T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

DENEYSEL
AKUT HEPATİK İSKEMİ-REPERFÜZYON YARALANMASINDA EVEROLİMUS'UN OKSİDAN-ANTİOKSİDAN SİSTEM VE HEPATİK HİSTOLOJİ ÜZERİNE ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. BAHAR GÜRLEK DEMİRCİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. MEHMET CİNDORUK

ANKARA–2009

TEŞEKKÜR

İç Hastalıkları uzmanlık eğitimim boyunca yakın destek ve ilgilerini gördüğüm, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Şükrü Sindel başta olmak üzere tüm saygıdeğer hocalarıma;

Tez çalışmalarımda katkılarından ve desteğinden dolayı tez hocam Prof. Dr. Mehmet Cindoruk'a, çalışmamın planlanması aşamasındaki desteği nedeni ile Prof. Dr. Aydın Dalgıç'a, çalışmamın istatistik ve deney aşamalarında emekleri geçen Uz. Dr. Mehmet Derya Demirağ ve Op. Dr. Utku Tonguç Yılmaz'a ve değerli asistan arkadaşlarıma;

Bugüne kadar her zaman sevgi ve sonsuz destekleri ile yanımda olan aileme ve sevgili eşim Umut Demirci'ye en içten dileklerimle teşekkür ediyorum.

Dr.Bahar Gürlek Demirci

İÇİNDEKİLER

1. SİMGELER VE KISALTMALAR i
2. ŞEKİLLER, GRAFİKLER VE TABLOLAR ii
3. GİRİŞ VE AMAÇ 1
4. GENEL BİLGİLER 2
4.1. Karaciğer Anatomisi ve Histolojisi 2
4.2. Karaciğerin Başlıca Fonksiyonları 5
4.3. Akut Karaciğer Yetmezliği 6
4.4. İskemi-Reperfüzyon Hasarı 8
4.4.1. İskemik karaciğer Hasarı 8
4.4.2. Reperfüzyon Hasarı 8
4.4.3. İskemi-Reperfüzyon Patofizyolojisi 9
4.4.4 İskemi-Reperfüzyon Hasarının Moleküler Yönleri 22
4.4.5. Hepatik İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve Transplantasyon Cerrahisi 23
4.5. mTOR ve mTOR İnhibtörü: Everolimus 25
5. GEREÇ VE YÖNTEM 28
5.1. Biyokimyasal İnceleme Yöntemleri 30
5.1.1. Serum AST, ALT, Albumin Analizi 30
5.1.2. Serum IL-6 ve TNF-Alfa Analizi 30
5.1.3. Doku MDA Analizi 31
5.1.4. Doku SOD Analizi 31
5.2. Histopatolojik İnceleme Yöntemleri 31
5.3. İstatistiksel Analiz 32
6. BULGULAR 33
7. TABLOLAR 39
8. TARTIŞMA VE SONUÇ 47
9.ÖZET 57
10.SUMMARY 59
11.KAYNAKLAR 61

1. SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP	Adenin Difosfat
AMP	Adenin Monofosfat
AP	Aktivatör Protein
Ark.	Arkadaşları
ATP	Adenin Trifosfat
Ca	Kalsiyum
CINC	Sitokin ilişkili Nötrofil Kemoatraktan
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EH	Endotelyal Hücre
ENA	Epitelyal Nötrofil Aktive Protein
FKBP	FK 506 bağlayan protein 12
FRB	Rapamisin Bağlayıcı Bölge
Gp	Glikoprotein
ICAM-1	Intraselüler adezyon molekülü- 1
IPC	Ischemik preconditioning (İskemik Ön Hazırlık)
İ/R	İskemi/ Reperfüzyon
KC	Karaciğer
KH	Kupfer hücresi
MCP	Monosit Kemoatraktan Protein
MIP	Makrofaj İnflamatuar Protein
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Hidrojen
NF-k β	Natural faktör kappa-beta
NO	Nitrik Oksid
NOS	Nitrik Oksid Sentetaz
PAF	Platelet Aktive Edici Faktör
PDK	Fosfotidilinozitol bağımlı kinaz-1
PECAM	Platelet Endotelyel Hücre Adezyon Molekülü
PF	Platelet Faktör
PIKK	Fosfoinozitol Kinaz İlişkili Kinaz
PIP	Fosfoinozitol Fosfat
PI3K	Fosfoinozitol- 3- Kinaz
SEC	Sinuzoidal Endotelyal Hücre
SOD	Süperoksid Dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör- alfa
TSK	Tuberoz Skleroz Kompleksi

2. ŞEKİLLER, GRAFİKLER VE TABLOLAR

Şekil 1. Karaciğer lobulünün şematik yapısı

Şekil 2. Karaciğer lobül zonlarının şemaik görünümü

Şekil 3. mTOR aktivasyonu

Grafik 1. Ortalama ALT değerlerinin gruplara göre dağılımı

Grafik 2. Ortalama TNF-α değerlerinin gruplara göre dağılımı

Grafik 3. Ortalama IL-6 değerlerinin gruplara göre dağılımı

Grafik 4. Ortalama ALT değerlerinin gruplara göre dağılımı

Grafik 5. Ortalama SOD değerlerinin gruplara göre dağılımı

Tablo 1. Çalışma gruplarına ait elde edilen tüm veriler

Tablo 2. Çalışma grupları ve sonuçlar

Tablo 2. CER, İR ve CER/İR grupları arasında çalışma testlerinin istatistiksel analizleri

Tablo 3. Veriler arasında bağlantı katsayısı ve p değeri arasındaki orantı

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı karaciğer cerrahisi sonrası meydana gelen hepatoselüler yaralanmanın en önemli nedenlerindendir. Transplantasyon cerrahisinde başarıyı belirleyen faktörlerden birisi de antijenden bağımsız olması nedeni ile de önem taşıyan operayonlar sırasında yaşanan İ/R hasarıdır. Bu olay karaciğer transplantasyonunun %10- 20 oranında ciddi hepatik yetmezlik, akut-kronik rejeksiyon, erken retransplantasyon ve ölümle sonuçlanmasına neden olabilmektedir (5/29). İskemik süreç sırasında hücresel düzeyde oksidatif fosforilasyonda azalma, ATP'nin tüketilmesi ve kalsiyum dengesinde bozulma gibi pek çok değişiklik meydana gelmektedir. ATP katabolizmasının olumsuz etkilerine; reaktif oksijen radikalleri, sitokinler, adezyon molekülleri ve vazoaktif ajanlar gibi bazı maddelerin salınımı da katkıda bulunmaktadır.

Everolimus, etkisini mTOR'u etkisizleştirerek göstermektedir. mTOR, hem hücre büyümesini hem de hücre döngüsünü düzenleyen bir serin treonin kinazdır ve hipoksi varlığında oluşan sinyaller ile aktive olmaktadır.

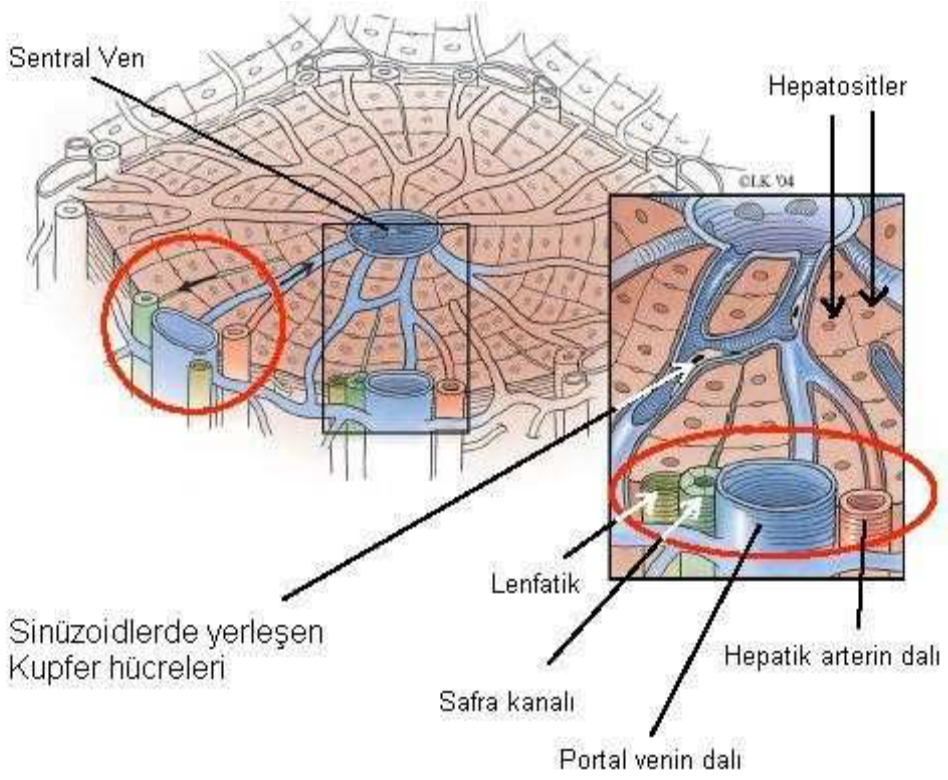
Hepatik İ/R hasarına karşı koruyucu mekanizmalarının bilinmesi ve önlenmesi transplantasyon cerrahisinin başarısını arttırmak açısından büyük önem taşımaktadır. Biz bu çalışmada makrolid grubu bir antibiyotik olan, böbrek ve kalp transplantasyonunda immunsupresif etkinliği nedeni ile de kullanılan everolimusun hepatik İ/R hasarından koruyucu etkinliğini araştırdık.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. KARACİĞER ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Karaciğer vücut ağırlığının yaklaşık % 2' sini oluşturur. Glisson kapsülü adı verilen bir bağ doku kapsülü ile örtülüdür. Karnın sağ üst kadranında diyaframa yaslanmış olarak bulunur ve sol üst kadrana kadar uzanım gösterir. Ligamentöz yapılar ile diyafram, periton, büyük damarlar ve üst gastrointestinal organlara tutunur. Kanlanması %20 oranında hepatik arter, % 80 oranında portal ven aracılığı ile sağlanır (1).

Karaciğerin en küçük fonksiyonel birimi lobüldür ve lobülün asıl yapısını oluşturan hücreler ise hepatositlerdir. Hepatositler karaciğer lobülü içerisinde ışınsal olarak dizilmişlerdir ve biri diğerinin üzerinde olacak şekilde kordonlar yaparak, portal mesafeden santral vene doğru uzanırlar. Bu kordonlar (Remarck kordonları) arasındaki mesafe sinüzoid olarak adlandırılır, burada portal alanlardan santral vene doğru kan akımı mevcuttur. Sinüzoidler fenestralı bir bazal membrana oturmuş endotelyal hücreler ile çevrilidir. Hepatositlerin bazolaterali ile sinuzoidler arasındaki potansiyel boşluğa disse aralığı denir ki bu boşlukta besinlerin, proteinlerin ve diğer moleküllerin aktif ve pasif olarak hücreye alımı sağlanır. Hepatositlerin apikal bölgesinde safra komponentlerinin sekrete edildiği kanikuler membran bulunmaktadır (2- 4).

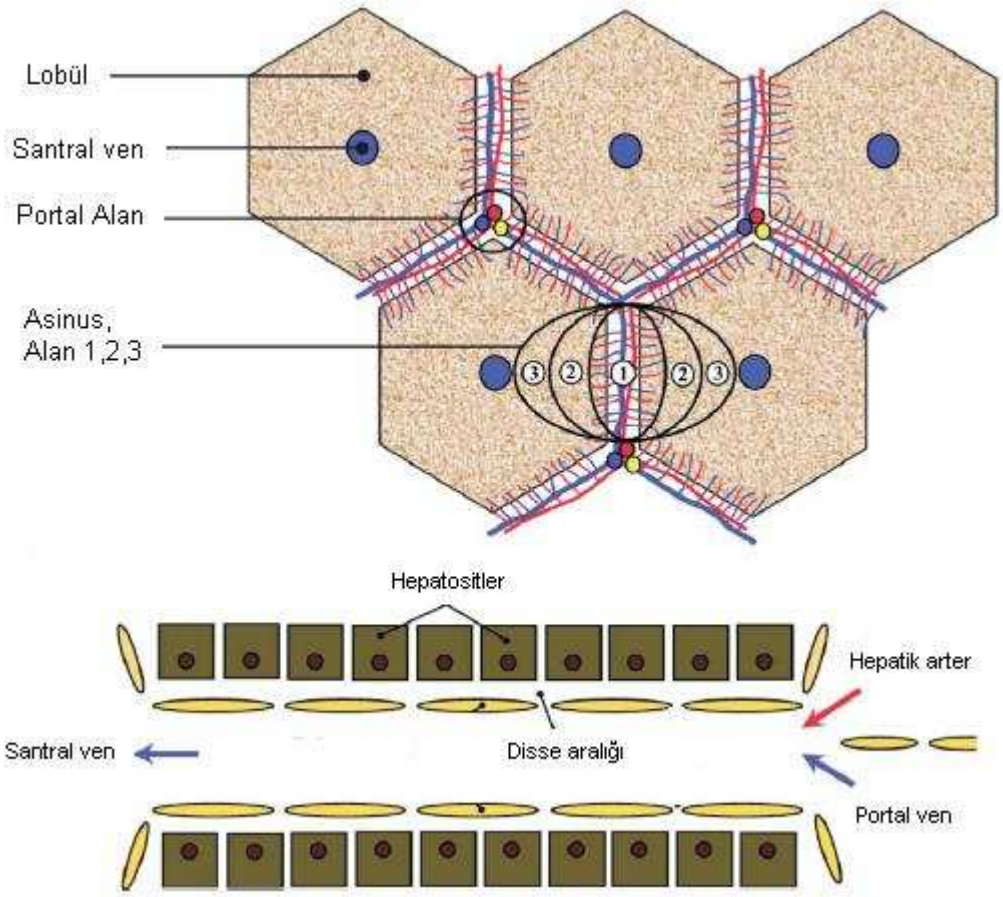


Şekil 1: Karaciğer lobulünün şematik yapısı (1)

Karaciğerde hepatositler dışında kupfer hücreleri (retikuloendotelyel sistemin üyeleridir), stellat hücreler (ito = yağ depolayan hücreler), endotelyal hücreler, safra kanal hücreleri ve destek hücreler bulunmaktadır. Kupfer hücreleri genellikle sinuzoidal vaskuler boşlukta yer alan makrofajlardır.

Portal alan; venül, arteriol, safra kanalı sisteminin bir parçası, lenfatik ve bu yapıları destekleyen bağ dokudan oluşur. Asinus ise portal alan ile komşu santral ven arasında kalan üçgen şeklinde bir birimdir Hepatik asinüs modeli; kanın arteriyel ve portal venöz damarlar ile karaciğer parankimine ulaşıp, kordonlar biçiminde dizilen hepatositlerce işlendikten sonra terminal hepatik venüllere

(lobüler modele göre vena centralis olarak adlandırılırlar) dökülmesi temel alınarak oluşturulmuştur. Bu model, hepatositleri, bol oksijenli kandan yararlanma derecelerine göre üç alanda (zon) gruplandırır. En iyi kanlanan periportal alan "alan 1", en az kanlanan perivenüler alan "alan 3", iki alan arasında kalan alan da "alan 2"olarak adlandırılır. İskemik olaylardan en çok üçüncü alandaki hepatositlerin etkilenmeleri bu modelle kolayca açıklanabilmektedir (şekil2).



Şekil 2. Karaciğer lobül zonlarının şemaik görünümü (5).

4.2. KARACİĞERİN BAŞLICA FONKSİYONLARI

4.2.1 Metabolizma ile ilgili fonksiyonları; Karbonhidat metabolizması ile ilgili fonksiyonları glikojenin depo edilmesi ve glikojenoliz, glukoneogenez, glukozun pentoz fosfat yolunda yıkımı, galaktoz ve fruktozun glukoza dönüştürülmesi, glukozun diğer monosakkaritlere ve yağa dönüştürülmesidir. Lipidler üzeinde, yağ asitlerinin sentezi ve oksidasyonu, yağ asitlerinden trigliserid oluşumu, fosfolipid, lipoprotein, keton cisimleri ve kolesterol sentezi, safra asitlerinin ve tuzlarının oluşturulmasından sorumludur. Aminoasit metabolizması ile ilgili fonksiyonları, deaminasyon, transaminasyon, endojen aminoasitlerin ve plazma proteinlerinin sentezi, üre, ürik asit, kreatinin, porfirin ve safra asidi sentezidir (6).

4.2.2. Bilirubin metabolizması ile ilgili fonksiyonları; Bilirubinin oluşturulması, hücreye alınması, konjugasyonu ve atılıması.

4.2.3. Hematolojik ve İmmmunolojik fonksiyonu; Pıhtılaşma faktörlerinden faktör I, II, VII ,IX, X sentezi, hemoglobinin yıkımı, fagositoz ve antikor oluşumundan sorumludur.

4.2.4. Ekskresyon ve detoksifikasyon fonksiyonu; Aminoasitler karaciğerde deamine edilirler, açığa çıkan amino grubu amonyağa dönüştürülür, amonyak da üreye çevrilir. Kolesterol değişmeden ya da safra asitlerine dönüştürülerek safraya atılır. Steroid hormonlar karaciğerde metabolize edilirler. Çoğu ilaçlar karaciğerde p 450 enzim sistemi tarafından metabolize ve inaktive edilirler.

4.2.5. Depolama fonksiyonu; Glikojen, demir ve bakır, vitamin D'nin ve vitamin B12 'nin depolanmasından sorumludur (6).

4.3. AKUT KARACİĞER YETMEZLİĞİ

Akut karaciğer yetmezliği; öncesinde bilinen karaciğer hastalığı olmayan kişilerde hepatik disfonksiyonla karakterli nadir fakat mortal bir klinik sendromdur (7,8). Nedenleri arasında viral hepatitler, ilaç ilişkili ve toksin ilişkili karaciğer hastalıkları, metabolik ve iskemik nedenler yer almaktadır. Erişkinlerin % 15'inde, pediyatrik yaş grubunun ise % 50'sinde etyoloji saptanamamaktadır.

Akut karaciğer yetmezliği tanısındaki klinik işaretler; sarılık (serum bilirubin >5 mg/dl) koagulopati (INR>1.5), dört hafta içerisinde gelişen asit ve/veya ensefalopati ve daha önce karaciğer hastalığının bulunmaması olarak tanımlanabilir (9).

Current United Network for Organ Sharing (UNOS) kriterlerine göre prognozu; sekiz hafta içerisinde gelişen ensefalopati, önceden bilinen karaciğer hastalığının olmaması, yaşam beklentisinin yedi günden kısa olması, yoğun bakım ünitesinde mekanik ventilasyon ihtiyacının olması, diyaliz gereksinimi olması ya da ciddi koagulopatinin (INR>2) varlığı belirlemektedir. Hastalık ciddiyetini gösteren bir diğer kriter de son dönem KC hastalığı skorlamasıdır (MELD) (10).

Akut karaciğer yetmezliğinde mortalite %80'e kadar ulaşmaktadır. Başlıca ölüm nedenlerini serebral ödem ve sepsis oluşturmaktadır. Diğer nedenler arasında mekanik ventilasyon gerektiren solunum yetmezliği, akut böbrek yetmezliği, bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar sayılabilir. Koagulopati mortalitesi yüksek bir komplikasyon olmasına rağmen genellikle tedaviye yanıt vermektedir.

Akut karaciğer yetmezliğinin tedavisi hepatolog, transplantasyon cerrahı ve yoğun bakım ünitesinin desteğinin gerektiği multidisipliner bir yaklaşım ile olmalıdır

(11). Tedavide asetaminofen toksisitesinde N-asetil sistein, otoimmun hepatitte steroid, Wilson Hastalığı'nda plazmaferez ve antioksidan tedavi, hepatit B'de lamivudin veya enrakavir, HSV enfeksiyonunda asiklovir gibi medikal seçenekler bulunmaktadır (12-15). Ayrıca Budd-Chiari sendromunda uygulanan dekompresif cerrahi ya da transjuguler intrahepatik portosistemik şant (TIPS) 'da olduğu gibi cerrahi tedavi seçenekleri de bulunmaktadır. Ancak kesin olarak etkinliği kanıtlanmış tek tedavi seçeneği karaciğer transplantasyonudur. KC yetmezliğinde nakil sonrası yaşam oranları %61-63 arasında değişmektedir (16). Akut KC yetmezliği nedeni ile nakil yapılan olguların yaş ortalamaları elektif nakillere göre daha küçüktür (28 & 44 yaş). Nakil sonuçlarını belirleyen faktörler arasında yaş, karaciğer yetmezliğinin nedeni, böbrek fonksiyon testleri, asidoz, APACHE III skoru bulunmaktadır. Genç yaş, Wilson hastalığı'na bağlı KC yetmezliği ve serum kreatinin düzeyinin normal sınırlarda olması nakil sonrası başarı şansını arttırmaktadır (17). Akut karaciğer yetmezliği ya da kronik hepatite bağlı son dönem karaciğer yetmezliğinde yapılan transplantasyonun başarı oranları benzerdir. Transplant sonrası sağ kalım ilk bir yılda azalırken, dördüncü yılın sonunda sağkalım oranları aynı olmaktadır. Asetaminofen ve viral hepatit ilişkili akut yetmezlikte transplant sonrası sağkalım sonuçları diğer nedenlere oranla daha yüz güldürücü olmaktadır (18).

4.4. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI

4.4.1. İSKEMİK KARACİĞER HASARI

İskemik ve hipoksik karaciğer hasarı oksijenin tam ya da kısmi eksikliği sonucu ortaya çıkmaktadır. Karaciğer dokusu iskemik hasara, organın transplantasyon cerrahisi için saklanması, allograftta gelişen hepatik arter trombozu, karaciğer rezeksiyonunda portal vaskuler akımın kesilmesi (pringle manevrası) ya da damar reanastomozu sırasında maruz kalmaktadır (19,20).

Hipoksik karaciğer hasarı ise, hipotansif ataklar ve şok durumlarında olabileceği gibi alkolik karaciğer hastalıklarında da görülebilmektedir (21,22).

