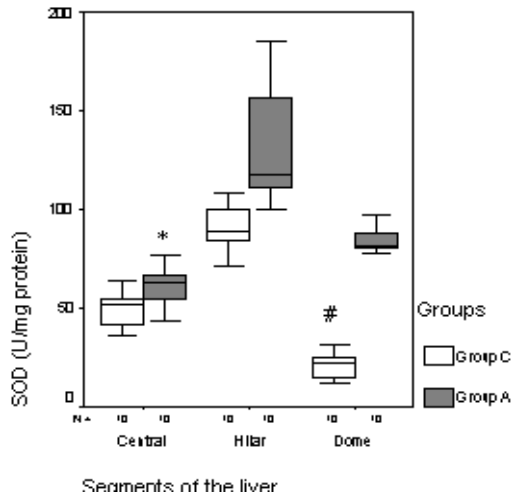
[†] Grup D'deki periportal zondan anlamlı farklılık (p=0.05) görüldü.

[°] Grup B ve Grup D'deki perisantral zonlar arasında anlamlı farklılık (p=0.005) görüldü.

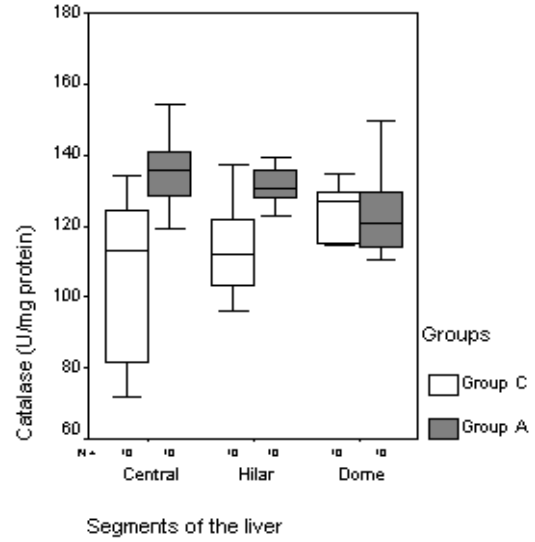
Hasarlı hepatosit miktarının total vasküler eksklüzyon uygulanan hayvanlarda daha yoğun olmasının yanı sıra şiddetli konjesyon, hepatosellüler vakuolizasyon, sinusoid ve lenfatiklerde dilatasyon, şişme ve yağlanma gibi değişikliklerinde de portal oklüzyon uygulanan deneklere göre daha belirgin olduğu gözlemlendi (tablo 1).

4.2. Karaciğer Dokusunda Biyokimyasal Analiz

30 dakikalık portal oklüzyon periodu sonunda doku SOD düzeyinin karaciğerin diğer segmentlerine oranla santral segmentte çok daha az olduğu görüldü (p<0.001) (grafik 1). Total vasküler eksklüzyon uygulanan karaciğerlerde ise SOD düzeyi diğer segmentlere oranla dom segmentlerde daha düşük seviyelerde izlendi (p<0.001). Deneydeki en düşük SOD düzeyleri Grup C'de saptandı (santral segmentler için grup A-C arasındaki fark; p=0.02, hilar segmentler için grup A-C arasındaki fark; p=0.005 ve dom segmentler için grup A-C arasındaki fark; p<0.001).

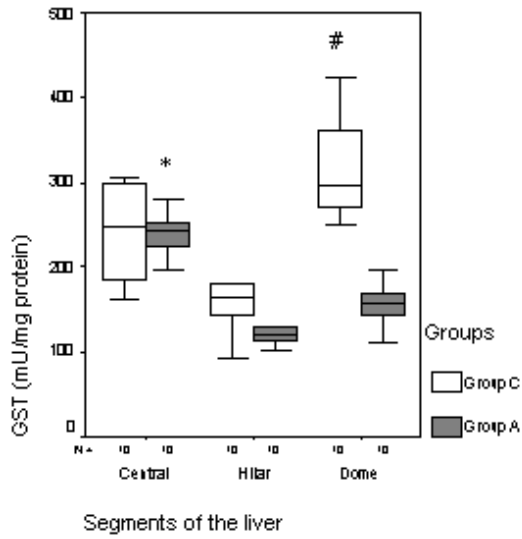


(grafik 1)

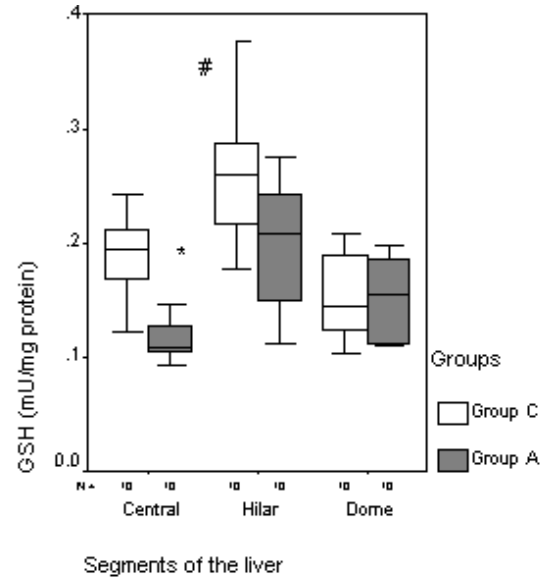


(grafik 2)

