



**KARACİĞER PREZERVASYON SOLÜSYONUNUN
ETKİNLİĞİNİN ARTTIRILMASI ÜZERİNE MELATONİN ETKİSİ:
HİSTOLOJİK ve BİYOKİMYASAL ÇALIŞMA**

Mehmet Mustafa ERDOĞAN

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nigâr VARDI**

Uzmanlık Tezi – 2018

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**KARACİĞER PREZERVASYON SOLÜSYONUNUN
ETKİNLİĞİNİN ARTTIRILMASI ÜZERİNE MELATONİN ETKİSİ:
HİSTOLOJİK ve BİYOKİMYASAL ÇALIŞMA**

Mehmet Mustafa ERDOĞAN

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nigâr VARDI**

**MALATYA
2018**

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Organ Nakli.....	3
2.1.1. Karaciğer Naklinin Tarihçesi	4
2.2. Karaciğer	4
2.2.1. Karaciğer Anatomisi.....	4
2.2.1.1. Karaciğerin Damarları	7
2.2.1.2. Karaciğerin Sinir Desteği	7
2.2.1.3. Karaciğerin Lenf Dolaşımı.....	8
2.2.1.4. Karaciğer Safra Kanalları	8
2.2.2. Karaciğer Histolojisi.....	8
2.2.2.1. Karaciğer Lobülleri.....	9
2.2.2.2. Karaciğerin Damar Tipleri ve Kan Akımı	12
2.2.2.3. Karaciğer Lenf Kanalları ve Akımı	15
2.2.2.4. Hepatositler	15
2.2.2.5. Karaciğerin Safra Kanalı Sistemi	19
2.2.3. Karaciğer Fizyolojisi	21
2.2.4. Karaciğer Embriyolojisi	25
2.2.5. Ratlarda Karaciğerin Yapısı ve Özellikleri	26
2.3. UW Solüsyonu	28
2.4. Melatonin.....	31
2.4.1. Melatonin ve mitokondri ilişkisi.....	32
2.5. Organ Prezervasyonu.....	33
2.5.1. Prezervasyon Prensipleri	33
2.5.2. Prezervasyon Hasarı Mekanizmaları	34

2.5.3. Prezervasyon Solüsyonları	35
2.5.4. Prezervasyon Solüsyonlarının Kullanımı	36
2.5.5. Koruma Süreleri	36
2.5.6. Karaciğer İçin Prezervasyon Teknikleri ve Stratejileri	37
2.5.6.1. Organın Önceden Hazırlanması	37
2.5.6.2. Organ Çıkartıldıktan Sonra Prezervasyon İçin En Sık Kullanılan Yöntemler	37
3. MATERYAL VE METOT	40
3.1. Araştırma Tipi	40
3.2. Araştırma Yeri ve Ortamı	40
3.3. Deney Grupları	40
3.4. Anestezi	41
3.5. Deneysel Uygulama	41
3.6. Işık Mikroskopik Teknikler	42
3.6.1. Doku Takibi	42
3.6.2. Mayers'in Hematoxylin&Eosin Metodu	43
3.6.3. Periodic Acid Schiff (PAS) Boyama Metodu	44
3.6.4. Caspase 3 İmmünohistokimya Boyama Metodu	45
3.7. Biyokimyasal Analiz	46
3.7.1. Dokuların Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması	46
3.7.2. Redükte Glutasyon (GSH) Düzeyinin Ölçümü	46
3.7.3. Malondialdehid (MDA) Düzeyinin Ölçümü	47
3.7.4. Total Oksidan Kapasitenin (TOS) Ölçümü	47
3.7.5. Total Antioksidan Kapasitenin (TAS) Ölçümü	47
3.7.6. Karaciğer Fonksiyon Testlerinin (ALT, AST, ALP) Ölçümü	48
3.8. İstatistiksel Analiz	49
4.1. Histolojik bulgular	50
4.1.1. SF Grubu 0. Saat	50
4.1.2. UW Grubu 0. Saat	53
4.1.3. UW+Melatonin Grubu 0. Saat	55
4.1.4. UW Grubu 12. Saat	58
4.1.5. UW+Mel Grubu 12. Saat	63
5. TARTIŞMA	71