İskemik hasarın başlıca mekanizmaları, mitokondriyel fonksiyon kaybı, ATP'nin yıkımı ve hipotermidir. Hipotermi, dokularda metabolik hızı arttırır ve anoksik hücrelerin metabolik fonksiyonlarını korumaları için gereken süreyi uzatır. Hipotermi her ne kadar organın korunması için kullanılsa da hipoksiden bağımsız olarak hücrelere Na ve Cl akışını sağlayarak hasara neden olmaktadır (20,23)

4.4.2. REPERFÜZYON HASARI

Reperfüzyon hasarı kısa iskemi süreci için sorun oluşturmasa da uzun süren iskemilerde ciddi hasara neden olabilmektedir. Reperfüzyon ile hepatik ve ekstrahepatik mekanizmalarla olan iskemi sürecinde oluşan hücre hasarı artmaktadır. Hepatik olarak kanıtlanmış en önemli mekanizma kupfer hücre aktivasyonudur. Erken reperfüzyon hasarında sıcak ve soğuk iskemi sonrasında kupfer hücreleri reoksijenizasyon ile aktive olmaktadır (24-28). Aktive kupfer hücreleri; serbest oksijen radikalleri, tümör nekrozis faktör alfa (TNF-α) ve

interlökin (IL) salınımına, proteaz ve transkripsiyon faktör aktivatör protein (AP-1) aktivasyonuna ve lipid peroksidasyonuna neden olarak mikrodolaşımı bozmakta ve hücreyi apopitoza uğratmaktadır. Kupfer hücre aktivasyonu ve vaskuler inflamasyon, endotoksinler gibi ekstrahepatik mekanizmalar ile de arttırılabilmektedir. Dalak ise hepatik reperfüzyon hasarına karşı koruyucu bir organdır. Bu hipotez splenektomi sonrası artan TNF-α ile karaciğerin reperfüzyon hasarından korunduğunu gösteren çalışmalar ile desteklenmiştir (29).

4.4.3. İSKEMİ – REPERFÜZYON PATOFİZYOLOJİSİ

Bir organın kan akımının kesilmesi olarak bilinen iskemi, cerrahi işlemler sırasında görülür ve dokuların ihtiyacı olan oksijenin ve besin kaynağının da kesilmesi anlamına gelir. Karaciğer cerrahisinde büyük hepatik tümörler, hepatik travmanın düzeltilmesi, vasküler rekonstrüksiyonlar, transplantasyon gibi durumlarda iskemik süreç daha da uzamaktadır. Reperfüzyon ile kan akımı ve oksijen desteği tekrar sağlandığında iskemik periyotta oluşmuş olan hasar daha da artmaktadır. İskemi reperfüzyon hasarı olarak adlandırılan bu durum karaciğer cerrahisi ve transplantasyonunda karaciğer dokusunun yaşadığı süreçleri içeren bir fenomendir. İskemik periyot sırasında hücresel düzeyde, oksidatif fosforilasyonda azalma, ATP'nin tüketilmesi ve kalsiyum dengesinde bozulma gibi pek çok değişiklik meydana gelmektedir. ATP katabolizmasının olumsuz etkilerine; reaktif oksijen radikalleri, sitokinler, adezyon molekülleri ve vazoaktif ajanlar (endotelin ve tromboksan A_2) gibi bazı maddelerin salınımı da katkıda bulunmaktadır. Nitrik oksid (NO), prostosiklin gibi sitoprotektif ajanların

düzeyinde azalma ile bu etki artırılarak hem nekroz hem de apopitoza bağlı olarak hepatik hücre ölümü gerçekleşmektedir (30)

***Mikrodolaşım Yetmezliği*:** İskemi-reperfüzyon modelinde meydana gelen değişikliklerde birçok farklı ve kompleks mekanizma rol oynamaktadır. Reperfüzyonun erken evrelerinde sinüzoidlerde endotelyal hücrede şişme (31), vasokonstriksiyon (32), lökosit adezyonu (33-34) ve platelet agregasyonu (35) dolaşımın bozulmasına neden olmaktadır. Aktif transmembran transportunu sağlayacak enerji substratı eksikliği, kupfer hücresi (KH) ve endotelyal hücrede (EH) ödeme neden olmaktadır. NO ve endotelin arasındaki dengenin endotelin lehine bozulması vasokonstrüksiyona, sinuzoidal lümenin daralmasına ve lökositlerin kapiller duvara göç etmesine neden olmaktadır. Lökosit ve EH ilişkisinin artması da lökotaksis ile sonuçlanmaktadır (36). Lökositler sinuzoid lümenini tamamen kapatamasalar bile hepatik dolaşımın bozulmasına katkıda bulunurlar (37). Bu olaylar reperfüzyon sonrasında da karaciğerin iskemik kalmasını sağlayarak hipoksik periyodun uzamasına neden olmaktadır (38,39,40). Dolaşım yetmezliğine ek olarak KH ve nötrofil aktivasyonu da iskemik hasarın şiddetini arttıran inflamatuar sitokinlerin yapımını sağlarlar. İ/R sırasında salınan sitokinlerin başlıcaları TNF-α , IL-1, IL-6, prostoglandinler ve superoksid gibi serbest oksijen radikalleridir (41-47).

Sonuçta klinikte NO sentezinde artış ya da endotelin sentezinde azalma ile İ/R hasarının ciddiyetinde azalma sağlanacağı düşünülmektedir.

***Kupfer Hücreleri (KH)*:** Kupfer hücreleri sinuzoidlerde dağınık olarak bulunan fonksiyonunu yitirmiş eritrositleri fagosite eden retikuloendotelyel sisteme ait önemli bir hücre grubudur. Aktive olduklarında proinflamatuar (TNF-α, IL-1, IL-6, prostoglandinler) ve antiinflamatuar (IL-10, IL-13) sitokinlerin ve serbest oksijen radikallerinin (SOR) salınımına neden olurlar (48,49,50,51). Elektron mikroskobi çalışmaları ile rat modelinde reperfüzyonun erken evrelerinde kupfer hücre aktivasyonu morfolojik kanıtlar ile gösterilmiştir. (48). Benzer şekilde karaciğerde reperfüzyon hasarının kupfer hücre aktivitesini baskılayan gadolinyum klorid ve karbonmonoksid ile azaldığı ve tersine kupfer hücre aktivitesini arttıran lateks partikülleri ile de arttığı bilinmektedir (52).

Kupfer hücreleri hepatik transplantasyon sonrası yaşanan İ/R hasarında da önemli rol oynar. Soğuk iskemik süreçte bekler ve reperfüzyonda aktive olurlar (30). Reperfüzyon gerçekleştikten sonra kupfer hücrelerinde progresif olarak yuvarlanma "rounding", dağılma "ruffling", kutuplaşma ve degranulasyon meydana gelmektedir (53,54,55). Sonuçta kupfer hücre aktivitesinin ayarlanmasının transplantasyon cerrahisinde İ/R hasarının azaltılmasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir.

***Nötrofiller*:** Aktive olmuş nötrofiller SOR ve bazı proteazların salınımı ile İ/R hasarını engellerler. Her ne kadar nötrofiller, reperfüzyonun erken evrelerinde karaciğerde birikmeye başlasalar da reperfüzyonun ilk beş saatine yani geç faza kadar aktive olamazlar (33).

Nötrofillerin sinuzoidal endotelyal hücreye (SEH) adezyonu adezyon moleküleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. L-Selektin, kan akımı kesildiğinde hücreyi ölüme

götüren nötrofiller üzerinde bulunan bir reseptördür. Nötrofiller aktive olduğunda beta-integrin reseptörleri artar ve L-Selektinler membrana yayılır (56).

Intraselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) endotelyal hücreler üzerinde bulunan immunglobulin ailesinden bir moleküldür ve beta-integrinlerin önemli bir parçasıdır. ICAM-1 düzeyindeki artış TNF-α ve IL-1 gibi proinflamatuar ve immunoregulatuar sitokinler tarafından sağlanmaktadır (57). Dolayısı ile İ/R hasarında karaciğerde ICAM-1 salınımında artış gözlenmesi beklenen bir sonuçtur (58,59). ICAM-1'i hedef alan antikorlar hızla post-sinüzoidal venüllerdeki lökositlerin iskemi sonrası damar duvarına yapışmasını azaltır ve hepatik hasarı düzeltirler (60,61). Yapılan rat çalışmalarında L-Selektin ve ICAM-1 düzeyleri eksik ratlarda daha az İ/R hasarı olduğu gözlenmiştir (34,61). Tersine Anti ICAM-1 antikoru verilen ratlarda ortotopik KC transplantasyonunda ve yağlı karaciğerde görülen İ/R hasarında azalma gözlenmiştir (62,63). Ayrıca karaciğer transplantasyonunda reperfüzyonun erken evrelerinde salınan ICAM-1 düzeyi ile akut rejeksiyon arasında da güçlü bir ilişki olduğu bilinmektedir (64,65).

***Plateletler*:** Plateletler karaciğer rejenerasyonunda rol oynadıkları gibi İ/R hasarında da hepatik sinuzoidlere yapışarak transplante organda reperfüzyon sürecinde programlı endotelyel hücre ölümünü gerçekleştirirler (66,67).

***Sitokinler*:** Sitokinler İ/R hasarında inflamatuar yanıtın başlatılması ve sürdürülmesinde önemli role sahiptirler (68,69). Bu etkilerini otokrin, parakrin ve endokrin yollarla, diğer sitokinler, kemokinler ve eikonazoidler gibi diğer inflamatuar medyatörlerin üretimi aracılığı ile sağlarlar (70).

TNF-α, IL-1, IL-6 ve IL-8'in geniş proinflamatuar ve IL-10'un zayıf antiinflamatuar etkinlikleri vardır (71,72).

TNF-α ve IL-1, hepatik İ/R hasarında rol oynayan IL-8 sentezini ve adezyon moleküllerinin (selektinler ve beta integrinler gibi) salınımnı arttırarak lökosit ile sinuzoidal endotelyal hücre etkileşimini sağlayan iki önemli sitokindir (57,73,73,74).

Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF-α): TNF-α farklı hücre tiplerinden inflamatuar ve immunmodulatör uyarıya yanıt olarak salınan pleiotropik bir sitokindir. Biyolojik etkinliği hücre rejenerasyonunu başlatmaktan hücre ölümüne kadar çok geniş spektrumludur. Tam olarak hepatoselüler hasardaki rolü bilinmese de mitokondriye direk toksik etkisi ve apopitotik ve nekrotik hücre ölümünü uyarması yoluyla olabileceği düşünülmektedir (75-77). Sitotoksik etkinin bir nedeni de SOR'un oluşturulmasıdır. Dolaşımda bulunan TNF-α, kupfer hücrelerinden daha fazla TNF-α üretilmesini sağlamakta (78,79), artan TNF-α da, epitelyal nötrofil aktive protein 78 (ENA 78) olarak adlandırılan ve nötrofil kemotaksisi ile aktivasyonunda önemli rol oynayan kemokini (80) ve kupfer hücrelerinin SOR üretimini uyarmaktadır (74).

Ciddi bir ameliyata bağlı doku travması veya enfeksiyonlar sonucu oluşan inflamatuar kompleks proinflamatuar sitokin döngüsünün başlamasına neden olmaktadır. Bu sitokinler arasında TNF-α, konakçı cevabının oluşumuna yol açan ilk ve en güçlü mediyatörlerden birisidir. TNF-α sentezinin kaynağı, özellikle periton ve splanknik dokularda bulunan monositler, makrofajlar ve T hücreleridir.

Akut travmaya cevap olarak salınan TNF-α'nın etkisi hızlı ve kısa sürelidir. Endotoksin uyarısı ile akut inflamatuar cevap gelişimini taklit eden deneylerde TNF-α'nın monofazik bir eğri izlediği, 90 dakikada pik yapıp 4 saat içerisinde ölçülemeyecek düzeye indiği saptanmıştır. Yarı ömrü 15 -18 dk. olmasına rağmen, TNF-α'nın kısa süreli ortamda bulunması bile önemli metabolik ve hemodinamik değişikliklerin gelişmesine ve döngünün ileri kısmındaki sitokinlerin aktive olmasına neden olmaktadır. TNF-α üretiminin kısa sürmesi, ortamda regüle edilemeyecek kadar çok TNF-α aktivitesinin oluşmasını engelleyen etkili endojen mediatörlerin olduğuna işaret etmektedir. TNF-α yapımını ve aktivasyonunu engelleyen birçok doğal mekanizma bulunduğu gösterilmiştir. Bu mekanizmalardan birisi de dolaşımda bulunan transmembranöz TNF reseptörlerinin (solubl TNF reseptörleri = sTNFR) endojen inhibitörleridir. Bu reseptörlerin yarışmalı olarak dolaşımda bulunan fazla TNF-α'yı uzaklaştırarak koruyucu rol oynadıkları sanılmaktadır. TNF-α ayrıca, stres sırasında kas katabolizması ve kaşeksi üzerine de önemli etkileri olan bir sitokindir. İskelet hücresinde bulunan aminoasitler hepatik dolaşımdaki döngüler aracılığı ile enerji metabolizmasında kullanılırlar. TNF-α'nın diğer fonksiyonları arasında; koagülasyon aktivasyonu, prostaglandin E2, platelet aktive edici faktör (PAF), glukokortikoidler ve eikozanoidlerin salınımının arttırılması sayılabilir (81).

IL-1 ve IL-6: İskemi-reperfüzyon hasarının ikinci saatinde in vitro olarak kupfer hücrelerinde görülen IL-6 artışı in vivo olarak da gerçekleşmekte ancak bu artış TNF-α ve IL-1'e göre daha geç ortaya çıkmaktadır (79,82). Reperfüzyonda 5

dakika kadar erken bir süreçte plazmada IL-1 ve TNF-α düzeylerindeki artış saptanabilmektedir. Her iki sitokinin de İ/R modelinde etkisi ispatlanmış ve antiserum monoklonal antikorlar ve reseptör antagonistleri kullanılarak hasarın ciddiyetinin azaltıldığı gösterilmiştir (79). Parsiyel hepatektomi vakalarında hepatik vasküler oklüzyonu takiben rezeksiyondan hemen sonra IL-1 artar ancak 30. dakikada tekrar azalır. IL-1, SOR üretiminin başlatıcısı olarak bilinir ki; IL-1 reseptör antagoistleri TNF-α düzeyini düşürür ve hepatik İ/R hasarını azaltır (79,83). Bu bulgular IL-1'in TNF-α üretimini arttırabileceğini düşündürmektedir.

IL-6, hepatosit üzerindeki gp80/IL-6 reseptöre bağlandıktan sonra oluşan bileşim sinyal iletici olan gp130'a bağlanır. Böylece IL-6'nın etki göstermesinde anahtar rol oynayan protein kinaz yolakları aktive olur. Fulminan hepatik yetmezlik ya da kronik karaciğer hastalığında serumda ve karaciğer dokusundaki IL-6 düzeyleri hastalık progresyonu ile doğru orantılıdır (84,85). gp130 eksik ratlarla yapılan çalışmalarda akut faz yanıtının olmadığı ve karaciğer yetmezliği geliştirme riskinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir (85,86).

IL-6, antijen bağımlı inflamatuar reaksiyonlarda rol alan pleiotropik bir sitokindir. IL-2 aracılığıyla sitotoksik T hücrelerinin çoğalmasından ve farklılaşmasından sorumludur (87,88). IL-6'nın aynı zamanda timik T hücre gelişiminde rol oynadığı düşünülen timosit çoğalmasından da sorumlu olduğu bilinmektedir. IL-6 eksik ratlarda lökositlerin inflamasyon alanına göçlerinin engellendiği ve kronik mononükleer hücre infiltrasyonunun yeterli olmadığı gösterilmiştir (89,90).

IL-6, mezenşimal vasküler hücrelerin iyileştirilmesinden ve tekrar anjiogenez oluşumundan da sorumludur (91). IL-6 tedavisi sıcak İ/R hasarından koruyucu

etkiye sahiptir (92). Bazı çalışmalarda hipoksi varlığında endotelyal hücrelerden ve miyositlerden NF-kß (natural factor kappa beta) aktivasyonu ile IL-6 salınımının arttığı gösterilmiştir (93).

Birçok çalışmada, ortamda inflamatuar yanıtta ihtiyaç olan miktardan daha fazla IL-6 bulunmasının otoimmun ve inflamatuar hastalıkların patofizyolojisinde rolü olduğu gösterilmiştir (94). İskemi reperfüzyon modelleri ile ratlarda yapılan çalışmalar ile in vivo olarak IL-6'nın pleotropik biyolojik etki olarak bilinen hem promitojenik hem de antiapopitotik etkisi gösterilmiştir (95-97).

IL-10: Transkripsiyonel NF-kß 'yi inhibe eden antiinflamatuar sitokindir. IL-10; TNF-α, kemokinler ve intraselüler adezyon moleküllerinin mRNA ekspresyonunu baskılamakta ve hepatik İ/R hasarını azaltmaktadır (98).

Platelet aktive edici faktör (PAF): PAF düzeyleri reperfüzyonun 12. saatinde belirgin olarak artmakta ve 24. saatte en yüksek düzeye ulaşmaktadır (93). PAF üretimi kupfer hücre ve SOR arasındaki etkileşim ile gerçekleşmektedir. PAF'ın TNF-α ile uyarılan nötrofil kemoatraktanlarının üretimini sağlayarak nötrofilleri aktive ettiği bilinmektedir.

(80). PAF antagonistleri (CINC) de kadavra donörlerde lipid peroksidasyonunu azaltarak etkili lmaktadır (99).

***Serbest Oksijen Radikalleri*:** Normal şartlar altında solunumsal metabolizma sırasında salınan serbest oksijen radikalleri (SOR), antioksidan sistem tarafından nötralize edilirler. Stres altında bu denge oksidatif stres ve sitotoksisite yönüne dönmektedir (100,101,102).

İ/R hasarında SOR'ların sentezi birkaç basamakta gerçekleşmektedir. Ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza dönüşmekte, oksijen bağımlı ürik asit üreten bu reaksiyonda süperoksid dismutaz (SOD) ve hidrojen peroksid salınmaktadır. Aktive olmuş kupfer hücreleri ve nötrofillerden salınan NADPH oksidazın indüksiyonu ile (NADPH inhibe edilirse SOR salınımı da bloke olur) oluşan nitrik oksid (NO) peroksinitrite dönüşmektedir (103-105).

SOR'ların antioksidan sistem tarafından inhibe edilmeleri nedeni ile dokuları İ/R hasarından koruyucu etkileri (alloprinol, N-Asetilsistein gibi) üzerinde çalışılmıştır (106- 108). Reperfüzyon sırasında endojen antioksidan düzeyleri anlamlı olarak azalmaktadır

(109-110). Dolayısıyla reperfüzyonun erken evrelerinde uygulanan egzojen anti oksidanların da transplante KC dokusunda İ/R hasarının ciddiyetini azaltmaları beklenen bir sonuçtur.

***Nitrik Oksid (NO)*:** Karaciğerde önemli sinyal moleküllerinden olan pluripotent bir serbest radikaldir. NO karaciğer hasarında pimer medyatör olabileceği gibi hasar uyarısına karşı güçlü bir koruyucu mekanizmanın da parçası olabilir. NO sentetazın (NOS) KC'de 3 izoformu vardır (111). Bunlardan indüklenebilir = inflamatuar NOS (iNOS= NOS-2) ve endotelyal NOS (eNOS = NOS-3) en önemlileridir. eNOS SEC'den salınır ve aktivitesi intraselüler kalsiyum düzeyi ile ilişkilidir (112). ıNOS hepatositler ve nötrofiller ya da kupfer hücreleri gibi inflamatuar hücrelerden inflamatuar medyatörlere yanıt olarak salınır. iNOS, gen regulasyonunda rol oynayan NF-κß'yi aktive etmekte ve intraselüler kalsiyum düzeyinden bağımsız olarak eNOS'a göre daha yüksek düzeylerde üretilmektedir.

Dolayısı ile iNOS İ/R hasarı patofizyolojisinde eNOS'a göre daha önemli role sahiptir. Birçok dokuda eNOS endotel bağımlı vazodilatörlere yanıt olarak NO üreterek kan akımını düzenlemektedir.

KC'de kan akımının kontrolü çift sirkulasyon nedeni ile daha önemlidir. NO ilişkili vazodilatasyon total portal kan akımını belirleyemez. Her ne kadar eNOS'un fonksiyonu biliniyorsa da portal basınç ve perfüzyonun lokal dağılımına da katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (111-112). Karaciğerde NO farklı kaynaklardan ortaya çıkmakta ve karaciğer hasarında direk ya da kan akımı yoluyla indirek olarak etki edebilmektedir.

Hepatik iskemi sırasında NOS aktivitesi için gerekli olan NADPH ve oksijen, intraselüler düzeyde azaldığı için dolaylı yoldan NO düzeyi de azalmaktadır. Reperfüzyondan sonra SEC'e kalsiyum girişi olmakta ve eNOS aktive olarak NO üretimi gerçekleşmekedir (113). Hepatik reperfüzyon sırasında ortama antioksidan eklenmesi, NF-κß bağlayıcı aktivitesini engeller ve iNOS mRNA ekspresyonunu inhibe etmektedir. Bu da NF-κß'nin hepatik İ/R hasarında oksidatif stres ile aktive olduğunu göstermektedir. NOS'un seçici ya da seçici olmayan inhibitörleri hepatik İ/R hasarını ağırlaştırırlar (114,115). NO, endotelin sentezini inhibe ederek (114) ve P-selektin ve ICAM-1 salınımını azaltarak nötrofil bağımlı olan reperfüzyon doku hasarını engellemektedir.

Ayrıca NO'nun TNF-α ilişkili hepatotoksisiteye karşı direnci ısı şok proteini (HSP) 70 aracılığı ile de indüklediği gösterilmiştir (116,117).

***Kemokinler*:** Kemokinler güçlü lökosit kemoatraktanı olarak rol oynayan düşük molekül ağırlıklı proteinlerdir. İ/R hasarı sonrası KC'den salınan TNF-α, ENA-78

kemokininin salınımını arttırır (80,118). İ/R hasarında anti-TNF antikorları ENA-78 salınımını azaltırken, anti ENA-78 antikorları nötrofil sekestrasyonunu ve serum aminotransferaz düzeylerini azaltırlar (80). Diğer kemokin ailesi üyeleri; IL-8, PF-4, sitokin ilişkili nötrofil kemoatraktan (CINC), makrofaj inflamatuar proteinler (MIP 1-2) ve monosit kemoatraktanlarıdır (MCP 1,2,3) (119). CINC düzeyleri sıcak İ/R hasarında saatler içinde artar ve nötrofiller için güçlü kemotaktik etki gösterirler. CINC, erken faz kupfer hücre aktivasyonunda ve geç faz İ/R hasarında rol alan önemli faktörlerden birisidir.

MIP-2 salınımı ile İ/R'nun 3. saatinde mRNA düzeyi artışa başlar ve en az 9 saat sonrasına kadar da artmaya devam eder.

Kemokinler hasarlı dokuya nötrofillerin göçünü sağlayan kemoatraktanlar olarak rol oynarlar. MIP-2 ve CINC, her ikisi de nötrofillerdeki integrin ekspresyonunu sağlarken, mikrovaskuler ortama da göç gerçekleşmiş olur. (120).