Karaciğer segmentlerinde doku katalaz düzeyi dağılımı Grup A ve C arasında farklılık gözlenmemiştir (grafik 2). Grup A ve C'de doku katalaz düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı fark izlenmemiştir. Doku hasarının bir göstergesi olan hepatik GST düzeyinin Grup A'da santral segmentlerde diğer segmentlere oranla daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0.001$) (grafik 3). Grup C'de ise diğer segmentlere oranla dom segmentlerde GST düzeyi çok daha yüksek bulundu (santral segmentle karşılaştırıldığında $p = 0.016$, hilar segmentle karşılaştırıldığında $p < 0.001$). GST düzeylerinin dağılım biçimi grup C' de grup A'ya göre farklılık göstermektedir. Deneydeki en yüksek GST düzeyleri grup C'de izlendi (santral segmentler için $p = 0.86$, hilar segmentler için $p = 0.029$ ve dom segmentler için $p < 0.001$). Grup A'da santral segmentlerde glutatyon düzeyleri diğer segmentlere kıyasla çok daha düşük seviyelerde saptandı (hilar segmentlerle karşılaştırıldığında $p = 0.001$, dom segmentlerle karşılaştırıldığında $p = 0.013$) (grafik 4). Grup C' de ise hilar segmenterle kıyaslandığında dom ve santral segmentlerde glutatyon düzeyleri daha düşük bulundu. Grup C ile karşılaştırıldığında en düşük GSH değerlerinin olduğu segmentler grup A' da görüldü. (santral segmentler için $p = 0.005$, hilar segmentler için $p = 0.02$ ve dom segmentler için $p = 0.08$).



(grafik 3)



(grafik 4)

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda kullandığımız deneysel modelimiz literatürdeki benzer çalışmalara göre farklılıklar içermektedir. Sıçan karaciğerinin loblarının kanlanması hepatik arter ve portal ven dalları ile sağlanmaktadır, sadece median ve sol lateral lobların iskemik bırakılması parsiyel no-flow iskemi modelinin temelini oluşturmaktadır (161-165). Çalışmamızda ise tüm karaciğer segmentlerinin etkilendiği portal oklüzyon modeli tercih edilmiş ve bu modelin klinikte yaygın kullanılan Pringle manevrasına en yakın model olduğu düşünülmüştür. Bu çalışmada hücresel hasarın zonal dağılımının değerlendirilmesi ise literatürdeki diğer çalışmalardan farklılık göstermektedir. Mikroskopik olarak her karaciğer segmentinde periportal, midzonal ve sentrilöber alanlar bulunmaktadır. Bazı otörler parsiyel "no-flow" iskemi sonrası karaciğer hasarının değerlendirilebilmesi için rat karaciğerinin median ve sol lateral loblarının mikroskopik analizinin yeterli olacağını düşünmektedir. Bizim metodumuzda ise segmenter sınıflandırma sayesinde karaciğerin tamamının değerlendirilmesi kolaylaşmaktadır. Bu sınıflandırma enzimatik aktivasyon ölçümünde daha rasyonel hale getirmektedir.

Literatürde de ayrıntılı bir şekilde görüldüğü üzere karaciğere uygulanan portal oklüzyonun yarattığı hücresel boyuttaki değişikliklerin önemli bir bölümü aydınlatılmıştır (bkz. Bölüm 2.4). Tartışmaların devam ettiği konulardan biri olan hasarın zonal dağılımı üzerine yaptığımız çalışmamızda araştırmacıların bir kısmının da savunduğu gibi midzonal alanda belirgin olan hasarlanma ile karşılaşıldı. Hasarın karakterinde literatür verilerini destekler yönde verilere rastlandı. Erken apoptozisin, membran hasarına eşlik ettiği gözlemlendi.

Literatürdeki bu bilgiye ek olarak yaptığımız makroskopik sınıflandırma sayesinde karaciğerin bütünü hakkında (segmenter düzeyde) daha fazla bilgiye daha fazla doku kesiti incelenerek ulaşıldı.

Uygulanan portal oklüzyon sonrasında karaciğerin santral segmentlerinde oksidatif hasarın tetiklediği bir dizi değişikliklerle karşılaşıldı. Karaciğer dokusundaki hasarın belirteçi olan GST düzeylerindeki artış ve GSH düzeylerindeki düşüş daha önceki çalışmalarımızda da saptadığımız gibi yüksek superoksit radikali seviyelerinin aynı (santral) segmentlerde saptanması ile açıklanabilir. Suematsu ve Marotto'nun yaptığı çalışmalarda da karaciğer 'no-flow/reflow' modelinde hipoksik dönem sırasında oksidatif stres varlığı gösterilmiştir (139, 141, 142). Ancak tüm araştırmacıların kabul ettiği gibi oksidatif stres reperfüzyon sırasında daha da şiddetlenmektedir.