6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	82
KAYNAKLAR.....	83
EKLER	96
EK 1: ÖZGEÇMİŞ.....	96



TEŞEKKÜR

Yoğun tez dönemimde yaptığım deneysel çalışmalarında ve bu tezin hazırlanış aşamalarında bana yol gösteren tez danışmanım, Prof. Dr. Nigâr VARDI ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Mehmet GÜL ve Doç. Dr. Aslı TAŞLIDERE, biyokimya çalışmalarında yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi M. Erman ERDEMLİ ve istatistiksel analizlerde desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Harika GÖZÜKARA BAĞ hocalarıma saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlileri Semir GÜL, Emrah ZAYMAN, Salih Yahya AKSANYAR ve tüm çalışma arkadaşlarımla birlikte Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan araştırma görevlisi Onural ÖZHAN'a teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Karaciğer nakillerinde başarı oranını en çok etkileyen faktörlerin başında, alınan dokudaki hücrelerin normal histolojik ve biyokimyasal özelliklerinin korunması gelmektedir. Bu amaçla organın alınması ve nakli esnasında çeşitli doku prezervasyon solüsyonları kullanılmaktadır. Bu solüsyonların koruyucu özelliğini arttıran etkenlerden birisi antioksidan kullanımıdır. Çalışmamızda, nakil öncesi intraperitoneal melatonin uygulamasının karaciğer prezervasyon hasarı üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda Serum Fizyolojik (SF) grubu, University of Wisconsin (UW) grubu ile hepatektomiden 45 dk öncesinde melatonin uygulanan University of Wisconsin + Melatonin (UW+Mel) grubu sıçanlarına ait karaciğer dokularının histolojik ve biyokimyasal özellikleri karşılaştırıldı.

Bulgular: Hematoksilen&eoizin boyamalarda, hidropik dejenerasyon, sinüzoidal dilatasyon, hepatosit nekrozu açısından, 0. saat ($p=0.129$) ve 12. saat ($p=0.150$) total skor değerlendirilmesinde gruplar arasında anlamlı derecede fark saptanmadı. Yapılan Caspase 3 immünohistokimyasal boyamada 12. saat UW grubunda UW+Mel grubuna kıyasla anlamlı derecede Caspase 3 immünreaktivite pozitifliğinde artış gözlemlendi ($p=0.005$). PAS boyanma yoğunluğu açısından 0. ve 12. saatlerde gruplar arasında fark bulunmadı. Biyokimyasal analizler sonucunda 0. ve 12. saatlerde UW grubuna kıyasla UW+Mel grubunda MDA ve TOS düzeyinin anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. GSH aktivitesi ve TAS düzeyi karşılaştırıldığında ise 0. saatte UW ve UW+Mel grupları arasında anlamlı derecede fark gözlenmezken, 12. saatte UW grubuna kıyasla UW+Mel grubunda anlamlı derecede azalma saptandı. Ayrıca UW 12. saat grubuna kıyasla UW+Mel 12. saat grubunda karaciğer enzimlerinden AST, ALT ve ALP düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı tespit edildi.

Sonuç: Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, sitoprotektif bir antioksidan olan melatoninin intraperitoneal uygulamasının, UW solüsyonu içerisinde karaciğerin doku bütünlüğünün ve hepatositlerin histolojik ve biyokimyasal özelliklerinin korunmasında etkin bir rol oynadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle, karaciğer nakli öncesi donöre melatonin uygulamasının, prezervasyon ortamında karaciğer dokusunun histolojik ve biyokimyasal açıdan korunmasında önemli katkıları olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer, Prezervasyon, UW solüsyonu, melatonin.

ABSTRACT

Aim: The most important factor affecting the success rate in liver transplants is protection of the normal histological and biochemical characteristics of tissue. For this purpose, various tissue preservation solutions are used during the removal of the organ and during transplantation. One of the factors that increase the protective properties of these solutions is the use of antioxidants. In our study, it was aimed to investigate the effects of intraperitoneal melatonin administration on liver preservation damage before transplantation.

Material and Method: In our study, the histological and biochemical characteristics of University of Wisconsin + Melatonin (UW+Mel) group rats which treated with melatonin 45 min before hepatectomy were compared between Serum Physiological (SF) group and University of Wisconsin (UW) group.