***Kompleman Sistemi*:** İskemi-reperfüzyon hasarı sırasında kompleman sisteminin aktive olduğu gösterilmiştir. Kompleman sistemi yaklaşık 30 adet membran bağlayıcı proteinden oluşur ki bunlar 3 yoldan biri aracılığı ile aktive olurlar; Antikor bağımlı klasik yol, alternatif yol ve mannoz bağlayan lektin yolu (MBL yolu). Komplemanlar indirek olarak kemotaktik ajanların ve proinflamatuar sitokinlerin üretimini uyarırlar. Bu olay lökosit migrasyonu, adezyonu ve nötrofillerin sinüzoidlere akışı ile sonuçlanmaktadır (121,122).

Kalsiyum (Ca): Kalsiyum İ/R hasarı sırasında Ca bağımlı fosfolipaz, nükleaz ve proteaz aktivasyonunda, aynı zamanda oksidatif fosforilasyonda ATP düzeylerini

düşürerek anahtar rol oynamaktadır. Mitokondriyal Ca düzeyinin ayarlanmasının sıcak İ/R hasarının azaltılmasında etkin olduğu bilinmektedir (123,124).

***Adenozin**:* Adenozin ATP, ADP ve AMP'den enzimatik reaksiyon sonucu oluşan endojen bir moleküldür ve platelet agregasyonunun inhibisyonu, nötrofil aktivasyonu, endotelin ve SOR'un üretimi aracılığı ile iskemiden önemli ölçüde koruyucu etkiye sahiptir (125-127).

İ/R hasarı sırasında adenozin ve inozin KC'den salınır ve reperfüzyonda inozinin organdan atılması ile koruyucu etki de uzaklaştırılmış olur (128). İskeminin net etkisi ATP'nin hücresel düzeyde tüketimi ve adenozinin birikmesidir. Ekstraselüler adenozin düzeyindeki artış iskemik dokuların korunmasına yardımcı olmaktadır. Ekstraselüler adenozinin artışı ve Adenozin - A_{2a} reseptörüne bağlanması ile koruyucu özelliği bilinen NO sentezi de artmaktadır (114). A2a reseptör agonistlerinin İ/R hasarında koruyucu etkisi varken antagonistler tam zıt etki göstermektedir (114). Adenozin- A_{2a} reseptör yolu SEC'in cAMP ilişkili koruyuculuğunu arttırmaktadır.

***İnflamatuar Hücreler Ve Adezyon Molekülleri*:** Nötrofiller hepatik İ/R hasarının her iki fazında da rol oynarlar. Nötrofillerin rolü bir grup basamaklar zincirinden oluşur. Nötrofillerin endotele teması (adezyon) ile başlayan süreç, transendotelyal göç ve parankimal hücre teması sonrasında doku hasarı ile sonuçlanmaktadır (81).

İ/R hasarı sonrasında hücresel adezyon molekülleri (ICAM) aktive olarak nötrofil ve SEC'in yüzeyinde artış gösterirler. Bu aktivasyon ve artış lipid medyatörleri,

sitokinler, kemokinler, peptit kemoatraktanlar gibi inflamatuar moleküller tarafından uyarılabilr ve adezyon kaskadını geliştirirler.

Selüler adezyon molekülleri, hücre-hücre ve hücre- matriks ilişkisini içeren hücre yüzey glikoproteinleridir ve endotelyal hücre yüzeyinde (P-selektin,E-selektin) ,plateletlerde (P-selektin) ve lökositlerde (L-selektin) bulunurlar (129).

P-Selektin, plateletlerin sekretuar alfa granüllerinde ve SEC'in Wiebel-Palade cisimlerinde depo edilir. Sitokinler SEC ve post sinuzoidal venlerde P-Selektin salınımını aktive eder ve P-Selektini hücre yüzeyine ilerletirler (130,131) P-Selektin İ/R hasarında bifazik rol oynamaktadır (132,133). İlk pik reperfüzyondan 20. dakikadan sonra, 2. pik ise 5 saat sonra ortaya çıkmaktadır. Bu yolla P-Selektin İ/R hasarında hem nötrofil adezyonunda hem de platelet sekestrasyonunda rol oynamakatdır. İntraselüler adezyon molekülü (ICAM) 1,2,3, vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM), platelet endotelyel hücre adezyon molekülü (PECAM 1), ımmunoglobulin (Ig) benzeri ailesinin üyesidirler. ICAM 1,2,3 homolog genlerin ürünleridir ve beta 2 integrinler ile ilişkide olduğu bilinmektedir (134,135). Endotelde ICAM-1 salınımı, ICAM-1 ile beta-2 integrin ilşikisine neden olur ki bu da SEC'e sıkı adezyonu sağlar.

Normal karaciğer dokusunda düşük düzeyde olan ICAM-1, hepatik endotelyum ve kupfer hücresinde bulunur. Her ne kadar ICAM-1 hepatositlerde saptanmasa da tüm karaciğer hücrelerinde sitokinler tarafından düzeyi arttırılır. ICAM-1'in rat modellerinde spesifik monoklonal antikor ile etkisinin engellendiği, buna bağlı olarak da hepatik İ/R hasarının azaldığı gösterilmiştir (80,136).

L-Selektin ise lökositlerin yüzeyinde bulunarak nötrofil aktivasyonunda rol oynamaktadır.

***Apopitoz Ve Nekroz*:** Reperfüzyonda TNF-α ve diğer mediyatörler apopitoza neden olan birçok proteini aktive ederler (kaspaz-3, kaspaz-8 gibi proteazlar gibi) (137). Bu moleküleri içeren olaylar zinciri başladığında DNA dekstrüksiyonu ve hücre ölümüne neden olurlar (138). Apopitoz, İ/R hasarında hücre ölümünün son basamağıdır. Dolayısıyla apopitozun baskılanması iskemi sonrası yaşam süresini arttırarak reperfüzyon hasarını azaltmaktadır (139,140,141,142). Bazı çalışmalarda İ/R hasarında hücre ölümünün masif nekroz ile olduğu (143), bazı çalışmalarda ise nekroz ve apopitozun birlikte eşlik ettiği gösterilmiştir (144).

İskemik uyarı, bazı faktörlerin etkisine göre (ATP düzindeki azalma ya da KC'in yağ içeriği gibi) nekroz ya da apopitozla sonuçlanabilmektedir (145,146).

4.4.4. İSKEMİ- REPERFÜZYON HASARININ MOLEKÜLER YÖNLERİ

KC iskemik sürece girdiğinde oksidatif stresin kompanzatuar kapasitesi aşılır ve hücre ölümü ile sonuçlanabilir. İskemik süreçte yaşayan hücrelerde gen ekspresyonunu ve rejenerayonu sağlayacak şekilde tekrar programlanır. İskemik periyot sırasında ATP hızla tüketilmekte ve bu nedenle reperfüzyonda doku daha da kötüye gitmektedir. İ/R hasarını düzenleyen önemli transkripsiyon faktörlerinden birisi de NF- kß' dir (147-149).

NF- kß normalde sitoplazmada inhibitör proteini olan inhibitör kß'ye (Iκß) bağlı olarak bulunur. Oksidatif stres sırasında Iκß azalarak, NF-κß'nın nukleer translokasyonuna neden olmakta (150), sonuçta TNF-α, kemokinler ve adezyon

molekülleri (ICAM-1)'nin sentezi uyarılmaktadır. NF-κß aktivasyonunda en önemli mekanizma SOR'un özellikle de hidrojen peroksidin (H2O2) üretimidir (151,152). NF-κß, İ/R'nin farklı evrelerinde farklı davranışlara sahiptir. Erken evrede (30 dk- 3 saat arası reperfüzyon) proinflamatuar sitokinlerin (IL-1β, IL-6, and TNF-α) salınımını arttırırken, ileri evrede (reperfüzyondan 9-12 saat sonra) antiinflamatuar ajan olarak rol oynamaktadır (153).

4.5. HEPATİK İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI:TRANSPLANTASYON CERRAHİSİ

İskemi süreci karaciğer cerrahisinde özellikle hepatik travma ve büyük intrahepatik kitlelerin operasyonları sırasında gözlenmektedir (154). Tekrar kan akımının sağlanması olarak bilinen reperfüzyon ile karaciğer, iskemiyi daha da ağırlaştıran bir sürece girmektedir. Bu olay iskemi reperfüzyon (İ/R) hasarı olarak adlandırılmakta ve özellikle de karaciğer transplantasyonunda birçok kötü klinik sonucun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. (155) Bu süreç antijenden bağımsız olarak meydana gelmekte ve transplantasyonun % 10 oranında erken organ yetmezliği ile ve yüksek insidansla da hem akut hem de kronik rejeksiyon ile sonuçlanmasına neden olabilmektedir (156). Bu nedenle bu hasarın mekanizmalarının bilinmesi ve hasarı azaltan önlemlerin alınması transplantasyon cerrahisinin başarısını arttırmak açısından büyük önem taşımaktadır. 15-50 dakikalık sıcak iskemi süreci sonrasında yaşanan reperfüzyon hasarı yüksek morbidite ile sonuçlanabilmektedir.

İ/R hasarı KC transplantasyonu sonrası graft fonksiyonunu etkileyen multifaktoriyel olaylar zincirinden oluşmaktadır. Karaciğer transplantasyonunda İ/R hasarına vericinin, alıcının ve operasyon tekniğinin özellikleri de katkıda bulunmaktadır (157). Verici karaciğeri hipotansiyon nedeni ile iskemiye maruz kalmışsa, ilaç ilişkili organ fonksiyon bozukluğu gelişmişse ya da yağlı karaciğer nakledilmişse oluşan İ/R hasarı transplatasyonda başarısızlığına neden olabilmektedir (158). Alıcıda endotelde, mikrosirkulasyonun bozulması, nötrofil aktivasyonunun sağlanması serbest oksijen radikalleri ve proteazların salınması ile meydana gelen değişiklikler İ/R hasarına katkıda bulunmaktadır.

Başta portal ven ya da hepatik arter akımının azaltılması, soğuk/sıcak iskemi süreci olmak üzere intraoperatif hipotansiyon süresi ve splanknik iskemi derecesi İ/R hasarını belirleyen teknik faktörlerdir. Reperfüzyon sürecinde ise sinuzoide tekrar kan akımının doluşunun yetersiz olması (157), inflamatuar sitokin üretimindeki artış (159) ve total vaskuler oklüzyon sonrası reperfüzyon doku hasarının artmasına neden olmaktadır.

Transplante bir organda yaşanan İ/R hasarında iskemi sadece organdan değil, beyin ölümü, kardiyak arrest, organın çıkarılması, saklanması ve revaskularizasyon süreçlerinden de kaynaklanabilmektedir.

İskemi transplantasyon cerrahisinde 3 evrede gerçekleşimektedir (160,161).İlk evre beyin ölümü ile gerçekleşen hipotansiyon ve vasokonstriksiyon sonrasında organda olan geçici sıcak iskemi sürecidir ve genelde pressör kullanımı ile ağırlaşmaktadır. İkinci evre soğuk iskemi sürecidir, organın korunma ve depolanması ile ilişkilidir. Üçüncü evre ise revaskularizasyon sırasında olan sıcak

iskemi sürecidir. Soğutma ile progresif hasar yavaşlatılmakta ancak daha önce de belirtildiği üzere iskemik hasar agreve olmaktadır (20,162). İ/R hasarının en önemli klinik sonuçlarından birisi de ortotopik karaciğer transplantasyonunda primer disfonksiyon ve anastomoz ilişkisiz safra kaçağına neden olmasıdır (19,21).

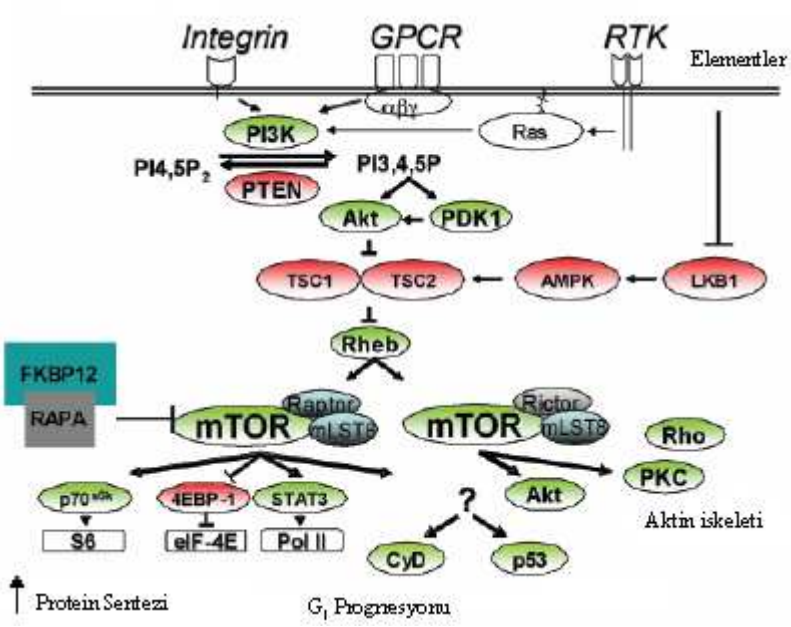
4.6. mTOR ve mTOR İNHİBİTÖRÜ: EVEROLİMUS

mTOR (mammalian target of rapamycin) fosfotidilinozitol 3 kinaz/Akt sinyal yolunda 290 kD ağırlığında bir protein kinazdır (163,164). mTOR'u hedef alan ajanlardan rapamisin ve deriveleri (everolimus, temsirolimus) ile hücre siklus progresyonundaki sinyal yolakları, hücre büyümesi ve proliferasyonu inhibe olmaktadır. mTOR, fosfoinozitol 3 kinaz (PI3K) ilişkili kinaz (PIKK) ailesindendir ve büyüme faktörü, enerji eksikliği ve hipoksi varlığında oluşan sinyalleri protein kompleksi içerisinde iletmekten sorumludur. Ekstraselüler bir uyarıya yanıt olarak PI3K fosforillenerek fosfotidilinozitol-4,5-bifosfat (PIP2)'ı oluşturur. PIP2 de fosfotidilinozitol-3,4,5-trifosfata (PIP3) dönüşür. PIP3, membran lokalizasyonuna ve fosfotidilinozitol bağımlı kinaz-1 (PDK1) ve Akt aktivasyonuna neden olmaktadır (4). Aktive Akt, Tuberoz Skleroz kompleksini (TSK)(5,6) fosforilleyerek inhibe etmetkte ve TSK'nın mTOR üzerindeki inhibe edici etkisini ortadan kaldırmaktadır (166).

Sirolimus olarak da bilinen makrosiklik lakton rapamisin, FK 506 bağlayan protein-12 (FKBP 12)'ye bağlanır. Oluşan FKBP12-Sirolimus bileşiminin

mTOR'un kinaz bölgesine bağlanması, bazı sinyal yolaklarını aktive etmekte ve böylece hücre proliferasyonu G1 fazında durdurulmaktadır (Şekil 3).

Everolimusun emilimi sirolimus gibi P-glikoprotein aktivitesi ile ilişkilidir ancak sirolimusa göre FKBP12 proteinine 2 kat daha az afinite ile bağlanmaktadır. Bu nedenle oral biyoyararlanımı düşük olmakla birlikte (%16) sirolimusa göre 2 kat daha fazladır (168). Everolimusun tedavi edici aralığının dar olması ve değişken oral biyorarlanımı nedeni ile ilaç düzeyi monitorizayonu da önerilmektedir. Siklosporin ve prednizolon ile kombinasyon tedavilerinde C_{min} (kandaki minimum ilaç konsantrasyonu) değeri 3-15 μg/L arasında olmalıdır. İlaç etkisindeki dalgalanmaları engellemek için aynı saatlerde ve her zaman yemekle birlikte ya da aç olarak alınmalıdır. Everolimus ilk dozdan 1.3-1.8 saat sonra kanda maksimum konsantrasyonuna ve ortalama 7 günde kararlı düzeye ulaşmaktadır. Karaciğerde sitokrom P450 sistemi tarafından metabolize edilip %98'i safra, %2'si idrar ile atılmaktadır. Eliminasyon yarı ömrü 18-35 saattir. Sık görülen yan etkiler trombositopeni, hiperkolesterolemi, hipertrigliseridemi ve diyaredir (167).



Şekil 3. mTOR aktivasyonu

Yapılan bir faz III çalışmada siklosporin ile kombine kullanılan everolimusun, serum kreatinin düzeyinde artışa neden olduğu gözlenmiş ancak bu etki kalsinörin inhibitörü olan siklosporinin rena toksisitesi ile açıklanmış ve everolimusla ilişkili henüz renal toksisite bildirilmemiştir (169).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı (24/09/2009; 86-14657) alındıktan sonra Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Labaratuarında yapılmıştır. Biyokimyasal analizler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, patolojik incelemeler ise Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada toplam 24 adet 200-250 gram ağırlığında Winstar albino dişi sıçan grubu kullanlıdı. Deney öncesi tüm hayvanlar standart yem ve su ile beslendi. Denekler toplam 4 gruba ayrıldı.

Grup I: Sham (kontrol) grubu: Bu gruptaki deneklere deneysel akut hepatik iskemi-reperfüzyon yaralanması oluşturulmadan ve medikal tedavi uygulanmadan sadece laparatomi uygulandı, kan ve karaciğer doku örnekleri alındı.

Grup II: İskemi-Reperfüzyon (İ/R) Grubu: Bu gruptaki deneklere herhangi bir tedavi verilmedi. Laparatomi sonrası sol ve median loba giden tüm yapılar (hepatik arter,portal ven ve safra yolu) ortaya çıkartıldı ve atravmatik vasküler klemp ile 60 dakika boyunca iskemi uygulandı. 24 saatlik reperfüzyon sonrasında laparatomi yapılarak kan ve karaciğer doku örnekleri alındı.

Grup III: Everolimus Grubu: Bu gruptaki deneklere 7 gün boyunca 1.5 mg/kg/gün dozunda peroral everolimus tedavisi verildi ancak iskemi modeli oluşturulmadı. Everolimus'un suda eriyen oral formları oral yoldan ve her gün aynı saatte verildi. Tedavi bitiminde 8. günde laparatomi yapılarak kan ve karaciğer doku örnekleri alındı.

Grup IV: Everolimus + İ/R (Tedavi) Grubu: Bu gruptaki deneklere 7 gün boyunca 1.5 mg/kg/gün dozunda peroral everolimus oral yoldan ve her gün aynı saatte verildi. Tedavi bitiminde 8. günde laparatomi yapılarak sol ve median loba giden tüm yapılar (hepatik arter,portal ven ve safra yolu) ortaya çıkartıldı ve atravmatik vasküler klemp ile 60 dakika boyunca iskemi uygulandı. 24 saatlik reperfüzyon sonrasında laparatomi yapılarak kan ve karaciğer doku örnekleri alındı.

Bütün denekler 40 mg/kg (i.m.) ketamin HCl (Ketalar,Eczacıbaşı,Türkiye) anestezisi ile uyutuldu. Deneklerin abdominal bölgeleri tıraş edilip %10 polivinilpirolidon iyot kompleksiyle (Batticon,Adeka) sterilize edildi. Abdominal bölgeye orta hat üzerinde yaklaşık 3 cm'lik cilt kesisi yapılarak karın içi görünür hale geldikten sonra karın içi organlar kenara doğru çekildi. Böylece sol ve median loba giden tüm yapılar (hepatik arter,prtal ven ve safra yolu) ortaya çıkartıldı. Sham grubundan ve everolimus grubundan laparatomi sonrası herhangi bir işlem uygulanmaksızın kan ve karaciğer doku örnekleri alındı. İskemi reperfüzyon grubu ve everolimus + İ/R gruplarında ise laparatomi yapılarak sol ve median loba giden tüm yapılar (hepatik arter,portal ven ve safra yolu) ortaya çıkartıldı ve atravmatik vasküler klemp ile 60 dakika boyunca iskemi uygulandı. 60 dakikalık bekleme süresinde açıkta kalan karın bölgesi üzerine ılık serum fizyolojik ile ıslatılmış spanç konuldu. 24 saatlik reperfüzyon uygulanan bu iki gruptaki deneklerin iskemi işlemi tamamlandıktan sonra laparatomi insizyonu primer 3/0 ipek iplikle kapatıldı. Bu deneklere 24 saat sonra tekrar anestezi işlemi uygulanarak laparatomi insizyonu uygun sterilizasyon sağlandıktan sonra tekrar

açıldı, kan ve karaciğer doku örnekleri alındı.Tüm deneklere örnekler alındıktan sonra intrakardiak kan alma yöntemiyle ötenazi uygulandı.

5.1. BİYOKİMYASAL İNCELEME YÖNTEMLERİ

Deneklerden MDA ve SOD analizi için alınan karaciğer dokusu serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra aliminyum folyolara sarılarak hemen azot tankına atıldı ve analiz dönemine kadar -80 derecede saklandı. AST, ALT, albumin, IL-6 ve TNF-α çalışılamak üzere portal venden alınan 4 cc'lik kan örnekleri biyokimya tüpü içerisinde labaratuara ulaştırıldı. 3000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra serum kısmı ependorf tüplere ayrılarak analiz dönemine kadar 80 derecede saklandı.

5.1.1. Serum AST, ALT, Albumin Analizi

Serum AST, ALT ve albumin düzeyleri hazır kitler kullanılarak kolorimetrik yöntemle ölçülmüştür.

5.1.2. Serum IL-6 ve TNF-α Analizi

Serum IL-6 ve TNF-α düzeyleri Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assey (ELİSA) yöntemi ile hazır kitler (KRC3011, California, Biosource) kullanılarak analiz edilmiştir. IL-6 testinin sensitivitesi için ölçülebilen en küçük değer <7 pg/mL olarak belirtilmiştir. Spesifite ölçümünde tampon solusyonlar kullanıldığında 1.0 ile 9.0 konsantrasyonlarında sonuçlar elde edilmiştir. Analizler arası hata payı %3.8, analiz içi hata payı %7.2 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar pg/ml cinsinden belirtilmiştir.

TNF-α testinin sensitivitesi ölçülebilen en küçük değer <4 pg/ml olarak belirtilmiştir. Spesifite ölçümünde tampon solusyonlar kullanıldığında 10.000 pg/ml değeri elde edilmiştir. Analizler arası hata payı %2.7, analiz içi hata payı %3.9 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar pg/ml cinsinden beilrtilmiştir

5.1.3. Doku MDA Analizi

Doku MDA analizi için alınan ve derin dondurucuda saklanan doku örnekleri %1.15 potasyum klorür (KCL) ile 1/10 (w/v) oranında homojenize edildi. Elde edilen dokuda MDA düzeyi kolorimetrik yöntemle hazır kit kullanılarak (Foster City, USA, OxisResearch) ölçüldü. Testin sensitivitesi ölçülebilen minimum değer 5.185 SD (standart derivasyon), spesifitesi %100 olarak belirtilmiştir. Analiz sırasındaki hata payları sırası ile %3.4, %1.1 ve %1.6 olarak belirtilmiştir. Sonuçlar ” mikromol/gr yaş doku” cinsinden belirlenmiştir.