TVE sırasında karaciğerde meydana gelen hücresel düzeydeki değişikliklerle ilgili çalışmaların azlığı, beraberinde altta yatan mekanizmaların açıklanamamasına neden olmuştur. Klinik çalışmalarda TVE sırasında oluşan karaciğer hasarını tespit edebilmek daha önce de belirttiğimiz gibi çok fazla parametrenin etkileşimi nedeni ile zorlaşmaktadır. Domuz ve köpeklerde uygulanan TVE modeli gibi bizim deneysel modelimiz de TVE'ye sekonder gelişen karaciğer hasarının tanımlanmasına destek olmuştur (166-169). Daha önce de belirttiğimiz gibi; sıçanlar karaciğerlerine uygulanan TVE'ye karşı iyi tolerans göstermemektedirler (150,151). Hayvanlardaki maksimum tolerans limitinin 10 dakikadan fazla olmadığı tarafımızdan tespit edilmiştir. Daha önceki deneysel modellerimizde hayvanların deney süresince yaşaması gerektiğinden dolayı klemp süresi kısıtlanmıştır. Fakat, literatürde bahsedildiği gibi, 10 dakikalık klemp süresi, rat modellerinde karaciğer iskemisine bağlı gelişen histopatolojik değişikliklerin gözlenebilmesi için yeterli olmamaktadır. Bu çalışmada, TVE'ye sekonder karaciğer hasarının daha iyi değerlendirilebilmesi için klemp süresi 30 dakikaya çıkartıldı. Hayvanların 30 dakikalık TVE perioduna zorla da olsa dayanabildikleri gözlemlendi. Sıçan karaciğerinde uygulanan TVE'nin perisantral alanda daha belirgin olan histopatolojik hasara neden olduğu gözlemlendi. Oksidatif stres ve doku hasarını gösteren biyokimyasal parametrelerin histopatolojik verilerle benzer şekilde dağılım gösterdiği gözlemlendi. Karaciğerde portal oklüzyon ile kıyaslandığında TVE sonrasında doku hasarının daha fazla olduğu tespit edildi.

Karaciğerde TVE yöntemine ikincil gelişen hipoksik hasarın mekanizması iki teori ile açıklanabilmektedir. İskemiye bağlı olarak karaciğerden salınan toksik metabolitlerin ve serbest oksijen radikallerinin venöz blokaj sırasında karaciğerden dışarıya atılamaması ve bu süre zarfında dokuların bu toksik içeriğe maruz kalmasının portal oklüzyona göre daha fazla hasarın meydana gelmesine neden olduğunu düşünmekteyiz (150). Almanya'dan yayınlanan başka bir çalışma da bunu desteklemektedir. Jungfraithmayr domuz karaciğerinde yaptığı çalışmada TVE ve kriyoterapi kombinasyonunun tek başına kriyoterapiye göre daha

fazla alanda kriyonekroz oluşturduğunu göstermiştir (169). Otörler hepatik perfüzyondaki azalmaya bağlı olarak donma hızının arttığını düşünmektedirler. Diğer teoride ise portal oklüzyon sırasında toleransı artıran hepatovenöz geri akımın venöz blokaj yolu ile engellenmesidir (168). Bu çalışmada domuzlarda lazer dopler flovmetri kullanarak karaciğer doku kan akımı ve doku oksijen basıncı ölçülmüş, hepatovenöz geri akımın varlığı gösterilmiştir. Çalışmamızda detaylı hepatik perfüzyon ölçümü yapılmamasına karşın, TVE sırasında oluşan karaciğerdeki segmenter hasarın dağılımı bu çalışma ile benzer özellikler göstermektedir. TVE sırasında bloke edilen hepatovenöz geri akım dom segmentlerde oluşan belirgin hasarın nedeni olabilir. Diğer yandan, portal oklüzyon sırasında dom segmentlerde santral segmentlere oranla daha az karaciğer hasarının gelişmesi de geri akımın kesilmemesi ile ilişkilendirilebilir.

6. SONUÇ

1. Karaciğerin arteriel (portal ven ve hepatik arter yolu ile) ve venöz akımının blokajı sadece arteriel blokaja göre daha ağır bir hasara neden olmaktadır
2. İhtiyaç duyulduğu anlarda TVE yöntemi mümkün olduğunca kısa süreli olarak uygulanmalıdır
3. TVE'nin aralıklı olarak uygulaması ile ilgili yapılacak çalışmaların gelecekte bu yöntemin daha uzun süreli ve güvenli bir şekilde uygulanabilmesi için gerekli olduğuna inanmaktayız.