Results: When hematoxylin & eosin staining was evaluated in terms of hydropic degeneration, sinusoidal dilatation and hepatocyte necrosis, there was no statistically significant difference between the groups at the 0th hour ($p=0.129$) and 12th hour ($p=0.150$). Caspase 3 immunohistochemical staining showed a significant increase in caspase 3 immunoreactivity positivity at 12th hour UW group compared to UW + Mel group ($p=0.005$). There was no difference between the groups at 0th and 12th hours in terms of PAS staining intensity. As a result of biochemical analysis, at the 0th and 12th hours, the MDA and TOS levels in the UW + Mel group increased significantly compared to the UW group. When the GSH activity and TAS level were compared, there was no significant difference between the UW and UW + Mel groups at 0 hour, and a significant decrease was observed in the UW + Mel group compared to the UW group at 12th hour. It was also found that AST, ALT and ALP levels of liver enzymes decreased significantly in the UW + Mel 12th hour group compared to the UW 12th hour group.

Conclusion: Therefore, it is thought that the application of melatonin to donor before liver transplantation has an important contribution to the preservation of liver tissue histopathologically and biochemically in the pre-reservation environment. When the findings were evaluated, intraperitoneal administration of melatonin, a cytoprotective antioxidant, was found to play an effective role in preserving histological and biochemical properties of liver tissue integrity and hepatocytes in UW solution.

Key Words: Liver, preservation, UW solution, melatonin.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	: Adenosin Difosfat
aER	: Agranüler (Düz) Endoplazmik Retikulum
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AMP	: Adenosin Monofosfat
AST	: Aspartat Aminotransferaz
ATP	: Adenozin Trifosfat
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPS	: Devamlı Prezervasyon İle Saklama
FGF	: Fibroblast Growth Faktör
g	: Gram
gER	: Granüllü Endoplazmik Retikulum
GH	: Büyüme Hormonu
GHRH	: Büyüme Hormonu-Serbestleştirici Hormon
GMP	: Guanozin Monofosfat
GSH	: Redükte Glutatyon
HCl	: Hidroklorik asit
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoproteinler
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HE	: Hematoksilen&Eozin
HTK	: Histidin-Triptofan-Ketoglutarat
ICAM-1	: İntrasellüler Adezyon Molekül
IL	: İnterlökin
i.p.	: İntraperitoneal
İ/R	: İskemi-Reperfüzyon
K	: Potasyum
KCFT	: Karaciğer Fonksiyon Testleri
kg	: Kilogram
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoproteinler

MDA	: Malondialdehit
Mel	: Melatonin
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
MMP	: Matriks Metalloproteinazlar
ng	: Nanogram
Na	: Sodyum
NADPH	: Nikotinamid-Adenosin Dinükleotid Fosfat
NKP	: Normotermik Makine Perfüzyonunu
Ölçü C	: Ölçü Cetveli
PAS	: Periyodik Asit-Schiff
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PNF	: Primer Non-Fonksiyon
RBP	: Retinol-Bağlayıcı Protein
RNA	: Ribonükleik Asit
SD	: Standart Sapma
SF	: Serum Fizyolojik
sn	: Saniye
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
SHS	: Statik Hipotermik Saklama
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
TGF	: Tümör Grovt Faktör
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör-Alfa
T₄	: Tetraiyodotironin
UW	: University Of Wisconsin
VLDL	: Çok Düşük Dansiteli Lipoproteinler
VWF	: Von Willebrand Faktör
TAS	: Total Antioksidan Kapasite
TOS	: Total Oksidan Kapasite