5.1.4. Doku SOD Analizi

Doku SOD analizi için alınan ve derin dondurucuda tutulan doku örnekleri distile su ile 1/10 oranında teflon metal uçlu homojenizatörle homojenize edildi. Elde edilen dokuda SOD düzeyi kolorimetrik yöntemle hazır kit kullanılarak (706002,USA,Cayman) ölçüldü. Sonuçlar “U/ml” cinsinden belirlendi.

5.2. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME YÖNTEMLERİ

Çalışma sonucu alınan karaciğer doku örnekleri %10'luk formaldehit içerisinde fiske edilip parafin bloklara alınmıştır. Alınan kesitler hematoksilen eozin ile boyandıktan sonra her kesit 40X ve 100X büyütme ile incelenmiştir. Bedirli ve arkadaşlarının kullandıkları histopatolojik sınıflama ile sonuçlar değerlendirilmiştir (222)

5.3. İSTATİKSEL ANALİZ

Bu çalışmada elde edilen veriler SPSS.13 paket programı yardımı ile değerlendirilmiştir**.**

Her bir grup için seçilen denek sayısı 6 olduğu için veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak sunuldu. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde parametrik olmayan testler kullanıldı. İki grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U testi kullanıldı ve tespit edilen p değeri <0.05 ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İkiden fazla grup karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. P değeri <0.05 ise gruplar arasındaki farkın hangi 2 gruptan kaynaklandığının tespiti için, gruplar Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı ve istatistiksel anlamlılık düzeyi Bonferroni düzeltmesi dikkate alınarak değerlendirildi. Bu amaçla tespit edilen her bir p deperi 2'li gruplar arasında yapılan karşılaştırma sayısına bölünerek anlamlı p değeri belirlendi (anlamlı p < genel p/karşılaştırma sayısı). Bağıntı analizleri için Spearman bağıntı analizi kullanıldı.

6. BULGULAR

6.1. BİYOKİMYASAL İNCELEME SONUÇLARI

6.1.1. Ortalama AST Değerleri

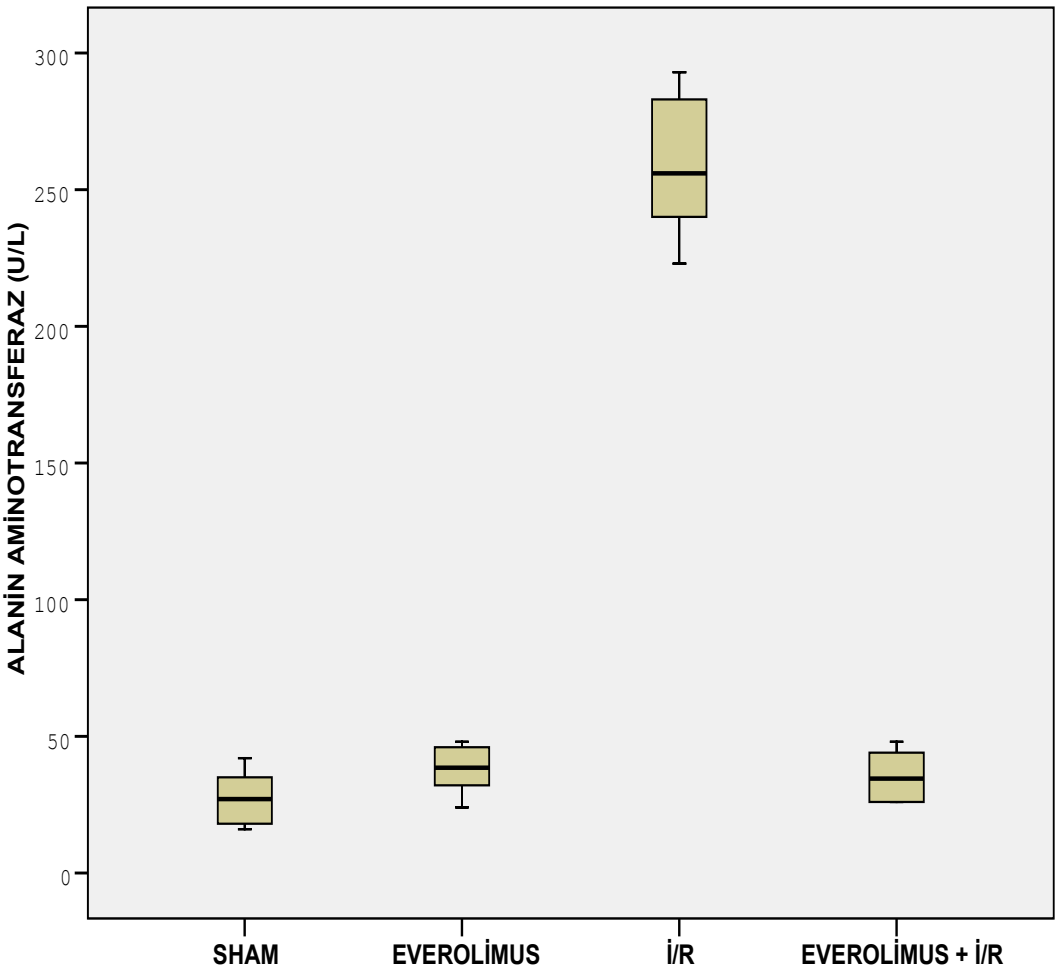
Ortalama serum AST düzeyleri sham grubunda 28 (22-43), İ/R grubunda 1288 (1169-1407) ,everolimus grubunda 51(38-98), everolimus +İ/R grubunda 77,5 (72-100) olarak bulundu (Şekil). Sham grubu ile İ/R grubu AST düzeyleri arasında anamlı istatistiksel fark saptandı ($p<0,05$).

6.1.2. Ortalama Albumin Değerleri

Ortalama serum albumin düzeyleri sham grubunda 3,7 (3,1-4,1), İ/R grubunda 3,9 (3,7-4,2), everolimus grubunda 2,6 (2,3-3,0), everolimus +İ/R grubunda 4 (3,5-4,2) olarak bulundu (Şekil). Sham grubu ile İ/R grubu albumin düzeyleri arasında anamlı istatistiksel fark saptandı ($p<0,05$).

6.1.3. Ortalama ALT Değerleri

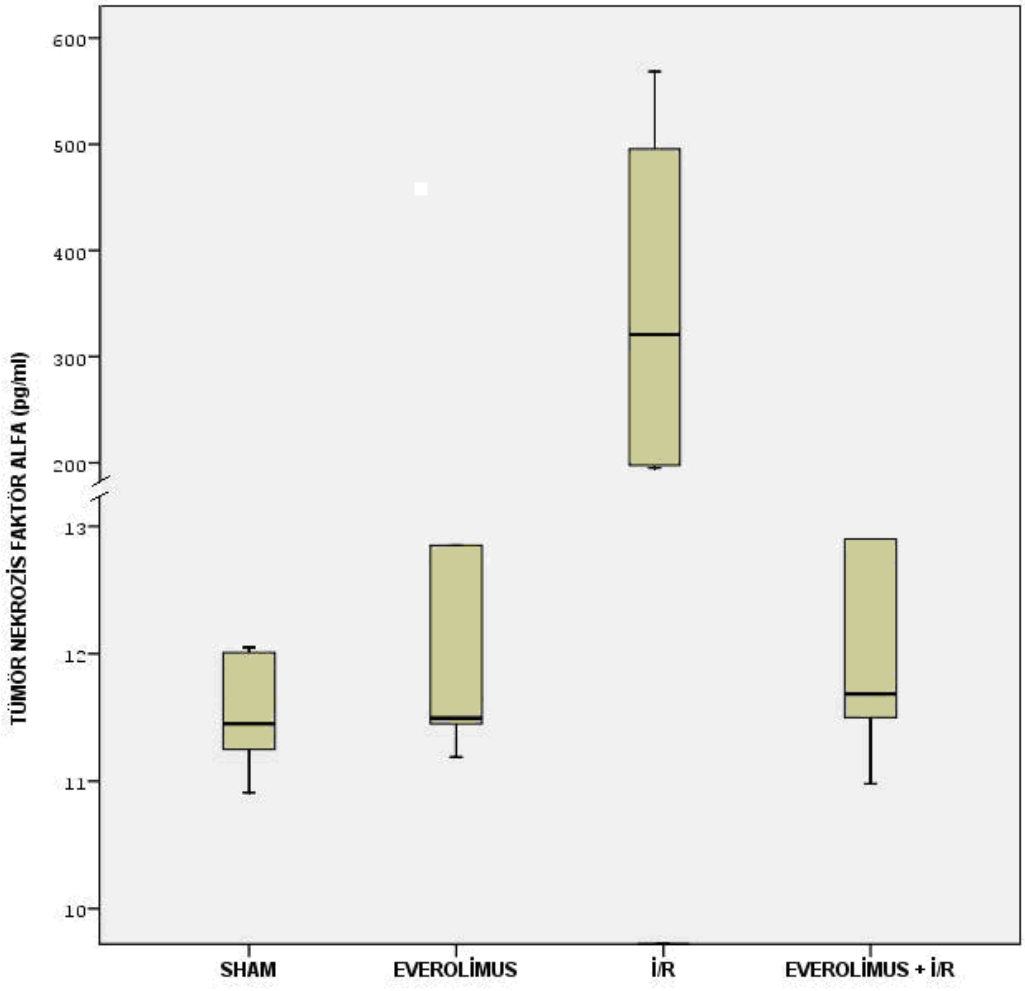
Ortalama serum ALT düzeyleri sham grubunda 27 (16-42), İ/R grubunda 256 (223-293), everolimus grubunda 38,5 (24-48), everolimus +İ/R grubunda 34,5 (26-48) olarak bulundu (Şekil). Sham grubu ile İ/R grubu ALT düzeyleri arasında anamlı istatistiksel fark saptandı ($p<0,05$).



Grafik 1: Ortalama ALT değerlerinin gruplara göre dağılımı

6.1.4. Ortalama TNF-α Değerleri

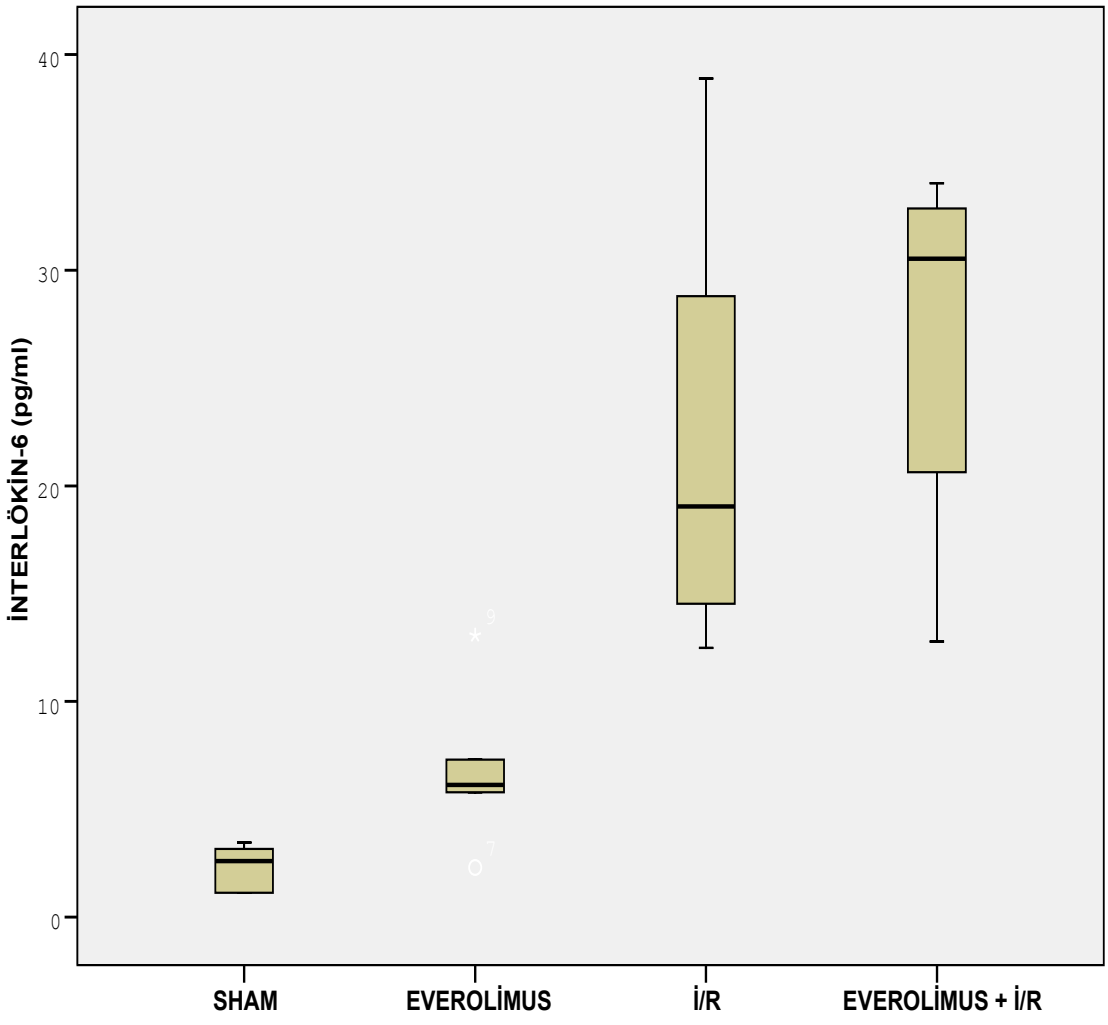
Ortalama doku TNF-α düzeyleri sham grubunda 11,5 (10,9-12), İ/R grubunda 336,5 (210,6-583,9), everolimus grubunda 11,5 (11,1-24,7), everolimus +İ/R grubunda 11,6 (10,9-17,5) olarak bulundu (Şekil). Sham grubu ile İ/R grubu TNF-α düzeyleri arasında anamlı istatistiksel fark saptandı ($p<0,05$).



Grafik 2: Ortalama TNF-α değerlerinin gruplara göre dağılımı (İ/R grubunda TNF-α düzeyinin diğer gruplara göre yaklaşık olarak 30 kat yüksek saptanması nedeni ile grafikte "y" ekseninde 13 pg/ml düzeyinden sonraki basamak 200 pg/ml'den başlatılmıştır).

6.1.5. Ortalama IL-6 Değerleri

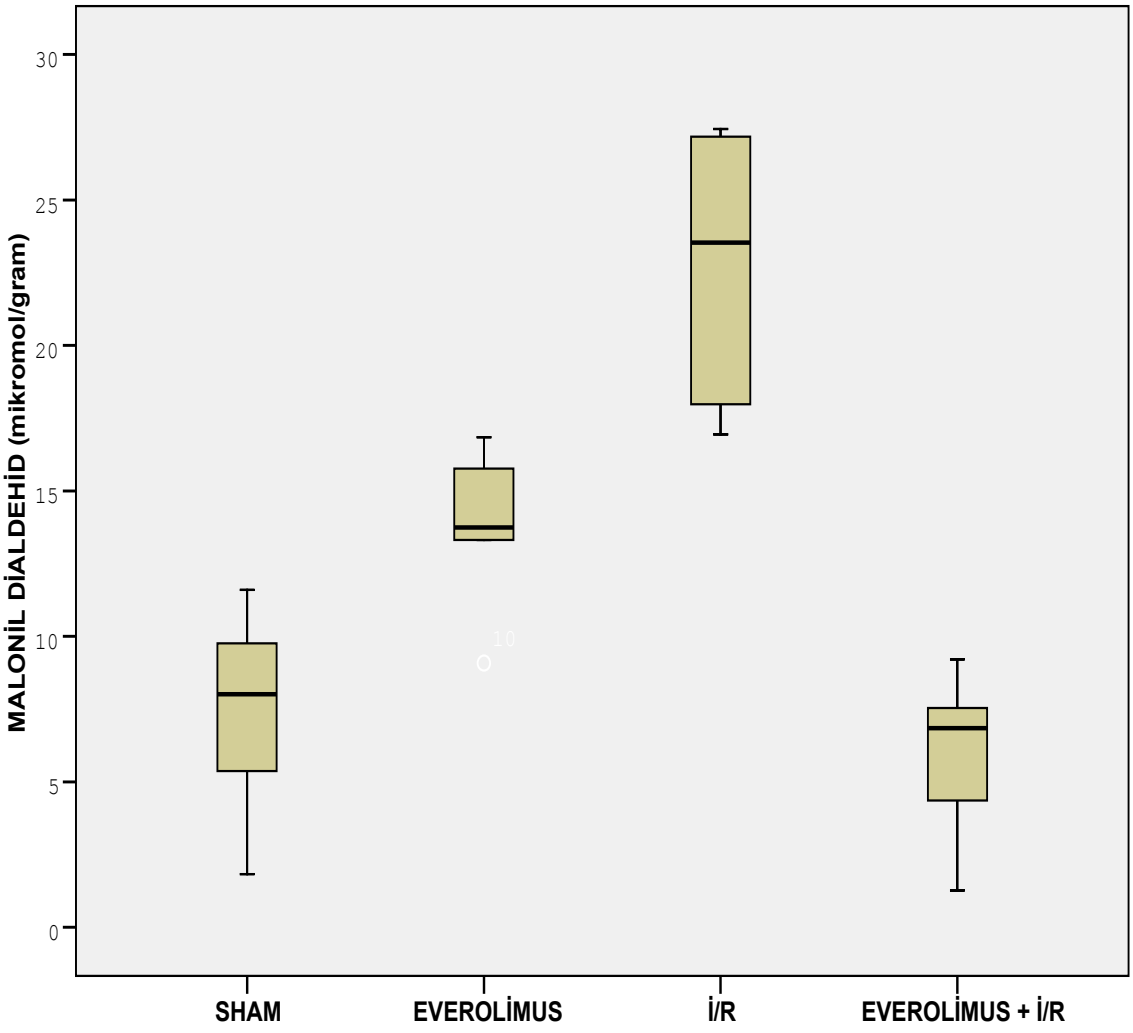
Ortalama serum IL-6 düzeyleri sham grubunda 2,6(1,1-4,1), I/R grubunda 19(12.4-38.9), ,everolimus grubunda 6,1(2,3-13), everolimus +I/R grubunda 30,5(12,7-34) olarak bulundu (Şekil). Sham grubu ile I/R grubu IL-6 düzeyleri arasında anamlı istatistiksel fark saptandı ($p<0,05$).



Grafik 3: Ortalama IL-6 değerlerinin gruplara göre dağılımı

6.1.6. Ortalama Doku MDA Değerleri

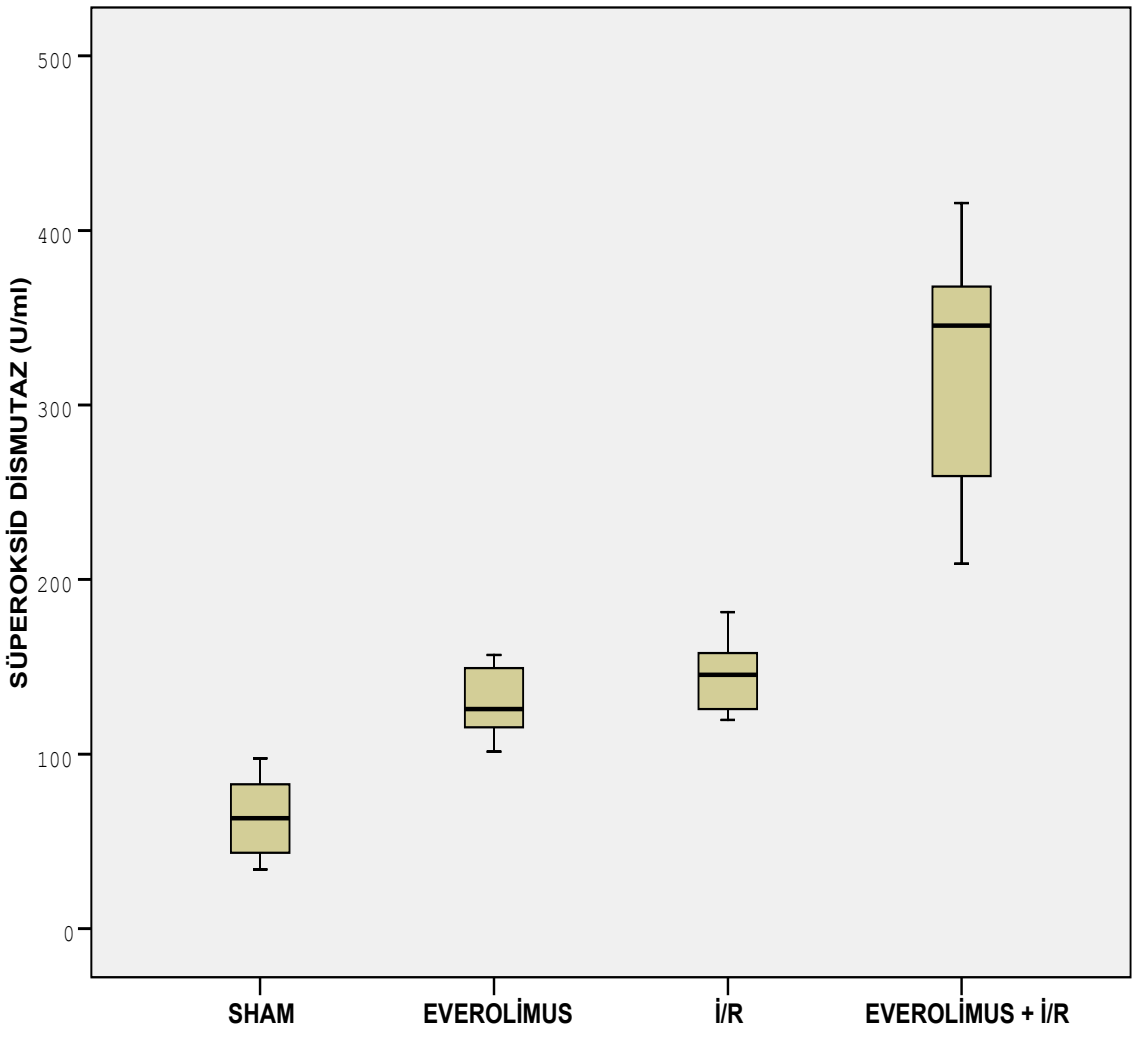
Ortalama doku MDA düzeyleri sham grubunda 8 (1,8-11,6), İ/R grubunda 23,5 (6,8-24,7) ,everolimus grubunda 13,7 (9-16,8), everolimus +İ/R grubunda 6,8 (1,2-9,2) olarak bulundu (Şekil). Sham grubu ile İ/R grubu MDA düzeyleri arasında anamlı istatistiksel fark saptandı ($p<0,05$).