7. KAYNAKLAR

1. Heaney JP, Stanton WK, Halbert DS, Seidel J and Vice T. An improved technique for vascular isolation of the liver: experimental study and case reports. *Ann. Surg.* 1966; 163:237
2. Fortner JG, Shiu MH, Kinne DW, Kim DK, Castro EB, Watson RC, Howland WS and Beattie EJ. Jr. Major hepatic resection using isolation and hypothermic perfusion. *Ann. Surg.* 1974; 180: 644
3. Huguet C, Nordlinger B, Galopin JJ, Bloch P and Gallot D. Normothermic hepatic vascular exclusion for extensive hepatectomy. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1978; 147:689
4. Bismuth H, Castaing D and Garden J. Major hepatic resection under total vascular exclusion. *Ann. Surg.* 1989; 210:13
5. Huguet C, Chieco PA, Gavelli A, Arrigo E, Harb J, Clement RR. Technique of hepatic vascular extension for extensive liver resection. *Am. J. Surg.* 1992; 163:602
6. Huguet C, Gavelli A, Chieco PA, Bona S, Harb J, Joseph JM, Jobard J, Gramaglia M and Lasserre M. Liver ischemia for hepatic resection: Where is the limit? *Surgery.* 1992; 111:251
7. Delriviere L, Hannoun L. Insitu and exsitu invivo procedures for complex major liver resections requiring prolonged hepatic vascular exclusion in normal and diseased livers. *J. Am. Coll. Surg.* 1995; 181:272
8. Yamaoka Y, Ozawa K, Kumada K, Shimahara Y, Tanaka K, Mori K, Takayasu T, Okamoto O, Kobayashi N, Konishi Y, et al. Total vascular exclusion for hepatic resection in chirrotic patients: Application of venovenous bypass. *Arch. Surg.* 1992; 127:276
9. Edwards MJ and Bentley FR. Major hepatic resection under total vascular exclusion with extracorporeal venovenous bypass. *Am. Surg.* 1994; 60:231
10. Stephen MS, Sheil AGR, Thompson JF, Wilson T and Boland SL. Aortic occlusion and vascular isolation allowing avascular hepatic resection. *Arch. Surg.* 1990; 25:1482
11. Stephen MS, Gallagher J, Sheil AGR, Sheldon DM, Storey DW. Hepatic resection with vascular isolation and routine supraceliac aortic clamping. *Am. J. Surg.* 1996; 171:351
12. Elias D, Lasser P, Debaene B, Doidy L, Billard V, Spencer A, Leclercq B. Intermittent vascular exclusion of the liver (without vena cava clamping) during major hepatectomy. *Br. J. Surg.* 1995; 82:1535
13. Pichlmayr R, Grosse H, Hausas J, et al: Technique and preliminary results of extracorporeal liver surgery and of surgery on in situ perfused liver. *Br. J. Surg.* 1990; 77:21
14. Cunci O, Coste T, Vacher B, et al: Resection da la veine cave inferieure retro hepaticque au cours d'une hepatectomie pour tumeur. *Ann. Chir.* 1983; 37:197

15. Belghiti J, Noun R, Zante E, et al: Portal triad damping or hepatic vascular exclusion for major liver resection. *Ann. Surg.* 1996; 224:155
16. Huguet C, Gavelli A. Total vascular exclusion for liver resection. *Hepatogastroenterol.* 1998; 45:368
17. Yamaoka Y, Ozawa K, Kumada K, Shimahara Y, Tanaka K, et al. Total vascular exclusion for hepatic resection in cirrhotic patients: Application of venovenous bypass. *Arch.Surg.* 1992;127:276-280.
18. Elias D, Lasser P, Debaene B, Doidy L, Billard V, Spencer A, Leclercq B. Intermittent vascular exclusion of the liver (without vena cava clamping) during major hepatectomy. *Br. J. Surg.* 1995; 82:1535-1539
19. Mansvelt B, Bertnard CI, Versaille H, Nokerman P, Etienne P, de Neve de Roden A. Systematic use of total vascular exclusion in 14 elective hepatic resections. *Acta. Chir. Belg.* 1999; 99:159-162.
20. Evans PM, Vogt DP, Mayes III JT, Henderson M, Walsh M. Liver resection using total vascular exclusion. *Surgery* 1998; 124:807-815.
21. De Cosmo GA, Adducci E, Gualtieri EM. Haemodynamic and metabolic changes during major liver resection with use of hepatic total vascular exclusion. *Int. Surg.* 2000; 85:243-247.
22. Stephen MS, Gallagher J, Sheil AGR, et al. Hepatic resection with vascular isolation and routine supraceliac aortic damping. *Am. J. Surg.* 1996; 171: 351-355.
23. Habib N, Zografos G, Dallaserra G, Greco L, Bean A. Liver resection with total vascular exclusion for malignant tumors. *Br. J. Surg.* 1994; 81: 1181-1184.
24. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br. J. Surg.* 1994; 81:637-647.
25. Kawasaki T, Marubayashi S. Liver in shock. In: Barret JM, Nyhus LM (Eds.) *Treatment of shock*. 2nd Edition. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986; pp. 151-162.
26. McCuskey RS, Urbaschek R, Urbaschek B. The microcirculation during endotoxaemia. *Cardiovasc. Res.* 1996; 32:752-763.
27. Huguet C, Addario-Chieco P, Gavelli A, et al: Technique of hepatic vascular exclusion for extensive liver resection. *Am. J. Surg.* 1992;163:602-605.
28. Delva E, Camus Y, Nordlinger B, et al: Vascular occlusion for liver resections. Operative management and tolerance to ischemia: 142 cases. *Ann Surg* 1989; 209:211-218.
29. Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, et al: Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation - a multivariate analysis. *Transplantation* 1993; 55:807-813.
30. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, et al: Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant for liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am. J. Pathol.* 1994; 145:1421-1423.