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Karaciğerin anatomik yapısı.....	5
Şekil 2.2. Karaciğer segmentasyonu.....	6
Şekil 2.3. Karaciğer lobülleri.	10
Şekil 2.4. Karaciğer asinüs zonları	12
Şekil 2.5. Karaciğer lobül kan ve lenf akımı.....	13
Şekil 2.6. Hepatositlerin ve ilişkili yapı ve hücrelerin şematik çizimi	19
Şekil 2.7. Sıçan karaciğer anatomisi.....	27
Şekil 2.8. Melatonin insanlardaki çeşitli fonksiyonları.	32
Şekil 2.9. Melatoninin mitokondri üzerindeki etkileri.....	33
Şekil 4.1. SF Grubu karaciğer parankimi.	51
Şekil 4.2. SF Grubu portal alan.....	51
Şekil 4.3. SF Grubu Caspase 3 boyama.....	52
Şekil 4.4. SF Grubu PAS boyama.....	52
Şekil 4.5. UW Grubu 0. Saat karaciğer parankimi.	53
Şekil 4.6. UW Grubu 0. saat portal alan.....	54
Şekil 4.7. UW Grubu 0. saat Caspase 3 boyama.....	54
Şekil 4.8. UW Grubu 0. saat PAS boyama.....	55
Şekil 4.9. UW+Mel Grubu 0. saat karaciğer parankimi.	56
Şekil 4.10. UW+Mel Grubu 0. Saat portal alan.....	56
Şekil 4.11. UW+Mel Grubu 0. saat Caspase 3 boyama.	57
Şekil 4.12. UW+Mel Grubu 0. saat PAS boyama.....	57
Şekil 4.13. UW Grubu 12. saat karaciğer parankimi.	59
Şekil 4.14. UW Grubu 12. saat karaciğer parankimi.	59
Şekil 4.15. UW Grubu 12. saat portal alan.....	60
Şekil 4.16. UW Grubu 12. saat nekroz alanı.....	60
Şekil 4.17. UW Grubu 12. saat Caspase 3 reaktivitesi.....	61
Şekil 4.18. UW Grubu 12. saat Caspase 3 reaktivitesi.....	61
Şekil 4.19. UW Grubu 12. saat PAS boyama.	62

Şekil 4.20. UW Grubu 12. saat PAS boyama.	62
Şekil 4.21. UW+Mel Grubu 12. saat karaciğer parankimi.	63
Şekil 4.22. UW+Mel Grubu 12. saat portal alan.	64
Şekil 4.23. UW+Mel Grubu 12. saat Caspase 3 reaktivitesi.	64
Şekil 4.24. UW+Mel Grubu 12. saat PAS boyama.	65
Şekil 4.25. Gruplar arası süreye bağımlı MDA düzeylerinin karşılaştırılması.	67
Şekil 4.26. Gruplar arası süreye bağımlı GSH aktivitelerinin karşılaştırılması.	68
Şekil 4.27. Gruplar arası süreye bağımlı TAS aktivitelerinin karşılaştırılması.	68
Şekil 4.28. Gruplar arası süreye bağımlı TOS aktivitelerinin karşılaştırılması.	69
Şekil 4.29. 12. saatte alınan solüsyon örneklerinde AST, ALT, ALP karşılaştırılması.	70

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. UW Solüsyonunun Özellikleri.....	30
Tablo 2.2. UW Solüsyonu İçeriği ve Fonksiyonu	30
Tablo 2.3. Devamlı Prezervasyon ile Saklanan (DPS) Yöntemin, Statik Hipotermik Saklama (SHS) Yöntemine Avantajları ve Dezavantajları.....	39
Tablo 3.1. Histolojik Doku Takip Prosedürü.....	43
Tablo 3.2. HE Boyama Prosedürü.....	44
Tablo 3.3. PAS Boyama Metodu.....	44
Tablo 3.4. İmmünohistokimya Boyama Metodu.....	45
Tablo 4.1. Histolojik Parametre Bulgularının İstatistiksel Analizi.....	66
Tablo 4.2. Caspase 3 ve PAS Boyama İstatistiksel Analizi.....	66
Tablo 4.3. Oksidatif Stres Parametreleri İstatistiksel Analizi.....	67
Tablo 4.4. 12. Saatte Alınan Solüsyon Örneklerinde AST, ALT, ALP Parametreleri İstatistiksel Analizi.....	69

1. GİRİŞ

Kadavradan veya canlı organizmadan organ transplantasyonu sürecinde transplante edilecek organın veya dokunun hücresel ve biyokimyasal özelliklerinin en üst düzeyde korunması, uygulanacak transplantasyonun başarısı ve organın işlem sonrası yeniden fonksiyonel aktivasyonu açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, organ naklinin ilk uygulanmaya başladığı yıllardan günümüze kadar organ nakillerinin başarı oranının artırılması için çok sayıda çalışma yapılmış ve hala da bu alanda bilimsel araştırmalar devam etmektedir. Organ nakli süreçlerinde başarı oranını doğrudan etkileyen en önemli etmenlerden birisi de donörden alınan organın alıcıya nakledilinceye kadar uygun fizyolojik ve biyokimyasal koşullarda muhafazası gelmektedir (1).