Grafik 4: **Ortalama MDA değerlerinin gruplara göre dağılımı**

6.1.7. Ortalama SOD Değerleri

Ortalama doku SOD düzeyleri sham grubunda 63,2 (33,9-97,6), İ/R grubunda 145,4 (119,6-181,3), everolimus grubunda 125,8 (101,4-156,9), everolimus +İ/R grubunda 345,5 (209-415,6) olarak bulundu. Sham grubu ile İ/R grubu SOD düzeyleri arasında anamlı istatistiksel fark saptandı ($p<0,05$).



Grafik 5: Ortalama SOD değerlerinin gruplara göre dağılımı

Çalışma gruplarından elde edilen tüm veriler Tablo 1 ile, bu verilerden elde edilen sonuçların gruplara göre dağılım ve yayılım ölçütleri ise Tablo 2 ile verilmiştir.

Tablo 4: Çalışma gruplarına ait elde edilen tüm veriler

	Denek	AST	ALT	Albumin	IL-6	TNF-α	MDA	SOD
KONTROL	1	22	16	3,2	3,17	11,43	6,85	51,77
	2	24	32	3,1	2,3	10,91	11,6	82,77
	3	32	35	4,1	3,46	11,47	5,37	33,99
	4	43	42	4,1	1,13	12,05	9,17	97,6
	5	24	22	3,7	1,13	12,01	1,83	74,64
	6	36	18	3,7	2,88	11,25	9,76	43,55
EVEROLİMUS	7	98	24	2,7	2,3	11,52	13,31	156,91
	8	56	34	2,4	5,79	11,45	15,77	120,56
	9	44	43	3	13,07	11,47	16,85	115,3
	10	34	46	2,6	7,3	24,7	9,08	101,43
	11	54	32	2,8	5,9	12,85	13,4	131,08
	12	48	48	2,3	6,37	11,19	14,09	149,26
İ/R	13	1169	293	3,7	38,9	210,69	27,14	134,43
	14	1305	283	3,7	12,49	511,19	16,95	119,6
	15	1170	223	4,2	14,53	213,19	27,44	181,31
	16	1271	263	4,2	28,8	243,56	27,18	157,9
	17	1402	240	4,2	20,06	583,97	19,93	156,44
	18	1399	249	3,7	18,02	429,37	17,98	125,82
EVEROLİMUS+İ/R	19	90	48	3,7	12,78	11,57	7,54	415,69
(Tedavi)	20	72	26	4,1	30,54	17,51	7,54	328,03
	21	72	44	3,5	20,64	10,98	9,21	363,1
	22	82	26	4,1	30,54	12,9	6,16	259,27
	23	100	43	4,2	34,04	11,5	1,27	367,85
	24	73	26	3,9	32,87	11,8	4,36	209,05

AST (U/L), ALT (U/L) Albumin (g/dl), IL-6 (pg/mL), TNF Alfa (pg/mL), MDA (mikromol/g), SOD (U/ml)

Tablo 5: Çalışma grupları ve sonuçlar

Ortanca (min-maks)	KONTROL	EVEROLİMUS	İ/R	EVER+ İ/R (Tedavi)
AST	28(22-43)	51(38-98)	1288(1169-1407)	77,5(72-100)
ALT	27(16-42)	38,5(24-48)	256(223-293)	34,5(26-48)
ALB	3,7(3,1-4,1)	2,6(2,3-3)	3,9(3,7-4,2)	4(3,5-4,2)
IL-6	2,6(1,1-4,1)	6,1(2,3-13)	19(12,4-38,9)	30,5(12,7-34)
TNF-α	11,5(10,9-12)	11,5(11,1-24,7)	336,5(210,6-583,9)	11,6 (10,9-17,5)
MDA	8(1,8-11,6)	13,7(9-16,8)	23,5(24,7-6,8)	6,8(1,2-9,2)
SOD	63,2(33,9-97,6)	125,8(101,4-156,9)	145,4(119,6-181,3)	345,5(209-415,7)

AST (U/L), ALT (U/L) Albumin (g/dl), IL-6 (pg/mL), TNF Alfa (pg/mL), MDA (mikromol/g), SOD (U/ml)

Tablo 2' de görüldüğü üzere; İ/R , everolimus ve tedavi grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak karşılaştırması sonuçunda, incelemeye alınan tüm çalışma testlerinin bu üç grup arasında anlamlı olarak farklı olduğu tespit edildi. Farklardaki anlamlılığın hangi gruplar arasında oluştuğunu tespit etmek için yapılan analizlerde, SOD haricindeki tüm çalışma testlerinin İ/R grubunda everolimus grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı. SOD değeri ise bu iki grup arasında anlamlı olarak farklı değildi. Ayrıca, albumin, IL-6 ve SOD düzeylerinin tedavi grubunda everolimus grubuna göre daha yüksek olduğu, MDA düzeyinin ise everolimus grubunda daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu iki grup arasında AST, ALT ve TNF-α açısından anlamlı farka rastlanmamıştır. IR ile tedavi grupları karşılaştırıldığında, SOD düzeyi tedavi grubunda anlamlı olarak daha yüksek iken, AST, ALT, TNF-α ve MDA

düzeylerinin İ/R grubunda anlamlı olarak daha yüksek oldukları saptanmıştır. Bu iki grup arasında albumin ve IL-6 açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Karşılaştırmalar sonucunda elde edilen p değerleri Tablo 3'de verilmiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde (tüm denekler bir seferde analize alındığında), MDA düzeyi ile AST, ALT ve TNF-α düzeyleri arasında anlamlı pozitif bağıntılar mevcut iken, MDA ile IL-6 düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemektedir. Ayrıca SOD düzeyi ile AST ve IL-6 düzeyleri arasında anlamlı pozitif bağıntılar mevcut iken, SOD düzeyi ile ALT ve TNF-α düzeyleri arasında anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır. Bağıntı katsayıları (r) ve p değerleri Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 6: Everolimus, İ/R ve Tedavi grupları arasında çalışma testlerinin istatistiksel analizleri

	Genel p değerleri	**Everolimus x İ/R**	**Everolimus x Tedavi**	**İ/R x Tedavi**
AST	0.001	<0.001	0.03	0.002
ALT	<0.01	<0.001	0.82	0.002
ALB	<0.01	<0.001	<0.001	0.69
IL-6	<0.01	0.002	0.002	0.24
TNF-α	<0.01	<0.001	0.59	0.002
MDA	<0.001	<0.001	0.004	0.002
SOD	<0.01	0.018	<0.001	<0.001

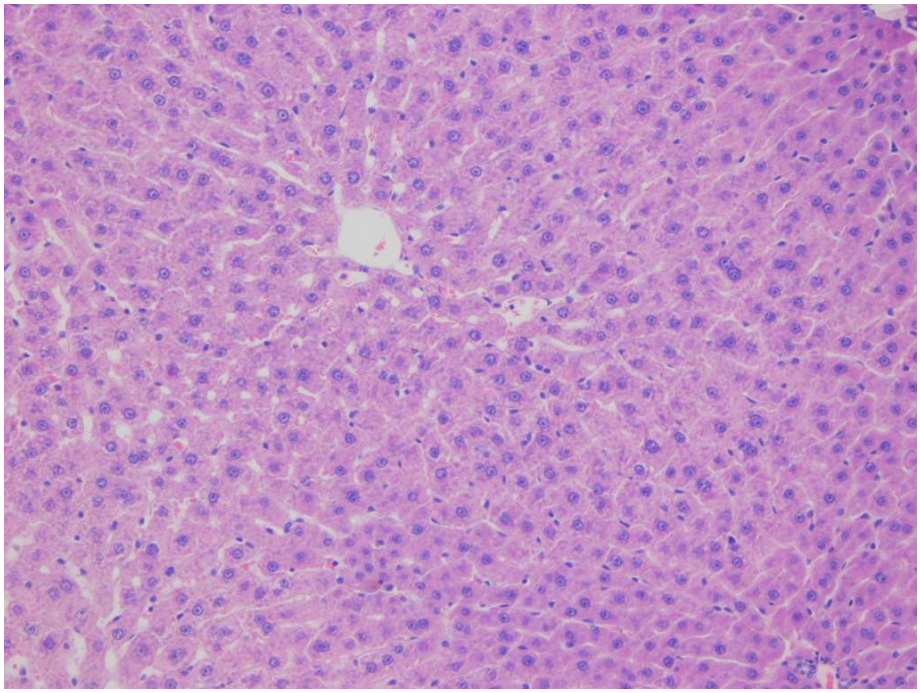
p anlamlılık değeri Bonferroni düzeltmesine göre 0.05/3 (<0.016) olarak belirlenmiştir.

Tablo 7. Veriler arasında bağlantı katsayısı ve p değeri arasındaki orantı

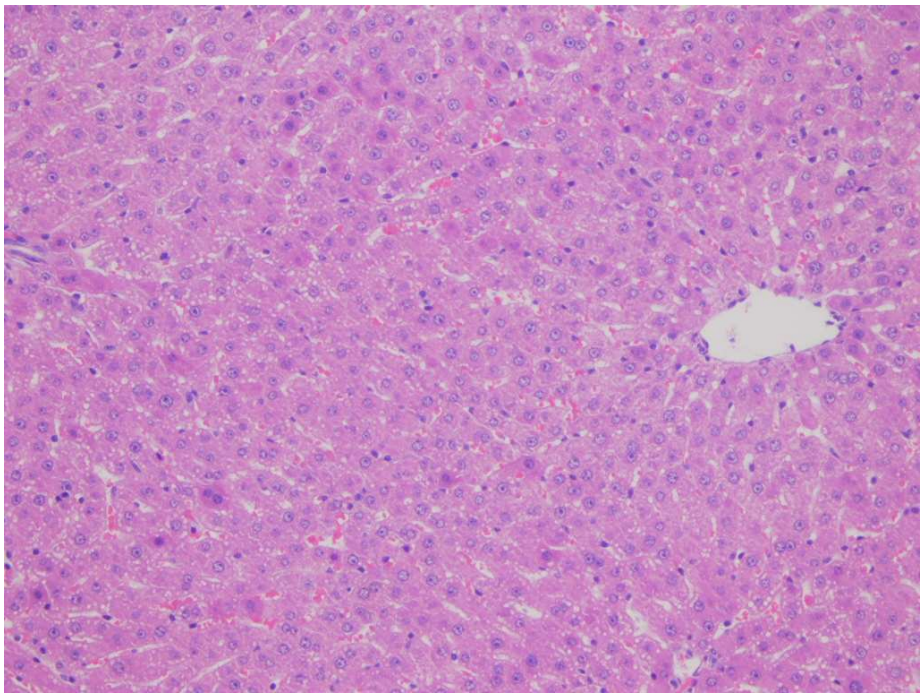
Bağıntı katsayısı(r)/p	**MDA**	**SOD**
ALT	**0.65/<0.01**	0.27/0.19
AST	**0.53/0.01**	**0.64/<0.01**
IL-6	0.12/0.56	**0.72/<0.001**
TNF-α	**0.40/0.05**	0.21/0.31

6.2. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI

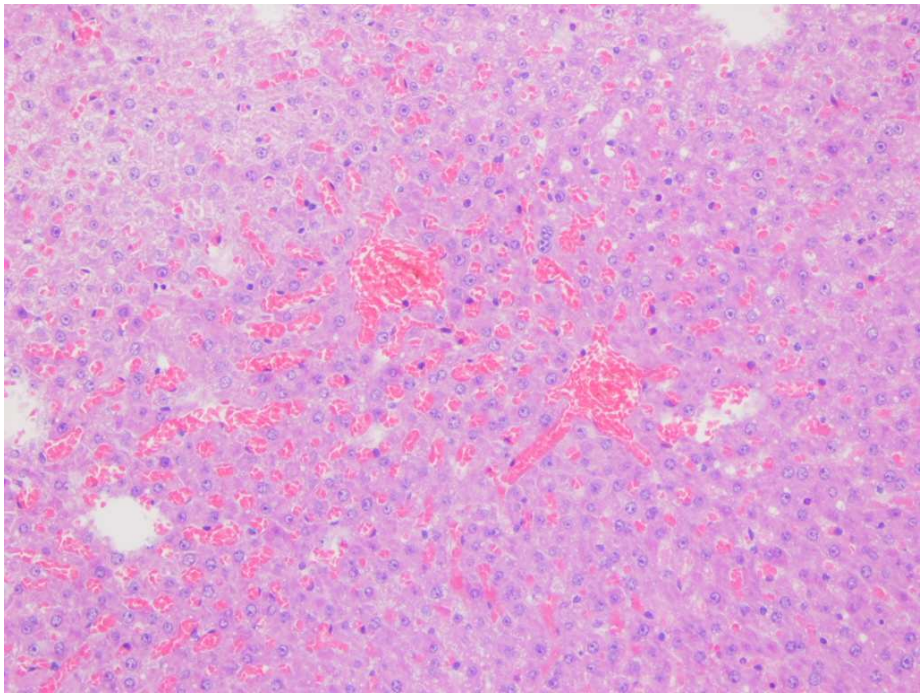
Histopatolojik incelemelerde tüm gruplarda kolestaz, steatoz, sinüzoidal dilatasyon, hepatik venlerde konjesyon, hidropik dejenerasyon ve nekroza bakıldı. Sham grubnda ve everolimus grubunda normal histopaTolojik görünüm elde edildi. (Resim 1) İ/R grubunda kolestaz, sinüzoidal dilatasyon, hepatik venlerde konjesyon, hidropik dejenerasyon ve subkapsüler nekroz izlendi (Resim 3,4,5). Everolimu+İ/R grubunda 2 ratta normal histopatolojik görünüm izlendi (Resim 6). Everolimus+İ/R grubuda 4 ratta İ/R grubuna göre daha az oranda kolestaz, sinüzoidal dilatasyon, hepatik venlerde konjesyon, hidropik dejenerasyon ve subkapsüler nekroz (Resim 3,4,5) izlenirken bu ratların 3'ünde ek olarak intraparankimal nekroz izlendi (Resim 7).



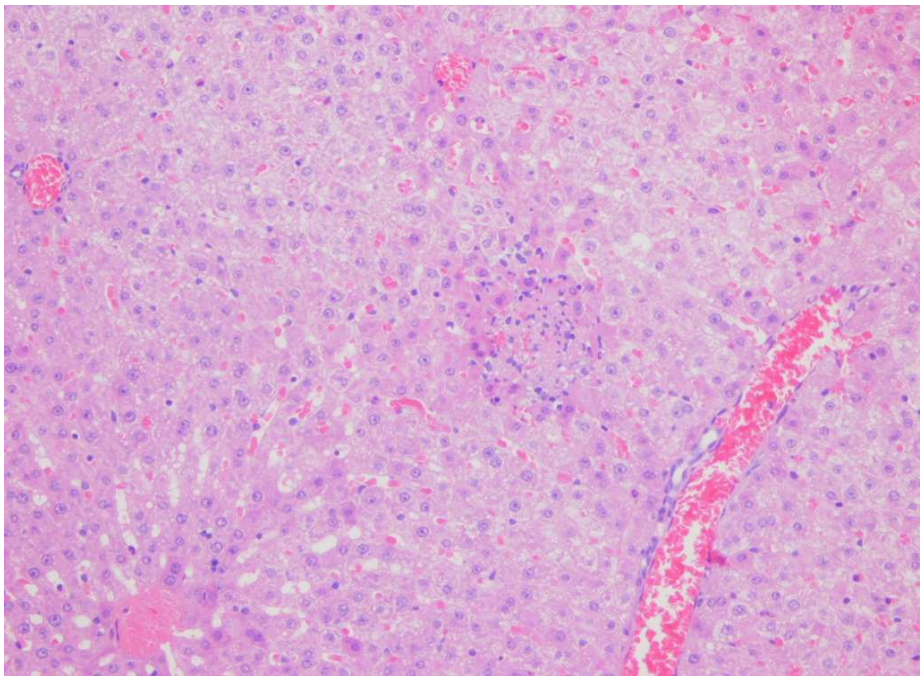
Resim 1. Sham grubunda histopatolojik incelemede normal görünümde olan hepatositler (HE, X100).



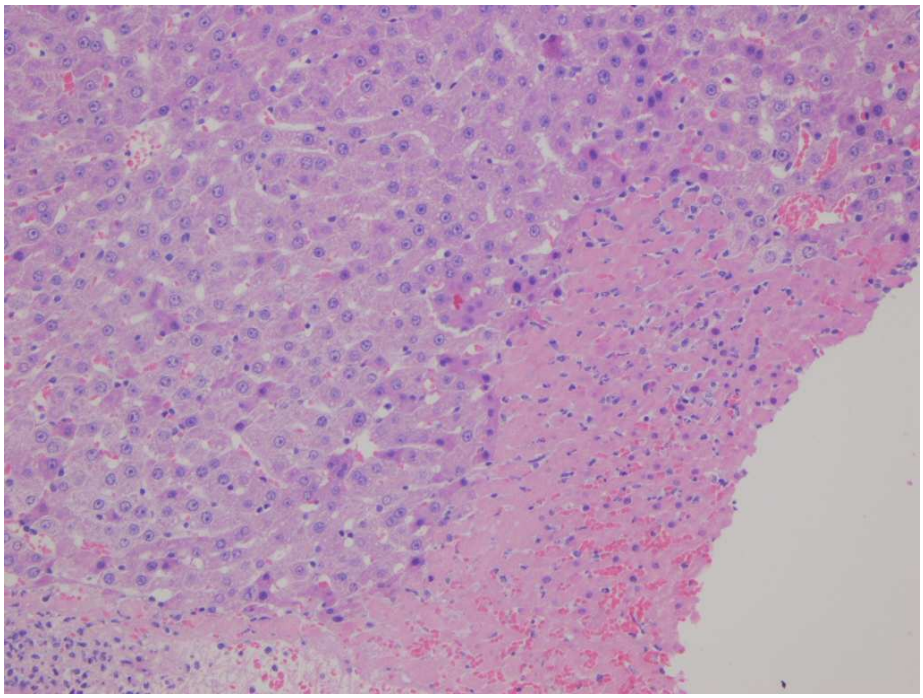
Resim 2. Everolimus grubunda histopatolojik incelemede normal görünümde olan hepatositler (HE, X100).



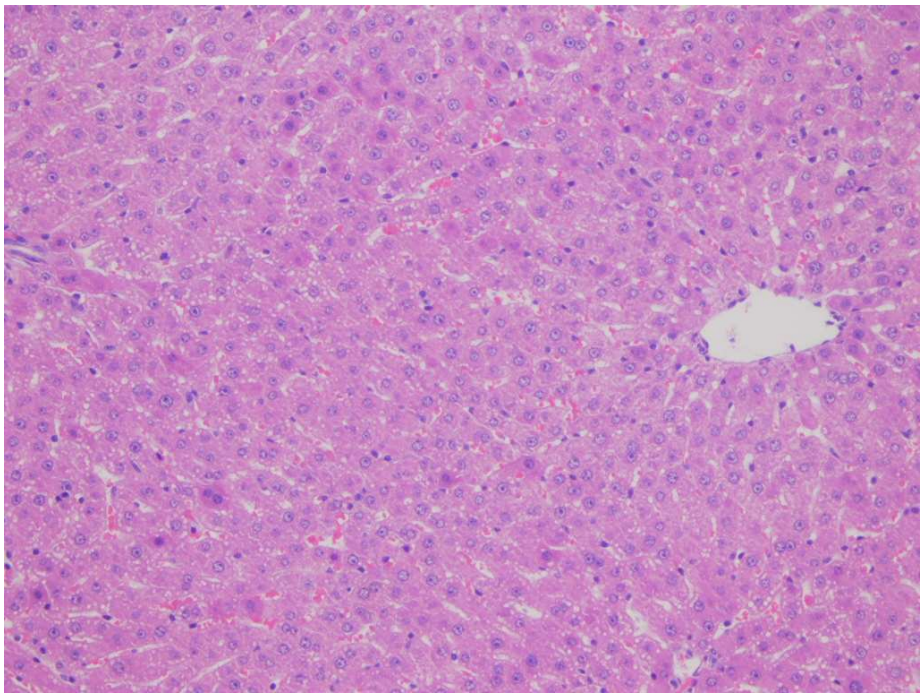
Resim 3. İ/R grubunda hepatositlerde izlenen yaygın konjesyon (HE, X100).



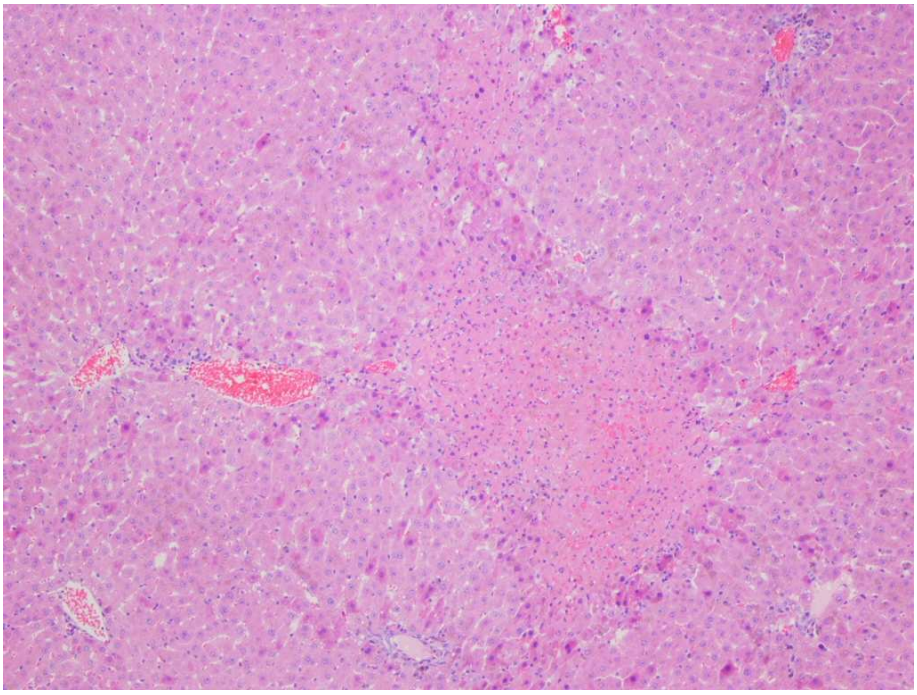
Resim 4. İ/R grubunda izlenen sinuzoidal dilatasyon, konjesyon ve hidropik dejenerasyon (HE, X100).



Resim 5. İ/R ve tedavi gruplarında izlenen subkapsüler nekroz (HE, X100).