31. Marzi I, Takei Y, Rüker M, et al: Endothelin-1 is involved in hepatic sinusoidal vasoconstriction after ischemia and reperfusion. *Transpl Int.* 1994; 7:S503-S506.
32. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J.* 1990; 4:3355-3359.
33. Menger MD, Sack FU, Barker JHF, et al. Quantitative analysis of microcirculatory disorders after prolonged ischemia in skeletal muscle: therapeutic effects of prophylactic isovolemic haemodilution. *Res. Exp. Med.* 1988; 188:151-165.
34. Coletti LM, Kunkel SL, Walz A, et al. The role of cytokine Networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 1996; 23:506-514.
35. Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M, et al. Up-regulation of oxygen derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 1997; 64:1398-1403.
36. Jaeschke H, Mitchell JR. Mitochondria and xanthine oxidase both generate reactive oxygen species after hypoxic damage in isolated perfused rat liver. *Biochem . Biophys. Res. Commun.* 1989;160:140-147
37. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupfer cells induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver in vivo. *Am. J. Physiol.* 1991; 260:G 355-G 362
38. Suzuki S, Toledo-Peregra LH. Interleukin-1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *J. Surg. Res.* 1994; 57, 253-258
39. Essani NA, Fisher MA, Simmons CA, Hoover JL, Farhood A, Jaeschke H. Increased P Selectin gene expression in the liver vasculature and its role in the pathophysiology of neutrophil induced liver injury in murine endotoxin shock. *J. Leukocyte Biol.* 1998; 63:288-296
40. Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia-reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1- mediated venular adherence. *Surgery* 1995; 117:195-200
41. Chosay JG, Essani NA, Dunn CJ, Jaeschke H. Neutrophil margination and extravasation in sinusoids and venules of the liver during endotoxin-induced injury. *Am. J. Physiol.* 1997; 272;G 1195-G 1200
42. Zang JX, Jones DV, Clemens MG. Effect of activation on neutrophil induced hepatic microvascular injury in isolated rat liver shock. 1994; 1:273-278
43. Clemens MG, Bauer M, Pannas BHJ, Bauer I, Zang JX. Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemic reperfusion. *Shock* 1997;8: 80-85
44. Zang JX, Bauer M, Clemens MG. Vessel and target cell-specific actions of ET1 and ET3 in rat liver *Am J. Physiol* 1995; 269;G 269-G 277

45. Eidelman Y, Glat PM, Pachter HL, Cabrera R, Rosenberg C. The effects of topical hypothermia and steroids on ATP levels in an in vivo liver ischemia model. *J. Trauma* 1994; 37:677-681.
46. Usami M, Furuchi K, Shiroiwa H, Saitoh Y. Effect of repeated portal-triad cross-clamping during partial hepatectomy on hepatic regeneration in normal and cirrhotic rats. *J Surg Res* 1994; 57:541-543.
47. Ezaki T, Seo Y, Tomoda H, Furusawa M, Kanamatsu T, Sugimachi K. Partial hepatic resection under intermittent hepatic inflow occlusion in patients with chronic liver disease. *Br. J. Surg.* 1992; 79:224-226.
48. Huguet C, Gavelli A, Chieco A et al. Liver ischemia for hepatic resection: Where is the limit? *Surgery* 1992;111:251-259.
49. Foschi D, Castoldi L, Lesma A, Musazzi M, Benevento A, Trabucchi E. Effects of ischaemia and reperfusion on liver regeneration in rats. *Eur. J. Surg.* 1993; 159:393-398.
50. Emre S, Schwartz ME, Katz E, Miller CM: Liver resection under total vascular isolation. Variations on a theme. *Ann. Surg.* 1993 Jan;217(1): 15-9.44
51. Jaeschke H, Farhood A, AP Bautista, Z Spolarics, JJ Spitzer, CW Smith. Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1(CD11 b/CD18) Monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Hepatology* 17 (1993) 915-923
52. Mochida, S.T. Ogata, K. Hirata, Y. Ohta, S. Yamada, K. Fujiwara; Provocation of massive hepatic necrosis by endotoxins after partial hepatectomy in rats. *Gastroenterology* 99 (1990); 771-777
53. Caraceni P, Gasbarrini A, Nussler A et al. Human hepatocytes are more resistant than rat hepatocytes to anoxia-reoxygenation injury. *Hepatology* 1994;20:1247-1254.
54. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol)* 23) 1991 ;260:G355-G362.
55. Caraceni P, Gasbarrini A, Nussler A et al. Human hepatocytes are more resistant than rat hepatocytes to anoxia-reoxygenation injury. *Hepatology* 1994;20:1247-1254.
56. Sokol RJ, Devereaux M, Khandvala R, O'Brien K. Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 1993;17:869-881.
57. Velboom CRB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: Central role of the neutrophil. *Br. J. Surg.* 1991;78:651-655.
58. Meister A. Glutathione Metabolism. *Methods in Enzymology* 1995; 251: 3-7