Kadaverik organ transplantasyon sürecinde transplante edilecek organın prezervasyonu (korunması), organın alınmasına karar verildiği andan itibaren alıcıya nakledilip normal biyolojik fonksiyonu başlayıncaya kadar olan süreyi kapsar. Bu süreçte temel amaç donörden alınan organın transplante edilinceye kadar dokusal, hücresel yapı ve özelliklerinin mümkün olan en üst düzeyde korunması ve transplantasyonu takiben fonksiyonel faaliyetine başlayarak devam edebilmesidir (2). Organların bütünüyle veya kısmi olarak organizmadan alınması ile birlikte gelişen hücre hasarı ve fonksiyon kaybı sonucu oluşan hücre ölümünü önlemek için organların organizmadaki ortamına benzer ortamlarda tutulması ideal korumanın temelidir. Ancak günümüzde hiçbir organ için organizmadaki canlı ortamı ile birebir aynı olan prezervasyon ortamı bulunmamaktadır. Bu nedenle, şu ana kadar yapılmış hücre, doku ve organları koruma-saklama amaçlı ortamlarda hücre hasarı, fonksiyon kaybı ve belli bir süre sonra da hücre ölümünün önüne tam olarak geçilememiştir (3). Organın alınmasını takiben, kullanılan prezervasyon solüsyonlarında doku yapısının ve hücre canlılığının maksimum düzeyde tutulması için her organın saklama süreleri farklılık göstermektedir. Bu süre kalp ve akciğer için 6, karaciğer için 24, pankreas için 48, böbrek için 72 saat iken, kornea için yaklaşık 1 haftadır (1, 4).

Organ transplantasyonlarında, günümüzde yaygın olarak kullanılan ve üzerinde çalışmalar yapılan prezervasyon sıvıları arasında Histidin-Triptofan-Ketoglutarat (HTK) ve UW solüsyonları ön plana çıkmış durumdadır. Kadavradan transplantasyon amaçlı alınan karaciğer, genellikle transfer süreci boyunca hipotermik koşullarda UW solüsyonu içerisinde

korunmaktadır. Bu solüsyon, organ naklini uzak mesafeler arasında bile mümkün kılmış, karaciğer transplantasyonunu acil bir prosedürden daha elektif bir prosedür haline getirmiş ve karaciğer için 24 saate kadar uygun prezervasyon ortamı sağlamıştır (5). Organ prezervasyonunda, sağlanan bu gelişmelere rağmen yapılan nakillerde greft disfonksiyon oranı hala %5 ile %20 arasında değişmektedir (6). Bu nedenle, mevcut prezervasyon solüsyonlarının daha da geliştirilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Melatonin, endojen olarak başlıca pineal bezden (epifiz bezi) salgılanan, uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur (7, 8). Sentezini takiben, pineal bezden doğrudan dolaşıma verilir. Lipofilik özelliği sayesinde hücrelerin tüm kompartmanlarına girebilen melatonin için sitozolik ve nükleer bağlanma bölgeleri de tanımlanmıştır (9). Böylece melatonin antioksidan özelliği ile hücre zarını, organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikal hasarından koruyabilmektedir. Hücre içinde nükleusa kadar ulaşarak Deoksiribonükleik Asit'in (DNA) da oksidatif hasara karşı korunmasında rol alması, diğer birçok antioksidana kıyasla melatonine üstünlük sağlamaktadır (10, 11).