Resim 6. Tedavi grubunda iki ratta izlenen normal histopatolojik görünüm (HE, X100).



Resim 7. Tedavi grubunda üç ratta izlenen intraparankimal nekroz (HE, X100).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

İskemi-reperfüzyon hasarı karaciğer cerrahisi sonrası meydana gelen hepatoselüler yaralanmanın en önemli nedenlerindendir. Transplantasyon cerrahisinde başarıyı belirleyen faktörlerden birisi de antijenden bağımsız olması nedeni ile de ayrıca önem taşıyan, operasyon sırasında yaşanan İ/R hasarıdır (170). Bu olay KC transplantasyonunun %10-20 oranında ciddi hepatik yetmezlik, akut-kronik rejeksiyon, erken retransplantasyon ve ölümle sonuçlanmasına neden olabilmektedir (171). Bu nedenle bu hasarın mekanizmalarının bilinmesi ve önlenmesi, transplantasyon cerrahisinin başarısını arttırmak açısından büyük önem taşımaktadır.

Hepatik İ/R sırasında KC'de endotelyel hücrelerde, kupfer hücrelerinde, mikrosirkulasyonda ve karaciğer parankiminde yaşanan değişikliklerin anlaşılması bu hasarı önlemek için çeşitli yöntemlerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Endotelyel hücrelerde vazokonstriktan (endotelin) ve preoksidan (NO) maddelerin salınımını engellemek amacı ile adenozin, endojen vazodilatör olan NO (171,172), yüksek doz N-Asetil sistein (173), S-Adenozin metionin, poliamin ve glutatyon prekürsörleri (174) gibi ajanlar denenmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır. İskemik süreçle birlikte aktive olan kupfer hücrelerinden salınan TNF α, SOR ve prokoagulan maddelere (175) karşı oluşturulan anti-TNF antikorlar ve antioksidanların da İ/R hasarından koruyucu etkileri gösterilmiştir. Transplantasyon cerrahisinde yaşanan soğuk iskemik süreçte hücre içerisine kalsiyum girişi ile birlikte intraselüler hücre yolakları aktive olmakta ve dokuda

geç hasar meydana gelmektedir (176). Bu sonuçtan yola çıkarak kullanılan verapamil gibi kalsiyum antagonistlerinin de İ/R hasarından koruyucu etkinliği gösterilmiştir (177). Medikal tedaviler dışında iskemik ön hazırlık olarak bilinen IPC (esas cerrahi işlem öncesinde kısa süreli oluşturulan İ/R hasarı) hepatik İ/R hasarından dokuyu koruma amaçlı kullanılan cerrahi bir yöntemdir (178).

Biz bu çalışmada makrolid grubu bir antibiyotik olan, böbrek ve kalp transplantasyonunda immunsupresif olarak kullanılan ve patogenezinde mTOR aktivasyonunun olduğu bazı malignensilerde (küçük hücreli akciğer kanseri, mide kanseri, metastatik renal hücreli kanser, insulinoma, over berrak hücreli adeno kanser ve metastatik pankreas kanseri gibi) tedavi amaçlı (179-187) denenen everolimusun mTOR yolağı üzerinden hepatik İ/R hasarından koruyucu etkisini göstermeyi amaçladık.

Antiinflamatuar ve immmunsupresif etkinliği olan everolimusu diğer immun supresiflerden ayıran en önemli özellik, etkisinin sadece IL-2 bağımlı proliferatif T hücreler ile sınırlı olmamasıdır. Hematopoetik olmayan hücreler kadar hematopoetik hücrelerdeki büyüme faktörü bağımlı proliferasyonu da inhibe etmekte ve hücrenin S fazına geçişini engelleyerek immunsupresif etki göstermektedir.

Everolimus antitümor etkisini daha önce de bahsedildiği gibi mTOR inhibisyonu ile gerçekleştirmektedir. mTOR; hem hücre büyümesini hem de hücre döngüsünü düzenleyen bir serin treonin kinazdır. Hipoksi varlığında oluşan sinyaller ile mTOR aktivasyonu gerçekleşmektedir. mTOR'u hedef alan ajanlardan sirolimus, önce FK506 bağlayıcı proteine (FKBP12) tutunmakta ve daha sonra bu kompleks

FKBP12-Rapamisin bağlayıcı bölgeye (FRB), mTOR komşuluğunda olan bir bölgedir, bağlanmaktadır. Sirolimus ve derivelerince (everolimus, temsirolimus gibi) hücre G1 fazında durdurularak apopitoz indüklenmekte ve antitümör etki ortaya çıkmaktadır. Everolimusun bu özelliklerine ek olarak antianjiogenik etkisi de bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda mTOR inhibitörlerinin neointima oluşumunu ve koroner stent uygulanması sonrasındaki restenozu azalttığı (188-194) gösterilmiştir. Everolimus gibi mTOR inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda endotelyal hücre ve fibroblast proliferasyonunun, TNF-α ilişkili IL-6'nın inhibisyonu ile engellendiği gösterilmiş ayrıca mTOR inhibitörleri ile baskılanan bazal arteriyel IL-6 sentezinin de erken dönemde transplant vaskulopatisini engelleyebileceği savunulmuştur (189,194).

Çalışmamızda deneysel akut hepatik İ/R modeli oluşturularak, everolimusun oksidan-antioksidan sistem ve hepatik histoloji üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sonuçta hepatoselüler hasarın göstergesi olan AST ve ALT düzeylerinde İ/R grubunda sham grubuna göre anlamlı artış saptanırken, everolimus+İ/R grubunda ise İ/R grubuna göre anlamlı azalma saptanmıştır. Bu veriler everolimusun biyokimyasal olarak hepatik İ/R hasarından dokuyu koruduğunu göstermektedir.

İskemik grupta görülen konjesyon, hidropik dejenerayon ve balonlaşma dejenerasyonunun, everolimus +İ/R grubunda anlamlı olarak daha az görülmesi, everolimusun hepatoselüler hasardan koruyucu etkiliğini histopatolojik olarak da desteklemektedir. Ancak her iki grupta da görülen (İ/R ve everolimus + İ/R) subkapsüler nekroza ek olarak everolimus+İ/R grubunda üç ratta intraparankimal nekroz saptanmıştır. Bu preperatlar tekrar incelendiğinde santral ven etrafındaki

hepatositlerin sağlıklı kaldığı, nekrozun daha periferde (alan 3) olduğu izlenmiştir. Çalışmamız sonuçlarında çelişki yaratan bu histopatolojik görünüme, İ/R hasarından koruyucu etkinliği gösterilmiş farklı ajanlar ile yapılmış çalışmalarda da rastlanmıştır. Oliveira ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, Verapamil ve Silymarin'in hepatik İ/R hasarından koruyucu etkinliği araştırılmış ve biyokimyasal veriler bizim çalışmamızda olduğu gibi ilacın etkin olduğu yönünde olmasına rağmen, histopatolojik incelemede steatoz, hepatoselüler balonlaşma, hepatoselüler nekroz ve portal inflamasyonda anlamlı fark olmadığı görülmüştür (195). Bu sonuç, çalışmada İ/R süresinin kısa tutulmasına ve deneklerin yeterli inflamatuar yanıtı vermemesine bağlanmıştır. Ancak bizim çalışmamızda literatürdeki diğer hepatik İ/R modellerine benzer şekilde ve önerilen uygun sürede iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulmuştur. Everolimusun doku dağılımı üzerine yapılan bir çalışmada en yüksek dağılım safra kesesi ve böbreklerde olur iken, karaciğer ve kalpte birbirlerine benzer ve en düşük düzeyde dağılım olduğu gösterilmiştir (196). Her ne kadar bizim çalışmamızda da subkapsüler nekroza ek olarak izlenen periferal nekroz, everolimusun emilim ve dağılımının yetersiz olduğunu düşündürmekteyse de biyokimyasal olarak karaciğer fonksiyonlarındaki belirgin düzelme bu düşünceyi desteklememektedir. Ayrıca, everolimusun bu düşük oranda dağılımına rağmen kalp transplantasyonunda başarı ile kullanılması ilacın etkinliğini tek başına dağılımın belirlemediğini göstermektedir. Çalışmamızda tedavi grubunda intraparankimal nekroz izlenmesine rağmen anlamlı biyokimyasal düzelme sağlanması; nekrozun sadece periferik alanda

olması, santral alana ilerleme göstermemesi ve yapılan histopatolojik incelemenin görsel değerlendirilmiş olması ile açıklanabilmektedir.

Hepatik İ/R hasar patogenezinde birçok faktör rol oynasa da, TNF-α bu patogenezde lökosit aktivasyon ve adezyonunu arttırarak, kaspaz aktivasyonu ile erken hücre ölümünü başlatarak, apopitoza ve nekroza neden olan önemli hücre dışı aracılarından birisidir (197). TNF-α, hepatik İ/R hasarında reperfüzyon süreci ile ilişkili olarak en erken salınan sitokinlerdendir. Reperfüzyon süresi uzadıkça ALT ve TNF- α düzeyleri birlikte artış göstermekte, TNF-α 3. saatte pik yapmakta ve düzeyi 24-48 saat yüksek kalabilmektedir (97). TNF-α'nın hepatik İ/R patofizyolojisindeki rolü 1990'ların başında Colletti ve ark. tarafından gösterilmiş (198), daha sonra bu ilişki birçok çalışma ile desteklenmiştir (199-204). Hepatik İ/R hasarından koruyucu etkileri gösterilen metilprednizolon (205), kanabinoid CB-1 reseptör antagonisti (rimonobant) (206), IPC (197), taurin (207), eritopoetin (208) ve ryanodin reseptör antagonistleri ile yapılmış çalışmalarda iskemi sırasında belirgin artan TNF-α düzeylerinde, reperfüyon sonrasında klinik ve histopatolojik iyileşme ile birlikte anlamlı azalma sağlanmıştır. Çalışmamızda da benzer şekilde iskemi grubunda sham grubuna göre anlamlı artış gösteren TNF- α düzeyinde, everolimus+İ/R grubunda İ/R grubuna göre anlamlı azalma olduğu görülmüştür. Ancak iskemi sonrası izlenen bu artış sadece hipotansif süreç ile ilişkilendirilmemektedir. Bu hipotezi destekleyen bir çalışma 1990'lı yıllarda yapılmış ve hepatik İ/R hasarı öncesi verilen anti-TNF antiserum ile doku hasarının histopatolojik olarak düzeldiği ancak reperfüzyon sonrası gelişen hipotansiyonun tedavi ile değişmediği görülmüştür (198). İ/R hasarında TNF-α

salınımını başlatan neden tam olarak bilinmese de kupfer hücrelerinin bu sitokinin salınımı tetiklediği düşünülmektedir. TNF-α'nın hepatik hasarın ciddiyetini gösterir bir parametre olduğunu düşündüren bazı çalışmalar da bulunmaktadır (209-211). Waage A. ve ark. meninjit tanısı almış hastalarda yüksek TNF-α düzeyinin mortalite ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde AST, ALT düzeyleri ile orantılı olarak TNF-α düzeyinde de artış saptanmış ve bu sonuç histopatolojik olarak da desteklenmştir. Ayrıca, TNF-α'nın tedavi grubunda anlamlı olarak baskılanmış olması, hepatik İ/R hasarında everolimusun güçlü antiinflamatuar etkisinin olduğunu desteklemektedir.

Karaciğer rejenerasyonunun gerçekleşmesi için hepatositlerin proliferatif kapasite kazanması ve G0 fazından G1 fazına geçmeleri gerekmektedir. Bu süreci düzenleyen en önemli 2 sitokin TNF-α ve IL-6'dır (212-214). Parsiyel hepatektomi sonrasında TNF-α'nın hepatositleri hücre döngüsüne sokması IL-6 aracılığı ile gerçekleşmektedir. IL-6 ile TNF-α ilişkisi hayvan deneyleri ile de desteklenmiştir. TNF-α'nın etkisini gösterdiği reseptör olan TNF-1 eksik farelerde ortama IL-6 eklenmesi ile rejenerasyon düzelmiş ancak IL-6 eksik farelerde TNF-α eklenmesi ile rejenerasyon ve hasar düzelmemiştir. Bu sonuç IL-6'nın karaciğer rejenerasyonunu başlatabilmesi için TNF-α'ya bağımlı olduğunu göstermiştir (214,215). IL-6 ile rejenerasyon hızı arasındaki ilişkiyi gösterir bir çalışmada, IL-6 eksik farelerde rejenerasyon kapasitesinde azalma ve hepatik hasarda artış görülmüştür. IL-6 eklenmesi ile de tüm hasar düzelmiş ve normal proliferatif yanıt sağlanmıştır (214,216). Benzer şekilde Lawlor ve ark. tarafından IL-6'nın anti-apopitotik olduğu ve hepatektomi sonrası karaciğerde rejenerasyonu arttırdığı

gösterilmiştir (218,219). Jin ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada kısa dönem (1-2 gün) IL-6 eklenmesi ile karaciğer kitlesinde ve rejenerasyonunda artış saptanırken, uzun dönem (5-7 gün) uygulamasının rejenerasyonu geciktirdiği gösterilmiştir (220). Benzer bir çalışmada IL-6 eklenmesi ile obez ratlarda rejenerasyon yanıtında artış gözlenirken, hiperstimulasyon ile hücre döngüsünde ilerlemenin durduğu izlenmiştir (221) İskemik ön hazırlık yönteminin kullanıldığı üç farklı hepatik İ/R çalışmasında farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bir çalışmada IPC ile IL-6 düzeyinde değişiklik olmadığı saptanırken (222), diğer çalışmada IPC ile hem IL-6 hem de ALT düzeyinde azalma saptanmış ve reperfüzyonunun 24.saatinde TNF-α düzeyinde azalma devam etmesine rağmen IL-6 düzeyi değişmemiştir (223). Bu sonuç IL6'nın daha çok proliferasyonda rolü olduğunu düşündürmektedir. Bir diğer çalışmada ise bizim sonuçlarımıza benzer şekilde hepatik İ/R öncesi IPC yapılan grupta IL-6 düzeyinde artış saptanmıştır (224) Ancak bizim çalışmamızda farklı olarak IL-6 ile ALT düzeyleri arasında klinik korelasyonu gösteren bir bağlantı bulunamamıştır. Crocket ve ark. cinsiyet ve IL-6 ilişkisini incelemiş ve bizim çalışmamızda da kullanıldığı üzere dişi ratlarda daha yüksek IL-6 düzeyi saptanmıştır (217). mTOR inhibitörleri ile yapılan bir çalışmada TNF ilişkili IL-6 sentezinin doz bağımlı azaldığı (225) ve bizim çalışmamızdaki gibi everolimusun kullanıldığı bir çalışmada da bazal IL-6 sentezinin everolimus ile azaldığı gösterilmiştir (225). Çalışmamızda da hepatik İ/R hasarında iskemik sürece karşı koruyucu ve proliferatif etkinliği bilinen IL-6 ile everolimus ilişkisine bakılmıştır. Hem İ/R hem de everolimus+İ/R grubunda IL-6 düzeyinde artış saptanmış ancak iki grup arasında anlamlı fark

saptanmamıştır. Bu sonuç IL-6'nın pleotropik biyolojik etki olarak bilinen hem promitojenik hem de anti-apopitotik etkisi nedeni ile şaşırtıcı olmamıştır (95,96). Her ne kadar IL-6'nın paradoksal etkili bir sitokin olduğu bilinse de, çalışmamızda everolimusun hepatik İ/R hasarında hem klinik hem de histopatolojik yararının gösterilmiş olması nedeni ile IL-6 düzeyinde anlamlı değişikliğin saptanmaması, paradoksal etkiye bağlı olabileceği gibi reperfüzyonun erken fazında örnek alınmamasından da kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Hepatik İ/R hasarından inflamatuar yanıt kadar serbest oksijen radikalleri de sorumludur (226,227). Çalışmamızda İ/R modellerinde hücre ölümünü başlatıcı rolü kanıtlanmış olan oksidatif stresi azaltarak dokuyu hasara karşı koruduğu düşünülen everolimusun antioksidan sistem üzerine etkisi araştırılmıştır (228) Hepatik iskemi ile birlikte erken reperfüzyon fazında reaktif oksijen oluşumunun esas kaynağı olan kupfer hücreleri aktive olarak, erken reperfüzyon sürecinde vasküler reaktif oksijen üretimine neden olmaktadırlar (229). Kupfer hücre ilişkili oksidan stese ek olarak, iskemik süreç uzadıkça NADPH oksidazın bileşenleri de hücre yüzeyine çıkarak reaktif oksijen üretimini arttırmaktadır. Reaktif oksijen radikalleri gibi aktive nötrofiller de serbest oksijen radikalleri, TNF-α ve IL-8 gibi kemotaktik moleküllere potansiyel kaynak oluşturmaktadır (230,231). Her ne kadar serbest radikallerin yarı ömrünün kısa olması, karaciğer hasarı ile olan ilişkilerinin gösterilmesini zorlaştırmaktadıysa da, çalışmamızda hepatik İ/R hasarında antioksidan etkinliği olduğu düşünülen everolimusun, SOD ve MDA ile ilişkileri araştırılmıştır (232-237).

SOD; reaktif oksijen metabolizması kaskadının birinci basamağında bulunan ve superoksid radikalleriden hücreyi hasara karşı koruyan bir enzimdir. Yapılan çalışmalarda reperfüzyon sırasında oluşan serbest oksijen radikallerinin graft yetmezliği ve rejeksiyona neden olduğu gösterilmiştir. SOD gibi serbest oksijen radikallerini temizleyen enzimler, hepatik oksidatif stresi azaltmakta ve hepatik İ/R hasarından ve transplante dokuda yetmezlikten organı korumaktadırlar (238-240). Taurin (208), COX2 inhibitörleri (241), glutatyon (242-244), N-Asetil sistein (245) ve polienilfosfotidilkolin (PPC) gibi hepatik iskemi reperfüzyon hasarından koruyucu etkinliği gösterilmiş ajanlarda antioksidan etki araştırılımış ve hepsinde de anlamlı olarak artmış SOD düzeyleri saptanmıştır. Chen ve ark. (246) yaptığı bir çalışmada İ/R hasarı sonrası artan SOD ve katalazın dokuda oluşan oksijen radikallerinden korunmak için sentezlendiği savunulmuştur. Song ve ark. kadavra donörlerde masif NO üretimi ve sinüzoidlerdeki peroksinitrit ilişikili apopitozun ekzojen SOD ile anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir (247). Bir diğer çalışmada curcumin sonrası oluşturulan hepatik İ/R hasarında kontrol grubuna göre SOD düzeyinde anlamlı artış, MPO düzeyinde anlamlı azalma olması nedeni ile curcuminin antioksidan sistem üzerinden koruyucu etkinliği olduğu gösterilmiştir (258) Suematsu ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada hepatosit apopitozunun GdCl3 ya da anti TNF ile değil sadece SOD ile önlenebildiği, sonuçta hepatosit apopitozunu serbest oksijenin indüklediği savunulmuştur (249) Bizim çalışmamızda da İ/R hasarı sonrası artan SOD düzeyinde everolimus+I/R grubunda anlamlı azalma sağlanmıştır.

MDA ise serbest oksijen radikallerince oluşturulan, hücre membran geçirgenliğinde değişikliğe ve protein yıkımda artışa neden olan, hücreyi lizise götürebilen lipid peroksidasyonunun dokudaki hasarını göstermek amacı ile kullanılmaktadır (250,251). Taurin (207) ve eritropoetin (208) ile yapılan iki farklı çalışmada hepatik İ/R hasarından koruyucu etkinlik TNF-α düzeyinde azalma ile birlikte MDA düzeyindeki artış ile gösterilmiştir. Curcuminin İ/R hasarından koruyucu antioksidan etkisinin gösterildiği çalışmada, İ/R grubunda artan MDA düzeyi, tedavi sonrası anlamlı azalma göstermiştir. Bizim çalışmamızda da benzer şelikde İ/R hasarı sonrası artan doku MDA düzeyi, everolimus+İ/R grubunda anlamlı azalma göstermiştir. Bu sonuç, everolimusun hepatik İ/R hasarı öncesi uygulanmasının antioksidan sistemi uyararak hasarı engellendiğini düşüdürmektedir. Çalışmamızda elde edilen bulgular, everolimusun bilinen anti-inflamatuar, immmunsupresif, anti-tümör ve anti-anjiogenik özelliklerine ek olarak oksidan-antioksidan sistem üzerine de etkili olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, everolimusun hepatik İ/R hasarında antiinflamatuar ve antioksidan etkileri ile dokuyu koruyucu etki göstermesi nedeni ile karaciğer transplantasyonu başta olmak üzere bu hasarın yaşandığı tüm cerrahi işlemlerde koruyucu etki göstereceği düşünülmektedir.

8. ÖZET

İskemi-reperfüzyon hasarı karaciğer cerrahisi sonrası meydana gelen hepatoselüler yaralanmanın en önemli nedenlerindendir. Transplantasyon cerrahisinde başarıyı belirleyen faktörlerden birisi de operasyonlar sırasında yaşanan İ/R hasarıdır. Bu olay karaciğer transplantasyonunun %10- 20 oranında ciddi hepatik yetmezlik, akut-kronik rejeksiyon, erken retransplantasyon ve ölümle sonuçlanmasına neden olabilmektedir. Hepatik İ/R hasarından koruyucu mekanizmaların bilinmesi ve önlenmesi, transplantasyon cerrahisinin başarısını arttırmak açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada makrolid grubu bir antibiyotik olan, mTOR inhibisyonu ile böbrek ve kalp transplantasyonunda immunsupresif olarak kullanılan everolimusun hepatik İ/R hasarından koruyucu etkinliği araştırılmıştır.

Çalışmamızda toplam 24 adet 200-250 gram ağırlığında Winstar albino dişi sıçan kullanıldı. Denekler dört gruba ayrıldı. Grup I; sham (kontrol) grubu olup medikal tedavi uygulanmadan sadece laparatomi uygulanarak kan ve karaciğer doku örnekleri alındı. Grup II; İ/R grubu olup bu gruptaki deneklere de herhangi bir tedavi verilmedi. Hepatik arter, portal ven ve safra yolu ortaya çıkartılarak atravmatik vasküler klemp ile 60 dakika boyunca iskemi uygulandı. 24 saatlik reperfüzyon sonrasında laparatomi yapılarak kan ve karaciğer doku örnekleri alındı. Grup III; everolimus grubu olup bu gruptaki deneklere 7 gün boyunca 1.5 mg/kg/gün dozunda peroral everolimus tedavisi verildi ancak iskemi modeli

oluşturulmadı. Tedavi bitiminde laparatomi yapılarak kan ve karaciğer doku örnekleri alındı.