59. Marcus C, Habig W, Jacoby W. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1978; 188 (2), 287-293
60. Warholm M, Guthenberg C, Von Bahr C, Mannervik B. Methods in Enzymology. 1985; 113 (62), 499-504
61. Mannervik B, Guthenberg C. Methods in Enzymology. 1981; 77 :28
62. Sies H, Angew C. Hem. Int. Ede. NGL. 1986; 25: 1058-71
63. Girotti AW. J Lipid Res. 1998; 39: 1529-42
64. Sanchez Alvarez R, Almedia A, Medina J. Pediatric Research. 2002; 51(1), 34-39.
65. Carlberg I, Mannervik B. J. Biol. Chem. 1986; 261 (4), 1629-1635.
66. Mate MJ, Zamocky M, Nykyri L M, Herzog C. J. Mol. Biol. .1999; 268:135-149.
67. Moncada S, Higgs A: The L-arginine nitric oxide pathway. N. Engl. J. Med. 329:2002, 1993.
68. Forstermann U, Closs E, Pollock J, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isoenzymes. Hypertension. 1994; 1121-1131.
69. Geller DA, Lovvenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, diSilvo M, Wang SC, Nakayama DK, Simmons RL, Synder SH, Billiar TR. Molecular cloning and expression of nitric oxide synthase from human hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Scien USA 1993; 94: 3491-3495.
70. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J. 1992;6:3051-3064.
71. Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamter JS. Nitric oxide in skeletal muscle. Nature 1994; 372: 546-548
72. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage derived nitric oxide. Arch. Biochem. Biophys. 1992; 298: 446.
73. Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, et al: Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. J. Clin. Invest. 1997; 100:2923-2930.
74. Hobbs AJ, Ignarro LJ: Chemistry and molecular biology of nitric oxide synthesis. In: Mathie RT, Griffith TM (Eds.). The Haemodynamic Effects of Nitric Oxide. 1st Edition. London: Imperial College Press, 1999; pp. 52-81.
75. Geller DA, de Vera ME, Russell DA, et al: A central role for IL-1 β in the in vitro and in vivo regulation of hepatic inducible nitric oxide synthase. J Immunol 1995; 155:4890-4898.
76. Shiratori Y, Ohmura K, Hikiba Y, et al: Hepatocyte nitric oxide production is induced by Kupffer cells. Dig Dis Sci 1998; 43:1737-1745.
77. Griffon B, Cillard J, Chevanne M, et al: Macrophage-induced inhibition of nitric oxide production in primary rat hepatocyte cultures via prostaglandin E₂ release. Hepatology 1998; 28:1300-1308.

78. Shito MV, Vakabayashi G, Ueda M, et al: Interleukin-1 receptor blockade reduces tumour necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation* 1997; 63:143-148.
79. Kerr JFR. Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular death. *J Pathol.* 1971; 105:13-20
80. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg.* 1991;161:488-503.
81. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg. Clin. North. Am.* 1992; 72:65-83.
82. Im MJ, Manzon PN, Bulkley GB, Hoopes JE. Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. *Ann Surg* 1985; 201:357-359.
83. Poggetti RS, Moore FA, Moore EE, Bensard DD, Anderson BO, Banerjee A. Liver injury is a reversible neutrophil-mediated event following gut ischemia. *Arch. Surg.* 1992;127:175-179.
84. Tuma RH, Guice KS, Oldham KT. Endotoxemia and remote organ injury following intestinal reperfusion. *J. Surg. Res.* 1994; 56:571-578.
85. Lee SM, Clemens MG. Effect of α -tocopherol on hepatic mixed function oxidases in hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology* 1992;15:276-281.
86. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am. J. Surg.* 1991;161:488-503.
87. Rice-Evans C, Burdon R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid. Res.* 1993; 32(1): 71-110.
88. Jaeschke H. The inflammatory response after hepatic ischaemia/reperfusion. In *Cell Biology of Trauma*. Eds J. J. 1995; Lemasters & C. Oliver Boca Raton: CRC press. pp.127-147.
89. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG & Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology* 1991;13, 83-95.
90. Frederiks WM, James J, Bosch KS, Schröder MJR & Schuyt HC. A model for provoking ischaemic necrosis in rat liver parenchyma and its quantitative analysis. *Exp. Pathol.* 1982; 22,245-322.
91. Sies H. The use of perfusion of liver and other organs for the study of microsomal electron transport and cytochrome P-450 system. *Meth. Enzymol.* 1978; 51, 48-59.
92. Arthur MJP, Bentley IS, Tanner AR, Saunders PK, Millward-Sadler GH, Wright R. Oxygen-derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology* 1985; 89:1114-1122.
93. Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends. Biochem. Sci.* 1990;15:129-135.

- 94.Koster JF, Biemond P, Stam H. Lipid peroxidation and myocardial ischaemic damage: Cause or consequence? *Am. J. Cardiol.* 1995; 68:253-260.
95. M.J. Girotti, N. Khan: Early Measurement of Systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *The Journal of Trauma.* 1991: Vol: 31 No.1 p. 32-35.
96. Seven A, Candan G. Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu. *Klinik Gelişim* 1995; 8:3906-3911.
97. Bremer C, Bradford BU, Hunt KJ et al. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of hepatic reperfusion injury. *Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol 30)* 1994;267:G630-G636.
- 98.Usami M, Furuchi K, Shiroiwa H, Saitoh Y. Effect of repeated portal-triad cross-clamping during partial hepatectomy on hepatic regeneration in normal and cirrhotic rats. *J Surg Res* 1994;57:541-543.
99. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972; 26:239-257
100. Cohen JJ. Apoptosis: Mechanism of life and death in the immune system. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130:548-554, 1999.
- 101.Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 1980;68:251-306.
- 102.Stewart BW. Mechanisms of apoptosis: Integration of genetic, biochemical, and cellular interactions. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1994; 86:1286-1296.
- 103.Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today* 1993;14:131-136.
- 104.Hockenbery D. Defining apoptosis. *Am. J. Pathol.* 1995;146:16-19.
- 105.Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: Distinct models of cell death with fundamentally different significance. *Pathol. Annu.* 1982;17:229-247.
- 106.Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *AM. J. Pathol.* 1995;146: 3-15.
- 107.Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-1462.
- 108.Gobe GC, Axelsen RA, Searle JW. Cellular events in experimental unilateral ischemic renal atrophy and in regeneration after contralateral nephrectomy. *Lab Invest* 1990; 63:770-779.
- 109.Schumer M, Colombel MC, Swaczuk IS, Globe G, Connor J, O'Toole KM, et al. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am. J. Pathol.* 1992;140:831-838.
- 110.Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, et al. Hypoxia induces

- apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ. Res.* 1994;75:426-433.
111. Itoh G, Tamura J, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Koike M, et al. DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *Am. J. Pathol.* 1995;146:1325-1332.
 112. Linnik MD, Zobrist RH, Hatfield MD. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1993; 24:2002-2009.
 113. MacManus JP, Buchan AM, Hill IE, Rasquinha I, Preston E. Global ischaemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *Neurosci. Lett.* 1993;164:89-92.
 114. Tomniga T, Kure S, Narisawa K, Yoshimoto T. Endonuclease activation following focal ischemic injury in the rat brain. *Brain. Res.* 1993; 608:21-26.
 115. MacManus JP, Hill IE, Huang Z-G, Rasquinha I, Xue D, Buchan AM. DNA damage consistent with apoptosis in transient focal ischaemic neocortex. *Neuroreport.* 1994;5:493-496.
 116. Li Y, Sharov VG, Jiang N, Zaloga C, Sabbah HN, Chopp M. Ultrastructural and light microscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am. J. Pathol.* 1995;146:1045-1051.
 117. Fukuda K, Kojiro M, Chiu J-F. Demonstration of extensive chromatin cleavage in transplanted Morris hepatoma 7777 tissue: Apoptosis or necrosis? *Am. J. Pathol.* 1993;142:935-946.
 118. Searle J, Harmon BV, Bishop CJ, Kerr JFR. The significance of cell death by apoptosis in hepatobiliary disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1987;2:77-96.
 119. Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 1995; 21:1725-1741.
 120. Ikeda K, Kinoshita H, Hirohashi K, Kubo S, Kaneda K. The ultrastructure, kinetics and intralobular distribution of apoptotic hepatocytes after portal branch ligation with special reference to their relationship to necrotic hepatocytes. *Arch. Histol. Cytol.* 1995; 58:171-184.
 121. Borghi-Scoazec G, Scoazec JY, Durand F, Bernuau J, Belghiti J, Feldmann G, Henin D, and Degott C. Apoptosis after ischemia-reperfusion in human liver allografts. *Liver Trans and Surg.* Vol 3, No 4, 1997;407-415.
 122. Bursch W, Paffe S, Putz B, Barthei G, Schulte-Hermann R. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis* 1990;11:847-853.
 123. Noack K, Bronk SF, Kato A, Gores GJ. Bile duct cells are more vulnerable to reoxygenation injury than to anoxia. *Transplantation* 1993;56:495-500.
 124. Charlotte F, L'Hermine A, Martin N, Geleyn N, Nollet M, Gaulard P, et al.

- Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver. *Am. J. Pathol.* 1994;144:460-464.
- 125.Krajewski S, Bodrug S, Krajewska M, Shabaik A, Gascoyne R, Berean K,et al. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 and bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am. J. Pathol.* 1995;146:1309-1314.
 - 126.Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Wang H-G, Irie S, Fong L, et al. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of bcl-X expression. *Cancer Res.* 1994; 54:5501-5507.
 - 127.Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin X-M, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxydant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-251.
 - 128.Shimizu S, Eguchi Y, Kosaka H, Kamiike W, Matsuda H, Tsujimoto Y. Prevention of hypoxia-induced cell death by bcl-2 and bcl-xL. *Nature* 1995; 374:811-813.
 - 129.Jacobson MD, Raff MC. Programmed cell death and bcl-2 protection in very low oxygen . *Nature* 1995;374:814-816.
 - 130.Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267:1449-1456.
 - 131.Hiramatsu N, Katayama K, Mochizuki K, Kawanishi Y, Kasaraha A, et al. Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994;19:1354-1359.
 - 132.Goto M, Kawano S, Yoshihara H, Takei Y, Hijioka T, Fukui H, et al. Hepatic tissue oxygenation as a predictive indicator of ischemia-reperfusion liver injury. *Hepatology* 1992;15:432-439.
 - 133.Benedetti A, Jezequel A-M, Orlandi F. A quantitative evaluation of apoptotic bodies in rat liver. *J. Hepatol.* 1988; 8:172-177.
 134. Benedetti A, Jezequel A-M, Orlandi F. A quantitative evaluation of apoptotic bodies in rat liver. *J. Hepatol.* 1988;8:172-177.
 - 135.Kerr JFR. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysozomes. *J. Pathol.* 1965;90:419-423.
 - 136.Scothorne RJ, MacSween RNM. The streaming liver: A slow, divided flow? *Hepatology* 1986; 6:1050-1052.
 - 137.De La Monte SM, Arcidi JM, Moore GW, et al: Midzonal necrosis as a pattern of hepatocellular injury after shock. *Gastroenterology* 1984; 86: 627
 138. Shibayama Y, Asaka S, Nishijima A: Mechanism of liver injury following ischemia. *Exp. Mol. Pathol.*1991; 55: 251
 139. Marotto ME, Thurman RG, Lemasters JJ: Early midzonal cell death during low-flow hypoxia in the isolated, perfused rat liver: protection by allopurinol. *Hepatology* 1988; 8: 585