Grup IV; everolimus + İ/R (tedavi) grubu olup bu gruptaki deneklere 7 gün boyunca 1.5 mg/kg/gün dozunda peroral everolimus tedavisi verildi. Tedavi bitiminde 8. günde, grup III'e uygulanan aynı yöntemle İ/R uygulandı ve 24 saatlik reperfüzyon sonrası kan ve doku örnekleri alındı.

Tedavi etkinliğini göstermek amacıyla serum AST, ALT, albumin, IL-6, TNF-α doku MDA ve SOD düzeylerine bakıldı. Alınan doku örneklerinden histopatolojik inceleme yapıldı.

Sonuçta, tedavi grubunda histopatolojik incelemede üç ratta intraparankimal nekroz izlenmesi düşündürücü olsa da, biyokimyasal olarak anlamlı düzeyde iyileşme sağlanması everolimusun hepatik İ/R hasarından koruyucu olduğunu desteklemektedir.

9. SUMMARY

Ischemia-reperfusion (I/R) injury is one of the mot common ethyology of hepatocellular damage occure after liver surgery. Achievement of transplantation surgery is depends on I/R injury during operation. This issue can be resulted as fulminant hepatic failure, acute-chronic rejection, early retransplantaion and death by a ratio of 10-20 %. So, recognizing and preventing the mechanisms of hepatic I/R injury, is important for increasing the success of transplantation surgery.

In this study, we investigate the protective effect of everolimus in hepatic I/R injury which is an macrolide antibiotic and also an immunsupressive drug for heart and kidney transplantation by mTOR inhibition.

We used 24 female Winstar albino rat with a weight of 200-250 gr. The animals were randomized into four groups. Group I; sham (control) group whom didn't given medical treatment, only laparotomy was performed and blood and liver tissue samples were collected. Group II; I/R group whom also didn't't given medical treatment. An atravmatic clip was used to prevent blood supply to the left lateral and median lobes of liver. After 60 minutes of hepatic ischemia, the clip was removed to recover hepatic reperfusion for 24 hours and blood and liver tissue samples were collected. Group III; I/R group whom were treated with 1.5 mg/kg/day everolimus peroral without performing ischemia. After 7 days blood and liver tissue samples were collected. Group IV; everolimus + I/R (treatment) group whom were treated with 1.5 mg/kg/day peroral everolimus .After 7 days of

treatment, ischemia were performed as explained above and days blood and liver tissue samples were collected.

To show the efficiency of treatment AST, ALT, albumin, IL-6, TNF-α, tissue MDA and SOD levels were investigated. Histopathological investigation was performed from tissue samples.

In conclusion; athough in histopathological investigation, establishing intraparanchimal necrosis in three rats from treatment group is challenging, istatistical significant recovery in biochemical results supports the efficiency of everolimus in hepatic I/R injury.

10. KAYNAKLAR

1) Bissel DM. Maher JJ. Hepatik fibrosis and cirrhosis: Zakim D, Boyer TD, editors. A Textbook of Liver Disease. Philadelphia: W.B.Sounders Company. 1996; 506.

2) Tulunay Ö. Kronik viral hepatit patolojisi: Kılıçturgay K, Badur S editorler. Viral Hepatit 2001.İstanbul 2001; 317.

3) Bissell DM, Roll J. Connective tissue metabolism and hepatic fibrosis. Zakim D,Boyer TD, editors. Hepatology: A Textbook of Liver Disease. Philadelphia: W.B. Saunders.1990; 454.

4) Sherlock S, Dooley J. Anatomy and Function. In: Sherlock S, Dooley J, editors. Diseases of the Liver and Biliary System 10th edition. Oxford: Blackwell Science Ltd,1997:1-15.

5) Coppel JA, Brown SA, Perry DJ. Veno-occlusive disease: cytokines, genetics, and haemostasis. Blood Reviews 2003; 17: 63-70.

6) Mitra V, Metcalf J: Metabolic functions of the liver. Anaesthesia and intensive care medicine 2009; 10: 334-5.

7) Trey C. Davidson CS. The management of fulminant hepatic failure. In: Popper H, Schaffner F, editors. Progress in Liver Disease. New York, NY: Grune & Stratton; 1970; 282-98.

8) Ritt DJ, Whelan G, Werner DJ, Eigenbrodt EH, Schenker S, Combes B. Acute hepatic necrosis with stupor or coma. An analysis of thirty-one patients. Medicine 1969; 48: 151-72.

9) Sarin SK, Kumar A, Almeida JA, Chawla YK, Fan ST, Garg H,et al. Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the Study of the liver (APASL). Hepatol Int 2009; 3: 269-82.

10) Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. Hepatology 2001; 33: 464-70.

11) Polson J, Lee WM. American Association for the Study of Liver Disease. AASLD Position Paper: the management of acute liver failure. Hepatology 2005; 41: 1179-97.

12) Viruet EJ, Torres EA. Steroid therapy in fulminant hepatic failure secondary to autoimmune hepatitis. P R Health Sci J 1998; 17: 297-300.

13) Rodriguez Farina E, Tremosa Llurba G, Xiol Quingles X, Lores Obradors A, Castellote Alonso J, Gornals Soler JB, et al. D-penicillamine and plasmapheresis in acute liver failure secondary to Wilson's disease. Rev Esp Enferm Dig 2003; 95: 60-5.

14) Tillmann HL, Hadem J, Leifeld L, Zachou K, Canbay A, Eisenbach C, et al. Safety and efficacy of lamivudine in patients with severe acute or fulminant hepatitis B, a multicenter experience. J Viral Hepat 2006; 13: 256-63.

15) Peters DJ, Greene WH, Ruggiero F, McGarrity TJ. Herpes simplexinduced fulminant hepatitis in adults: a call for empiric therapy. Dig Dis Sci 2000; 45: 2399-04.

16) Ascher NL, Lake JR, Emond JC, et. al. Liver transplantation for fulminant hepatic failure. Arch Surg1993; 128: 677-82.

17) Farmer DG, Anselmo DM, Ghobrail RM, et al. Analyzing liver transplantation for fulminant hepatic failure at UCLA: a retrospective look at 18 years' experience. Ann Surg2003; 237: 666-76.

18) Lee WM, Squires RH Jr, Nyberg SL, Doo E, Hoofnagle JH. Acute liver failure: Summary of a workshop. Hepatology. 2008; 47: 1401-15.

19) Blankenstejin JD, Terpstra OT. Liver preservation: the past and the future. Hepatology 1990: 13: 1235-50.

20) Clavien PA, Harvey PRC, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. Transplantation 1992; 53: 957-78.

21) Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. J Hepatol 1996; 25: 774-80.

22) Lieber CS. Alcohol and the liver: 994 update. Gastroenterology 1994; 106: 1085-105.

23) Hochachka PW. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. Science 1986; 231: 234-41.

24) Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. Free Rad Res Comm 1991; 15: 277-84.

25) Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. Am J Physiol 1991; 260: 335-62.

26) Caldwell-Kenel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after strorage of rat livers: effects of reperfusion. Hepatology 1991; 13: 83-95.

27) Mochida S, Arai M, Ohnon A, Masaki N, Ogata I, Fujiwara K. Oxidative stress in hepatocytes and stimulatory state of Kupffer cells after reperfusion differ between warm and cold ischemia. Liver 1994; 14: 234-40.

28) Rymsa B, Wang JF, de Groot H. O2 release by activated Kupffer cells upon hypoxia-reoxygenation. Am J Physiol 1993; 26: 801-9.

29) Okuaki Y, Miyazaki H, Zeniya M, Ishikawa T, Ohkawa Y, Tsuno S, et al. Splenectomy-reduced hepatic injury induced by ischemia-reperfusion in the rat. Liver 1996; 16: 188-94.

30) Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. Am J Surg. 2002; 184: 84.

31) Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, et al. Hepaic microcirculatory perfusion failure is a determinant for liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. Am J Pathol 1994; 145: 142-3.

32) Marzi I, Takei Y, Rüker M, et al. Endotelin-1 is involved in hepatic sinusoidal vasoconstriction after ischemia and reperfusion. Transplant Int 1994; 7: 503-6.

33) Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liverin vivo. FASEB J 1990; 4: 3355-9.

34) Yadav SS, Howell DN, Gao W, et al. L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrohil adhesion in the warm ischemic mouse liver. Am J Physiol 1998; 275: 1341-52.

35) Cywes R, Packham MA, Tietze L, et al. Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat. Hepatology 1993; 18: 635-47.
36) Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol. 1994; 267: 786-93.
37) Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leukocyte stasis in heatic sinusoids. Am J Physiol 1996; 270: 798-803.
38) Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003; 284: 15-26.
39) Pretto EA Jr. Reperfusion injury of the liver. Transplant Proc 1991; 23: 1912-4.
40) Casillas-Ramirez A, Mosbah IB, Ramalho F, Rosello-Catafau J, Peralta C. Past and future approachesto ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. Life Sci. 2006; 79: 1881-94.
41) Lemasters JJ, Ji S, Thurman RG. Centrilobular injury following hypoxia in isolated, perfused rat liver. Science 1981; 213: 661-3.
42) Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat.Hepatology 1996; 23: 506-14.
43)Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M, Oshima A, Shito M, Kawachi S,Karahashi T, KumamotoY, Yoshida M, Kitajima M. Up-regulation of oxygen-derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. Transplantation 1997; 64: 1398-403.
44) Montalvo-Jave et al. Page 6 J Surg Res. Author manuscript; available in PMC 2008.
45) Cavalieri B, Perrelli MG, Aragno M, Ramadori P, Poli G, Cutrin JC. Ischaemic preconditioning modulates the activity of Kupffer cells during in vivo reperfusion injury of rat liver. Cell Biochem Funct 2003; 21: 299-305.
46) Cutrn JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Rosell Catafau J, Poli G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. Free Radic Biol Med 2002; 33: 1200-8.

47) . Tsukamoto H. Redox regulation of cytokine expression in Kupffer cells. Antioxid Redox Signal2002; 4: 741-8.

48) Shiratori Y, Kiriyama H, Fukushi Y, et al. Modulation of ischemia-reperfusion-induced hepatic injury by Kupffer cells. Dig Dis Sci 1994; 39: 1265-72.

49) Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats. J Leukoc Biol 1992; 52: 377-82.

50) Cutrn JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Rosell Catafau J, Poli G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. Free Radic Biol Med 2002; 33: 1200-8.

51) Tsukamoto H. Redox regulation of cytokine expression in Kupffer cells. Antioxid Redox Signal 2002; 4: 741-8.

52) Tomiyama K, Ikeda A, Ueki S, Nakao A, Stolz DB, Koike Y, et al. Inhibition of Kupffer cell-mediated early proinflammatory response with carbon monoxide in transplant-induced hepatic ischemia/reperfusion injury in rats Hepatology. 2008; 48: 1608-20.

53) Caldwell-Kenkel C, Currin RT, Tanaka Y, et al. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfsion. Hepatology 1991; 13: 83-95.

54) Carles J, Fawaz R, Hamoudi NE, et al. Preservation of human liver grafts in UW solution. Ultrastructural evidevce for endothelial and Kupffer cell activation during cold ischemia and after ischemia-reperfusion. Liver 1994; 14: 50-6.

55) Shiratori Y, Kiriyama H, Fukushi Y, Nagura T, Takada H, Hai K, et al. Modulation of ischemiareperfusion- induced hepatic injury by Kupffer cells. Dig Dis Sci 1994; 39:1265-72.

56) Gopolan PK, Smith CW, Lu H, et al. Neutrophil CD 18- dependent arrest on intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow can be activated through L-selectin. J Immunol 1997; 158: 367-75.

57) Pober JS. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium:physiology and pathology. Am J Pathol 1998; 133: 426-33.

58) Farhood A, McGurie GM, Manning AM, et al. Intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia reperfusion injury in rat liver. J Leukoc Biol 1995; 57: 368-74.

59) Marubayashi S, Oshiro Y, Maeda T,et al. Protective effect of monoclonal antibodies to adhesion molecules on rat liver ischemia-reperfusion injury. Surgery 1997; 122: 45-52.

60) Nakano H, Kuzume M, Namatame K, et al. Efficacy of intraportal injection of anti-ICAM-1 monoclonal antibody against liver cell injury following warm ischemia in the rat. Am J Surg 1995; 170: 64-6.

61) Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intracellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. Surgery 1995; 117: 195-200.

62) Nishimura Y, Takei Y, Kawano S, et al. The $F(ab')_2$ fragment of an anti-ICAM-1 monoclonal antibody attenuates liver injury after orthotopic liver transplantation. Transplantation 1996; 61: 99-104.

63) Nakano H, Nagsakai H, Barama A, et al. The effects of N-acetylcysteine and anti-intracellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody against ischemia-reperfusion injury of the rat steatotic liver produced by a choline-methionine-deficient diet. Hepatology 1997; 26: 670-8.

64) Kiuchi T, Oldhafer KJ, Schlitt HJ, et al. Background and prognostic implications of perireperfusion tissue injuries in human liver transplants: a panel histochemical study. Transplantation 1998; 66: 737-47.

65) Scoazec J, Durand F, Degott C, et al. Expression of cytokine-dependent adhesion molecules in postreperfusion biopsy specimens of liver allografts. Gastroenterology 1994; 107: 1094-102.

66) Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien PA. Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. Gastroenterology 2000;118:183-91.

67) Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, Gachet C, Bader M, Clavien PA. Platelet derived serotonin mediates liver regeneration. Science 2006; 312:104-7.

68) Fong Y, Moldawer LL, Shires GT, Lowry SF. The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical injury. Surg Gynecol Obstet 1990; 170: 363-78.

69) Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. Crit Care Med 1993; 21: 447-63.

70) Streieter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of tumour necrosis factor in disease states and inflammation. Crit Care Med 1993; 21: 447-63.

71) Morariu AM, Loef BG, Aarts LP, Rietman GW, Rakhorst G, van Oeveren W, et al. Dexamethasone: benefit and prejudice for patients undergoing on-pump coronary artery bypass grafting: a study on myocardial, pulmonary, renal, intestinal, and hepatic injury. Chest 2005; 128: 2677-87.

72) Chen X, Kidder LS, Schmidt AH, Lew WD. Osteogenic protein-1 induces bone formation in the presence of bacterial infection in a rat intramuscular osteoinduction model. J Orthop Trauma 2004; 18: 436-42.

73) Shibuya H, Ohkohchi N, Tsukamoto S, Satomi S. Tumor necrosis factor-induced, superoxidemediated neutrophil accumulation in cold ischemic/reperfused rat liver. Hepatology 1997; 26: 113- 20.

74) Arii S, Monden K, Adachi Y, Zhang W, Higashitsuji H, Furutani M, Mise M, Fujita S, Nakamura T, Imamura M. Pathogenic role of Kupffer cell activation in the reperfusion injury of cold-preserved liver. Transplantation 1994; 58: 1072-7.

75) Czaja MJ, Xu J, Alt E. Prevention of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by soluble tumor necrosis factor receptor. Gastroenterology 1995; 108: 1849-54.

76) Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Tiegs G, Germann PG, Wendel A. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apopitosis precedes liver failure in experimental murine shock models. Am J Pathol. 1995; 146: 1220-34.

77) Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the tumor necrosis receptor superfamily. Oncogene 1998; 17: 3261-70.

78) Wanner GA, Ertel W, Muller P. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response thrugh Kupffer cell activation. Shock 1996; 5: 34-40.

79) Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M. Up-regulaion of oxygen-derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. Transplantation 1997; 64: 1398-403.

80) Colletti 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: 506-14.

81) Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. J Gastroenterol Hepatol. 2003; 18: 891-902.

82) Shito M, Wakabayashi G, Ueda M, et al. Interleukin 1 receptor blockade reduces tumour necrosis factor production,tissue injury,and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in tha rat. Transplantation 1997; 63: 143-8

83) Clavien PA, Camargo CA, Gorczynski R. Acute reactant cytokines and neutrophil adhesion after warm ischemia in cirrhotic and non-cirrhotic human livers. Hepatology 1996; 23: 1456-63.

84) Streetz KL, Tracke F, Leifeld L, Wustefeld T, Graw A, Klein C, et al. Interleukin 6/gp 130-dependent pathways and protective during chronic liver diseases. Hepatology 2003; 38: 218-29.

85) Streetz KL, Wustefeld T, Klein C, Kallen KJ, Tronche F, Betz UA, et al. Lack of gp130 expression n hepatocytes promotes liver injury. Gastroenterology 2003; 125: 532-43.

86) Wuestefeld T, Klein C, Steetz KL, Beraza N, Scholmerich J, Burgart LJ, et al. Lack of gp130 expression results in more bacterial infection and higher mortality during chronic cholestasis in mice. Hepatology 2005; 42: 1082-90.

87) Noma Y, Sideras P, Naito T, Bergstedt-Lindquist S, Azuma C, Severinson E, et al. Cloning of cDNA encoding the murine IgG1 induction factor by a novel strategy using SP6 promoter. Nature 1986; 319: 640-6

88) Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. Cell 1990, 63: 1149-57

89) Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. Immunity 1997; 6: 315-25

90) Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, et al. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. Immunity 2001; 14: 705-14

91) Giraudo E, Arese M, Toniatti C, Strasly M, Primo L, Mantovani A, Ciliberto G, Bussolini F: IL-6 is an in vitro and in vivo autocrine growth factor for middle T antigen-transformed endothelial cells. J Immunol 1996; 157: 2618-23.

92) Camargo CA Jr, Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. Hepatology 1997; 26: 1513-20.

93) Muraoka KI, Shimizu K, Sun X. Hypoxia, but not reoxygenation, induces IL-6 gene expression through NF-kβ activation. Transplantation 1997; 63: 466-70.

94) De Groot H, Anundi I, Littauer A. Hypoxia-reoxygenation injury and the generation of reactive oxygen in isolated hepatocytes. Biomed Biochim Acta 1989; 48: 11-15.

95) Taub R. Hepatoprotection via the IL-6/STAT3 pathway. J Clin Invest 2003; 112: 978-80.

96) Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine recepors. Oncogene 2000; 19: 2548-56.

97) Teoh N, Field J, Farrell G. Interleukin-6 is a key mediator of the hepatoprotective and pro-proliferative effects of ischaemic preconditioning in mice. J Hepatol. 2006; 45: 20-7

98) Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kβ. Hepatology 1999; 30: 203-8.

99) Yoshimura T, Matsushima K, Oppenheim JJ. Neutrophil chemotactic factor produced by LPS-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and seperation from IL-1. J ımmunol. 1987; 1239: 788-93.

100) Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. J Surg Res 2002; 105: 248-58.

101) Toledo-Pereyra LH, Toledo AH, Walsh J, Lopez-Neblina F. Molecular signaling pathways in ischemia/reperfusion. Exp Clin Transplant 2004; 2:174-7.

102) Videla LA, Fernandez V. Biochemical aspects of cellular oxidative stress. Arch Biol Med Exp (Santiago) 1988; 21: 85-92.

103) Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. Gastroenterology 2003; 125: 917-36.

104) Fong Y, Moldawer LL, Shires GT, Lowry SF. The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical injury. Surg Gynecol Obstet 1990; 170: 363-78.

105) McCord JM. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. Fed Proc 1987; 46: 2402-6.

106) Nordstrom G, Seeman T, Hasselgren PO. Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. Surgery 1985; 97: 679-84.

107) Kusumoto K, Morimoto T, Minor T, Uchino J, Isselhard W. Allopurinol effects in rat livertransplantation on recovery of energy metabolism and free radical-induced damage. Eur Surg Res 1995; 27: 285-91.

108) Koeppel TA, Lehmann TG, Thies JC, Gehrcke R, Gebhard MM, Herfarth C, Otto G, Post S. Impact of N-acetylcysteine on the hepatic microcirculation after orthotopic liver transplantation. Transplantation 1996; 61:1397-402.

109) Marubayashi S, Dohi K, Ochi K, Kawasaki T. Protective effects of free radical scavenger and antioxidant administration on ischemic liver cell injury. Transplant Proc 1987; 19: 1327-8

110) Marubayashi S, Dohi K, Yamada K, Kawasaki T. Changes in the levels of endogenous coenzyme Q homologs, alpha-tocopherol, and glutathione in rat liver after hepatic ischemia and reperfusion, and the effect of pretreatment with coenzyme Q10. Biochim Biophys Act 1984; 797: 1-9.

111) Clemens MG. Nitric oxide in liver injury. Hepatology 1999; 30: 1-5.

112) Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G. Liver sinusoidal endthelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. J. Clin. Invest. 1997; 100: 2923-30.

113) Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathic RT: Hepatic ischemia-reperfusion injury. Am J. Surg. 2001; 181: 160-6.

114) Peralta C, Hotter G, Closa D et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A_2 receptors. Hepatology 1999; 29: 126-32.

115) Koeppel TA, Thies JC, Schemmer P. Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. J. Hepatol 1997; 27: 163-9.

116) Kim YM, de Vera ME, Watkins SC. Nitric oxide protects cultured hepatocytes from tumor necrosis factor-α-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. J. Biol. Chem 1997; 272: 1402-11.

117) Sergent O, Griffon B, Morel I. Effect of nitric oxide on iron-mediated oxidative stres in primary hepatocyte culture. Hepatology 1997; 25: 122-7.

118) Colletti LM, Kunkel SL, Wals A. Chemokine expression during hepatic ischemia/reperfusion induced lung injury in the rat. The role of epithelial neutrophil activating protein. J. Clin. Invest 1995; 95: 134-41.

119) Lichtman SN, Lemasters JJ. Role of cytokines and cytokine-producing cells in reperfusion injury to the liver. Sem. Livr Dis 1999; 19: 171-87.

120) Lntsch AB, Yoshidome H, Cheadle WG. Chemokine involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice:roles for macrophage inflammatory protein-2 and Kupfer cells. Hepatology 1998; 27: 507-12.

121) Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. Am J Physiol 1993; 264: 801-9

122) Collard CD, Lekowski R, Jordan JE, Agah A, Stahl GL. Complement activation following oxidative stress. Mol Immunol 1999; 36: 941-8.

123) Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. Ann Surg 1991; 213: 137-42.

124) . Wullaert A, van Loo G, Heyninck K, Beyaert R. Hepatic TNF signaling and NF-{kappa}B: effects on liver homeostasis and beyond. Endocr Rev. 2007; 28: 365-86.

125) Kitakaze M, Hori M, Sato H, Takashima S, Inoue M, Kitabatake A, Kamada T. Endogenous adenosine inhibits platelet aggregation during myocardial ischemia in dogs. Circ Res 1991; 69: 1402-8.

126) Ward PA, Cunningham TW, McCulloch KK, Johnson KJ. Regulatory effects of adenosine and adenine nucleotides on oxygen radical responses of neutrophils. Lab Invest 1988; 58: 438-47.

127) McKie LD, Bass BL, Dunkin BJ, Harmon JW. Nitric oxide mediates the blood flow response to intravenous adenosine in the rabbit. Circ Shock 1994; 43: 103-6

128) Van Belle H, Goossens F, Wynants J. Formation and release of purine catabolites during hypoperfusion, anoxia, and ischemia. Am J Physiol 1987; 252: 886-93.