140. Suzuki S, Nakamura S, Koizumi T, et al: The beneficial effect of a prostaglandin I₂ analog on ischemic rat liver. *Transplantation* 1991; 52: 978
141. Suematsu M, Tsuchiya M. Microtopographic analysis of oxidative stress in organ microcirculatory units. *Adv. Exp. Med. Biol.*1992; 316: 211
142. Suematsu M, Suzuki H, Ishii H, et al: Topographic dissociation between mitochondrial dysfunction and cell death during low-flow hypoxia in perfused rat liver. *Lab. Invest.*1992; 67: 434
143. Suzuki H, Suematsu M, Ishii H, et al: Prostaglandin E₁ abrogates early reductive stress and zone-specific paradoxical oxidative injury in hypoperfused rat liver. *J. Clin. Invest.*1994; 93: 155
144. Straatsburg IH, Frederiks WM: In situ analysis of ischemia/reperfusion injury in rat liver studied in three different models. *Int. J. Exp. Pathol.*1997; 78: 149
145. Kato Y, Tanaka J, Koyama K: Intralobular heterogeneity of oxidative stress and cell death in ischemia-reperfused rat liver. *J. Surg. Res.*2001; 95: 99
146. Topaloglu S, Abbasoglu O, Ayhan A, et al: Antiapoptotic and protective effects of roscovitine on ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Liv. Int.*2003; 23: 300
147. McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.*1985; 312: 159
148. Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PR. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003;125; 917-936
149. Badia JM, Ayton LC, Evans TJ, et al. Systemic cytokine response to hepatic resections undertotal vascular exclusion. *Eur. J. Surg.*1998; 164: 185
150. Topaloglu S, Izci E, Ozel H, et al: Effects of TVE application during 70% hepatectomy on regeneration capacity of rats. *J. Surg. Res.* 2005; 124: 139
151. Darilmaz G, Topaloglu S, Topaloglu E, et al: Evaluation of liver damage after application of TVE in the rat model. *Transplant. Proceed.* 2005, 37: 4550
152. Hiratsuka K, Kim YI, Nakashima K, et al: Tissue oxygen pressure during prolonged ischemia of the liver. *J. Surg. Res.*2000; 92: 250
153. Köckerling F, Schneider C, Scheuerlein H, et al: Intrahepatic vascular anatomy of the liver after regeneration. In: Köckerling, F., and Schwartz, S.I., (Eds.), *Liver Surgery, Operative Techniques and Avoidance of Complications*. Heidelberg: J.A. Barth, 2001. Pp 47-50.
154. Belinsky SA, Popp JA, Kaufmann FC, et al: Trypan blue uptake as a new method to investigate hepatotoxicity in periportal and pericentral regions of the liver lobule: studies with allyl alcohol in the perfused liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*1984; 230: 755
155. Travis DL, Fabia R, Netto GG, et al: Protection by cyclosporine A against normothermic liver ischemia-reperfusion in pigs. *J. Surg. Res.*1998; 75: 116

156. Leers MP, Kölgen W, Björklund V, et al: Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J. Pathol.* 1999;187: 567
157. Nishikimi M, Rao NA, Yagi K: The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulphate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*1972; 46: 849
158. Ueda M, Mozaffar S, Tanaka A: Catalase from *Candida boidinii* 2201. *Methods Enzymol.*1990; 188: 463
159. Akerboom TPM, Sies H: Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 1981; 77: 373
160. Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB: Glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.*1974; 25: 7130
161. Lim SP, Andrews FJ, Christophi C, et al: Microvascular changes in liver after ischemia-reperfusion injury. *Dig. Dis. Sci.*1994; 39: 1683
162. Hakamada K, Sasaki M, Takahashi K, et al: Sinusoidal flow block after warm ischemia in rats with diet-induced fatty liver. *J. Surg. Res.*1997; 70: 12
163. Straatsburg IH, Frederiks WM: In situ analysis of ischemia/reperfusion injury in rat liver studied in three different models. *Int. J. Exp. Pathol.*1997; 78: 149
164. Branum GD, Selim N, Liu X, et al: Ischemia and reperfusion injury of rat liver increases expression of glutathione S-transferase A1/A2 in zone 3 of the hepatic lobule. *Biochem. J.*1998; 330: 73
165. Young CS, Palma JM, Mosher BD, et al: Hepatic ischemia/reperfusion injury in p-selectin and intercellular adhesion molecule-1 double mutant mice. *Am. Surg.*2001; 67: 737
166. Sunose Y, Takeyoshi I, Ohwada S, et al: The effect of cyclooxygenase-2 inhibitor FK3311 on ischemia-reperfusion injury in a canine total hepatic vascular exclusion model. *J. Am. Coll. Surg.*2001; 192: 54
167. Heijnen BHM, Straatsburg IH, Kager LM, et al: Effect of in situ hypothermic perfusion on intrahepatic pO₂ and reactive oxygen species formation after partial hepatectomy under total hepatic vascular exclusion in pigs. *Liver Int.*2003, 23: 19
168. Hiratsuka K, Kim YI, Nakashima K, et al: Tissue oxygen pressure during prolonged ischemia of the liver. *J.Surg. Res.*2000; 92: 250
169. Jungraithmayr W, Szarzynski M, Neeff H, et al: Significance of total vascular exclusion for hepatic cryotherapy: an experimental study. *J. Surg. Res.*2004; 116: 32