129) Takaba M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusin injury of the rat kidney. Inhibition b a soluble P-selectin ligand. J. Clin. Invest 1997; 99: 2682-90.

130) Adams DH, Hubscher SG, Fisher NC, Williams A, Robinson M. Expression of E- selectin and E-selectin ligands in human liver transplantation. Hepatology 1996; 24: 533-8.

131) Adams DH, Burra P, Hubscher SG, Elias E, Newman V. Endothelial activaton and circulating vascular adhesion molecules in alcoholic liver disease. Hepatology 1994; 19: 588-94.

132) Sawaya DA, Zibari GB, Minardi A et al. P-selectin contributes to the initial recruitment of Rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia/reperfusin. Shock 1999; 12: 227-32.

133) Singh I, Zibari GB, Brown MF et al. Role of P-selectin in hepatic ischemia and reperfusion injury. Clin. Transplant 1999; 13: 76-82.
134) Springer TA. Adhesion receptor of the immune system. Nature 1990; 346: 425-34.
135) Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion mlecules. Ann Rev. Immunol 1993; 11: 767-804.
136) Marubayashi S, Oshiro Y, Fukuma A, Akada K, Maeda T, Kumada K. Protective effect of monoclonal antibodies to adhesion molecules on rat liver ischemia-reperfusion injury. Transplant Proc. 1999; 31: 1054.
137) Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. Shock 2004; 21: 401-9.
138) Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. Gastroenterology 2003; 125: 917-36.
139) Rudiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. Gastroenterology 2002;122: 202-10.
140) Natori S, Selzner M, Valentino KL, Fritz LC, Srinivasan A, Clavien PA, et al. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. Transplantation 1999; 68: 89-96.
141) Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, Crenesse D, Rostagno P, Maulon L et al. A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. Faseb J 1999; 13: 253-61.
142) Bilbao G, Contreras JL, Eckhoff DE, Mikheeva G, Krasnykh V, Douglas JT, Thomas FT, Thomas JM, Curiel DT. Reduction of ischemia-reperfusion injury of the liver by in vivo adenovirusmediated gene transfer of the antiapoptotic Bcl-2 gene. Ann Surg 1999; 230: 185-93.
143) Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemiareperfusion in rats: apoptosis or necrosis? Hepatology 2001; 33: 397-405.
144) Lemasters JJV. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. Am J Physiol 1999; 276: 1-6

145) Cursio R, Gugenheim J, Panaia-Ferrari P, Lasfar A, Tovey M, Chastanet S, Saint-Paul MC, Fere C, Mouiel J. Improvement of normothermic rat liver ischemia/reperfusion by muramyl dipeptide. J Surg Res 1998; 80: 339-44.

146) Selzner M, Rudiger HA, Sindram D, Madden J, Clavien PA. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. Hepatology 2000; 32: 1280-8.

147) Wullaert A, van Loo G, Heyninck K, Beyaert R. Hepatic TNF signaling and NF-{kappa}B: effects on liver homeostasis and beyond. Endocr Rev. 2007

148) Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. Nature 2006; 441: 431-6.

149) Tsoulfas G, Geller DA. NF-kappaB in transplantation: friend or foe? Transpl Infect Dis 2001; 3: 212-9.

150) Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. Cell 1996; 87: 13-20.

151) Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu Rev Immunol 1998; 16: 225-60.

152) Li Y, Zhang W, Mantell LL, Kazzaz JA, Fein AM, Horowitz S. Nuclear factor-kappaB is activated by hyperoxia but does not protect from cell death. J Biol Chem 1997; 272: 20646-9.

153) Takahashi Y, Ganster RW, Gambotto A, Shao L, Kaizu T, Wu T et al. Role of NF-kappaB on liver cold ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2002; 283: 1175-84.

154) Huguet C, Addario-Chieco P, Gavelli A, et al. Technique of hepatic vascular exclusion for extensive liver resection. Am J Surg 1992; 163: 602-5.

155) Henderson JM. Liver transplantation and rejection: an overview. Hepato-Gastroenterol 1999; 46: 1482-4.

156) Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. Exp Mol Pathol. 2003; 74: 86-93.

157) Moussa ME, Sarraf CE, Uemoto S et al. Effect of total hepatic vascular exclusion during liver resections uder total vascular exclusion. Eur J Surg 1998: 164; 185-90.

158) Adam R, Reynes M, Johann M et al. The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. Transplant Proc 1991; 23: 1538-40.
159) Badia JM, Ayton LC, Evans TJ et al. Systematic cytokineresponse to hepatic resections nder total vascular exclusion. Eur J Surg 1998; 164: 185-90
160) Dacmen J-WHC, deWit RJ, Heineman E, et al. Kidney transplantation from non-heart beating donor kidneys. Lancet 1995; 345: 1067.
161) Laskowski IA, Pratschke J, ilhelm MJ, et al. Non-heart beating kidney donors. Clin Transplant 1999,13: 281.
162) Rosser BG, Gores GM. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. Gastroenterology 1995; 108: 252-75.
163) Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. Nat Rev Cancer 2002; 2: 489-501.
164) Huang S, Houghton PJ. Targeting mTOR signaling for cancer therapy. Curr Opin Pharmacol 2003; 3: 371-7.
165) Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. Genes Dev 2004; 18: 1926-45.
166) Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. Genes Dev 2003; 17:1829-34.
167) Dancey JE. Therapeutic targets: MTOR and related pathways. Cancer Biol Ther. 2006; 5: 1065-73.
168) Absorbtion and intestinal metabolism of SDZ-RAD and rapamycin in rats Crowe A; 1999; 27. 627-32.
169) Lorber MI, Basadonna GP, Friedman AL, et al. The evolving role of mTOR inhibitors for post transplany immunsupression, Transplant proc. 2001; 33: 3075-7
170) Wilhelm M, Pratschke J, Laskowski I, Tilney N. Ischema and Reperfusion Injury 2003; 17: 140-57.
171) S.M. Jones and R.G. Thurman, L-arginine minimises reperfusion injury in a low-flow, reflow model of liver perfusion, Hepatology 1996; 24: 163-68.

172) S. Todo, Y. Zhu, S. Zhang, N. Ishizaki, H. Tanaka, V. Subbotin and T.E. Starzl, Attenuation of ischemic liver injury by augmentation of exogenous adenosine, Transplantation 1997; 63: 217-23.

173) H. Nakano, K. Boudjema, E. Alexandre, P. Imbs, M.P. Chenard, P. Wolf, J. Cinqualbre and D. Jaeck, Protective effects of N-acetylcysteine on hypothermic ischemia–reperfusion injury of rat liver, Hepatology 1995; 22: 539-45.

174) H.A. Friedel, K.L. Goa and P. Benfield, S-adenosyl-L-methionine: a review of its pharmacological properties and therapeutic potential in liver dysfunction and affective disorders in relation to its physiological role in cell metabolism, Drugs 1989;38: 389-416.

175) P.-A. Clavien, P.R.C. Harvey and S.M. Strasberg, Preservation and reperfusion injuries in liver allografts: an overview and synthesis of current studies, Transplantation 1992; 53: 957-78.

176) J.J. Lemasters and R.G. Thurman, Hypoxic, ischaemic and preservation-induced injury in the liver, in: Perfused Liver: Clinical and Basic Applications, F. Ballet and R.G. Thurman, eds, John Libbey, London, 1991, 97-120

177) R.J. Nauta, E. Tsimoyiannis, M. Uribe, D.B. Walsh, D. Miller and A. Butterfield, The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia–reperfusion-induced liver injury, Ann. Surg.1991; 23: 137-42.

178) Iwasaki Y. Ischemic preconditioning against intermittent warm-ischemia-induced liver injury. J Surg Res 2002; 107: 82-92.

179) Marinov M, Ziogas A, Pardo OE, Tan LT, Dhillon T, Mauri FA, et al. AKT/mTOR pathway activation and BCL-2 family proteins modulate the sensitivity of human small cell lung cancer cells to RAD001. Clin Cancer Res. 2009; 15: 1277-87.

180) Cejka D,Preusser M, Feuereder T, Sieghart W, Werzowa J, Strommer S, Wacheck V. mTOR inhibition sensitizes gastric cancer to alkylating in vivo. Anticancer Res 2008; 28: 3801-8.

181) Belimunt J, Guix M. The medical management of metastatic renal cell carcinoma: integrating new guidelines and recommendations. BJU Int 2008; 103: 572-7.

182) Platzbecker U, von Bonin M, Goekkurt E, Radke J, Binder M, Kiani A, Stoehlmacher J, et al. Graft-versus-host disease prophylaxis with everolimus and tacrolimus is associated with a high incidence of sinusoidal obstruction syndrome and microangiopathy: results of the EVTAC trial. Biol Blood Marrow Transplant. 2009; 15: 101-8.

183) Kulke MH, Bergsland EK, Yao JC Glycemic control in patients with insulinoma treated with everolimus. N Enl J Med 2009; 360: 195-7.

184) Campone M, Levy V, Bourbouloux E, Berton Rigaud D, Bootle D, Dutreix C, et al. Safety and pharmacokinetics of paclitaxel and the oral mTOR inhibitor everolimus in advanced solid tumours. Br J Cancer 2009; 100: 31-21.????

185) Miyazawa M, Yasuda M, Fujita M, Kajiwara H, Hirabayashi K, Takekoshi S, et al. Therapeutic strategy targeting the mTOR-HIF-1alpha-VEGF pathway in ovarian clear cell adenocarcinoma. Pathol Int. 2009; 59: 19-27.

186) Levy A, Sauvin LA, Massard C, Soria JC. Everolimus (RAD 001) and solid tumors: a 2008 summary. Bull Cancer 2008; 95: 1205-11.

187) Wolpin BM, Hezel AF, Abrams T, Blaszkowsky LS, Meyerhardt JA, Chan JA, et al. Oral mTOR inhibitor everolimus in patients with gemcitabine-refractory metastatic pancreatic cancer. J Clin Oncol. 2009; 27: 193-8.

188) Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, Kobashigawa J, Mancini D, Valantine-von Kaeppler HA, et al. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. N Engl J Med 2003; 349: 847-58.

189) Carter AJ, Aggarwal M, Kopia GA, Tio F, Tsao PS, Kolata R, et al. Long-term effects of polymer-based, slow-release, sirolimus-eluting stents in a porcine coronary model. Cardiovasc Res 2004; 63: 617-24.

190)Fukuda D, Sata M, Tanaka K, Nagai R. Potent inhibitory effect of sirolimus on circulating vascular progenitor cells. Circulation 2005; 111: 926-31.

191) Grube E, Buellesfeld L. Everolimus for stent-based intracoronary applications. Rev Cardiovasc Med 2004; 5: 3-8.

192) Grube E, Buellesfeld L. Rapamycin analogs for stent-based local drug delivery. Everolimus- and tacrolimus-eluting stents. Herz 2004; 29: 162-6.
193) Grube E, Sonoda S, Ikeno F, Honda Y, Kar S, Chan C, et al. Sixand twelve-month results from first human experience using everolimus-eluting stents with bioabsorbable polymer. Circulation 2004; 109: 2168-71.
194) Silber S. When are drug-eluting stents effective? A critical analysis of the presently available data. Z Kardiol 2004; 93: 649-63
195) Oliveira C.P, Lopaso F.R.M, Laurindo R.M, et al. Protection against liver ischemia-eperfusion injury in rats by Silymarin or Verapamil. Transplantation Proceedings 2001; 33: 3010-4.
196) Dunn C, Croom K. Everolimus: A Rewiev of its use in renal and cardiac transplantation. Adıs Drug Evaluation 2006; 66: 547-570.
197) Iwasaki Y, Togaya N, Hattori Y, Yamaguchi K, Kubota K. Protective effect of ischemic peconditioning against intermittent warm-ischemia induced liver injury. Journal of Surgical Research 2002; 107: 82-92.
198) Colletti L.M, Remick G, Burtch G.D, Kunkel L, Strieter R., Campbell D.A. Role of tumor necrosis factor-α in the pathophysiologic alteratons after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. J Clin. Invest 1990; 85: 1936-43.
199) Kimura N, Muraoka R, Horichi T, Tabo T, Uchinai M, Yokomachi J. Intermittent hepatic pedicle clamping reduces liver and lung injury. J. Surg Res 1998; 78: 11.
200) PeraltaC, Prats N, Xaus C, Gelpi E. Protective effect of liver ischemiac preconditioning on liver and lung injury by hepatic ischemia-reperfusion in tha rat. Hepatology 1999; 30: 1481.
201) Essani N, Bajt M.L, Farhood A, Vonderfecht S.L, Jaeschke H. Transcriptional activation of vascular cell adhesion molecule-1 gene in vivo and its role in the pathophysiology of neutrophil-induced liver injury in murine endotoxin shock. J. Immunol 1997; 158: 5941.
202) Donato M, D'Annunzio V, Berg G, et al. İschemic preconditioning reduces infarct size by activation of A1 receptors and K (ATP) channels in both nomal and hypercholesterolemic rabbits. J. Cardiovasc. Pharmacol 2007; 49: 287-92.

203) Granger D.L, Taintor R.R, Boockvar K.S, Hibbs Jr. Determination of nitrate and nitrite in biological samples using bacterial nitrate reductase coupled with the Griess reaction. Methods Enzymol 1996; 268: 142-51.

204) Aggarwall B.B, ohr W.J, Hass P.E, et al. Human tumor necrosis factor. Production, purification and characterization. J. Biol. Chem 1985; 260: 2345-54.

205) Kotsch K, Ulrich F, Reutzel-Selke A, Pascher A, Faber W, Warnick P,et al. Methylprednisolon therapy in decreased donors reduces nflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation. Annals of Surgery; 2008: 248: 1042-9.

206) Caraceni P, Pertosa A.M, Giannone F, Domenicali M, Grattagliano I, Principe A. Antagonism of the cannabınoid CB-1 receptor protects rat liver against ischemia-rperfusion injury complicated by endotoxemia. Gut 2009; 58: 1135-43.

207) Zhang F, Mao Y, Qiao H, Jiang H, Zhao H, Chen X, Tong L, Sun X. Protective effects of taurine against endotoxin-induced acute liver injury after hepatic ischemia reperfusion.Amino Acids. 2009. **?????

208) Yilmaz S, Ates E, Tokyol C, Pehlivan T, Erkasap S, Koken T The protective effect of erythropoietin on ischaemia/reperfusion injury of liver. HPB. 2004; 6: 169-73

209) Waage, A., Halstensen A, and T. Espevik. Association between tumor necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. Lancet. 1987; 1: 355-7.

210) Grau, G. E., T. E. Taylor, M. E. Molyneux, J. J. Wirima, P. Vassalli, M. Hommel, and P. H. Lambert. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. N. Engl J Med. 1989; 320: 1586-91.

211) Lahdevirta J., Maury C.P., Teppo A. M., and Repo H. Elevated levels of circulating cachectin/tumor necrosis factor in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Am. J. Med. 1988; 85: 289-91.

212) Yamada Y, Webber E.M, Kirillova I, et al. Analysis of liver regeneration in mice lacking type 1 and type 2 tumor necrosis fator receptor: Requirement for type 1 but not type 2 receptor. Hepatology 1998; 28: 959.

213) Debonera F, Aldeguer X, Shen X, et al. Activation of interleukin-6/STAT3 and liver regeneration following transplantation. J. Surg. Res 2001; 96: 289.
214) Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, et a. Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning. Br. J. Surg 1998; 85: 1636.
215) Selzner N, Selzner M, Odermatt B, et al. ICAM-1 triggers liver regeneration through TNF and IL-6 release in mice. Gastroenterology 2003; 124: 692.
216) Camargo C.A, Madden J.F, Gao W, et al. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocye proliferation in the rodent. Hepatology 1997; 26: 1513.
217) Crockett E.T. Sex differences in inflamatory cytokine production in hepatic ischemia-reperfusion. Journal of Inflammation 2006; 3:16
218) Jaeschke H, Fisher MA, Lawson J, Simmons CA, Farhood A, Jones DA. Activation of caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential fot TNF-alpha – induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis is a murne endotoxin shock model. J Immnol 1998; 160: 3480-6.
219) Leis M, Gantner F, Kunstle G, Wendel A. Cytokine- mediaed hepatic apoptosis. Rev Physiol 1991; 70: 2645-9.
220) Xiaoling J, Zimmers T.A, Perez E.A, Pierce R.H, Zhang Z, Koniaris L,G. Paradoxal effects of short- and long-term ınterleukin-6 exposure on liver injury and repair. Hepatology 2006; 43: 474-84.
221) Wuestefeld T, Rakemann T, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. Hyperstimulation with interleukin 6 inhibits cell cycle progression after hepatectomy in mice. Hepatology 2000; 32: 514-22.
222) Bedirli A, Kerem M, Pasaoglu H, Erdem O, Ofluoglu E, Sakrak ??. Effects of ischemic preconditioning on regenerative capacity of hepatocyte in the livcr ischemically damaged rat livers. Journal of Surgical Resesach 2005; 125: 42-8.
223) Tsuyama H, Shimizu K, Yoshimoto H, et al. Protective effect of ischemic preconditioning o hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. Transplant. Proc 2000; 32: 155.

224) Kannerup AS, Gronbaek H, Fuch-Jensen P, et al. Cytokine changes during warm ischemia and reperfusion of the pig liver with or wihout preconditioning. Eur Surg Res 2009; 42: 216-22.

225) Schrelm S, Lehle K, Birnbaum D.E, Preuner J.G. mTOR-inhibitors simultaneously inhibit proliferation and basal IL-6 synthesis of human coronary artery endothelial cells. International Immunopharmacology 207;7: 781-90.

226) Jaeschke H. Mechanismsof reperfusion injury after warm ischemia of the liver. J Hepatobiliary Pancreat Surg 1998; 5: 402-8.

227) Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms,prevention and consequences. J Hepatol 1996; 25: 774-80.

228) Kong R, Gao Y, Sun B, Chen H, Wang G, Wang X, et al. The Strategy of Combined Ischemia Preconditioning and Salvianolic Acid-B Pretreatment to Prevent Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. Dig Dis Sci. 2009 ?????.

229) Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. Am J Physiol gastrontest Liver Physiol 2003; 284: 15-26.

230) Düşünceli F, İşeri S.Ö, Ercan F Gdik N, Yeğen C, Yeğen B. Oxytocin alleviates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. Peptides 2008; 29: 1216-22.

231) Reiter RJ,Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of emlatonin in the reduction of oxidative stres. J. Biomed Sci 2000; 7: 444.

232) Morrison R, Tan X, Ledent L, Mustafa S.J, Hofman P.A, et al. Targeted deletion of A2A adenosine receptors attenuates the protective effects of myocardial postconditioning. Am J. Physiol. Heart Circ. Physiol 2007; 293: 2523-9.

233) Dana A, Jonassen A. Yamashita N, Yellon D.M. Adenosine A1 receptor activation induces delayed preconditioning in rats mediatedby manganese superoxide dismutase. Circulation 2000; 101: 2841-48.

234) Zhao T, Xi L, Chelliah J, Levasseur J.E,Kukreja R.C. Inducible nitric oxide synthase mediates delayed myocardial protection induced by activation of adenosine A1 receptors: evidence from gene-knockout mice. Circulation 2000; 102: 902-7.

235) Arai M, Thurman G.R, Lemasters JJ. Contribution of Aenosine A2 receptors and cyclic adenosine monophosphate to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cells against storage/reperfusion injury in rat livers. Hepatology 2000; 32: 297-302.

236) Schauer R.J, Gerbes A.L, Voiner D, Winkel M.O.D, Fraunberger P, Bizler M. Induction of cellular resistance against Kupffer cell derived oxidant stress: a novel concept of hepatoprotection by ischemic preconditioning. Hepatology 2003; 37: 286-95.

237) Bradford M.M. A rapid and sensitive method fort he quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem 1976; 72: 248-54.

238) Henry DC, Wenshi G, Sadayuki N. Evidence that free radicals are involved in graft transplantation in the rat-an eectron aramagnetic resonance spin trapping study. Transplantation 1992; 54: 199.

239) Crishol JP, Magi MF, Vela C. Lipid metabolism and oxidative stress in renal transplantation. Transplant Po 1996; 28: 2820.

240) Lehman TG, Wheeler MD, Froh M. Effects of three superoxide dismutase enes delivered with an adenovirus on graft function after transplantation of fatty livers in the rats. Transplantation 2003; 76: 28.

241) Ozturk H, Gezici A, Ozturk H. The effect of celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, on liver ischemia/reperfusion-induced oxidative stress in rats. Hepatol Res 2006; 342: 76.

242) Leutner S, Schindowski K Frolich L, et al. Enhanced ROS- generation in lymphocytes from Alzheimer's patients. Pharmacopsychiatry 2005; 386: 312.

243) Arrigo AP, Firdaus WJ, Mellier G, et al. Cytotoxic effects induced by oxidative stressin cultured mammalian cells and protection provded by Hsp27 expression. Methods 2005; 352: 126.

244) Hassan L, Buno P, Ferron-Celma I, et al. Time course of antioxidant enzyme activities in liver transplant recipients. Transplant Proc 2005; 37: 3932.

245) Cotgreave IA. N-acetylcysteine: pharmacological consideations and experimental and clinical applications. Adv Pharmacol 1997; 38: 205.

246) Chen C.F, Hsuh C.W, Tang T.S, Wang D, Shen C.Y, Pei J.S. Reperfusion liver injury-induced superoxide dismutase and catalase expressions and the protective effets of N-Acetyl-Cysteine. Transplan Proc 2007; 39: 858-60

247) Song SW, Tolba RH, Yonezawa K, Manekeller S, Minor Exogenous superoxide dismutase prevents peroxynitrite-induced apoptosis in non-heart-beating donor livers. Eur Surg Res 2008; 41: 353-1.

248) Shen s. Zhang Y, Xiang J, Xiong C. Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes. World J Gastroenterol 2007; 13: 1953-61.

249) Sasaki H, Matsuno T, Nakagawa K,Matsuoka J, Tanaka N. Superoxide induces hepatocyte apopitosis during the early phase of reperfusion after murine liver ischemia. Transplant Proc. 1998; 30: 2958-9.

250) Trimarchi H, Mongitor MR, Baglioni P,Forrester M, Freixas EA, Schropp M. N-acetylcysteine reduces malondialdehyde levels in chronic hemodialysis patients-a pilot study. Clin Nephrol 2003 59: 441-46.

251) Freudenthaler SM, Schreeb KH, Wiese A, Pilz J, Gleiter CH. Influence of controlled hypoxia and radical scavenging agents on erythropoetin and malondialdehyde concentrations in humans. Acta Physion Scand 2002; 174: 231-5.