Kadaverik veya canlı organizmadan alınan karaciğer ve diğer organların transplantasyon süreçlerinde doku ve hücre düzeyinde bütünlüklerinin ve canlılıklarının korunması, prezervasyon süresinin uzatılması, organ naklinin başarısı ve sonrasında da organın işlevselliğini kazanması açısından oldukça önemlidir. Bu çalışmada in vivo ve in vitro yöntemlerle sitoprotektif, antioksidan etkisi gösterilmiş olan melatoninin, nakil amaçlı kadaverik karaciğer alınmadan önce sistemik olarak uygulanmasının, karaciğer prezervasyon sürecinde kullanılan UW solüsyonunun, hepatositlerin ve biliyer sistem epitel hücrelerinin korunmasına katkısının olup olmadığının araştırılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Organ Nakli

Herhangi bir sağlık problemi olan bireyleri iyileştirme, yaşam sürelerini uzatma ve daha iyi bir yaşam olanağı sağlayabilme insanlık tarihinin çok eski zamanlarından beri sürekli üzerinde durulan bir konu olmuştur. Bilimsel gelişmeler her alanda olduğu gibi, sağlık alanında da ilerleyerek sağlık hizmetlerinin gün geçtikçe daha nitelikli olmasına olanak sağlamaktadır. Tedavi uygulamalarında doku veya organ naklinde gelinen nokta bu konuda iyi bir örnek teşkil etmektedir (12-14).

Organ nakli, organizmada gerekli fonksiyonunu yerine getiremeyen bir organın yerine kadavradan veya canlı bir vericiden alınan sağlam bir organın tamamının ve bir kısmının nakledilmesidir. Bu uygulama, güncel sağlık uygulamalarında birçok akut ve kronik organ yetmezliğinde uygulanan geçerli ve ileri bir tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir. Organ transplantasyonu, son elli yılda tıbbi alanda en hızlı ilerleyen güncel sağlık alanlarından biridir (12-14).

Organ nakli konusundaki ilk deneysel çalışmalar, John Hunter'in öncülük etmesi ile başlamış ve zamanla kliniğe yansımıştır. Alexis Carrel'in 1902 yılında geliştirdiği yeni vasküler anastomoz tekniği, organ nakli konusunda bir ivme oluşturmuş ve deneysel çalışmalarda çeşitli organların nakilleri mümkün olabilmıştır. Böbrek, karaciğer, kalp, akciğer, pankreas, bağırsak gibi vasküler organların nakli, ancak son yüzyılın ikinci yarısından itibaren klinik uygulamaya girmiş ve ülkemizde de organ ve doku nakilleri uygulanmaya başlamıştır (15, 16).

Ülkemizde organ nakli kapsamında kalp, karaciğer, akciğer, böbrek, ince barsak, kemik iliği, pankreas, deri, kan, kornea gibi önemli yaşamsal fonksiyonu olan pek çok doku ve organın nakli gerçekleştirilebilmektedir. Yapılan tüm organ nakillerinin amacı, herhangi bir organ yetmezliği nedeniyle hayati risk taşıyan bir hastanın öncelikle hayatını kurtararak, yaşam süresini ve kalitesini arttırmaktır (17).

2.1.1. Karaciğer Naklinin Tarihçesi

Karaciğer nakli ilk olarak Welch ve ark. tarafından köpekler üzerinde yapılmıştır (18). 1963 yılında ise Thomas Starzl ve ark. insanlarda ilk kez karaciğer transplantasyonu yapılmıştır (19). Ancak başarılı sonuçların alınabilmesi cyclosporin gibi immünsüpresif (immün-baskılayıcı) maddelerin kullanılmasıyla sağlanabilmiştir. Yıllarca yapılan birçok karaciğer nakil işlemi farklı nedenlerle başarısızlıkla sonuçlanırken ilk kez 1990'da Strong ve ark. başarılı canlı vericili karaciğer naklini gerçekleştirmiştir (20-22).

Ülkemizde kadavradan ilk karaciğer nakli 1988 yılında, Haberal M. ve ark. tarafından yapılmıştır (2). Günümüzde kronik karaciğer hastalıklarının yanısıra, akut karaciğer yetmezliği, karaciğer kanseri, çeşitli metabolik karaciğer hastalıkları ve bazı parazitik karaciğer hastalıklarının tedavisinde karaciğer transplantasyonu etkin ve yaygın bir tedavi yöntemi olarak uygulanmaktadır (4, 23).

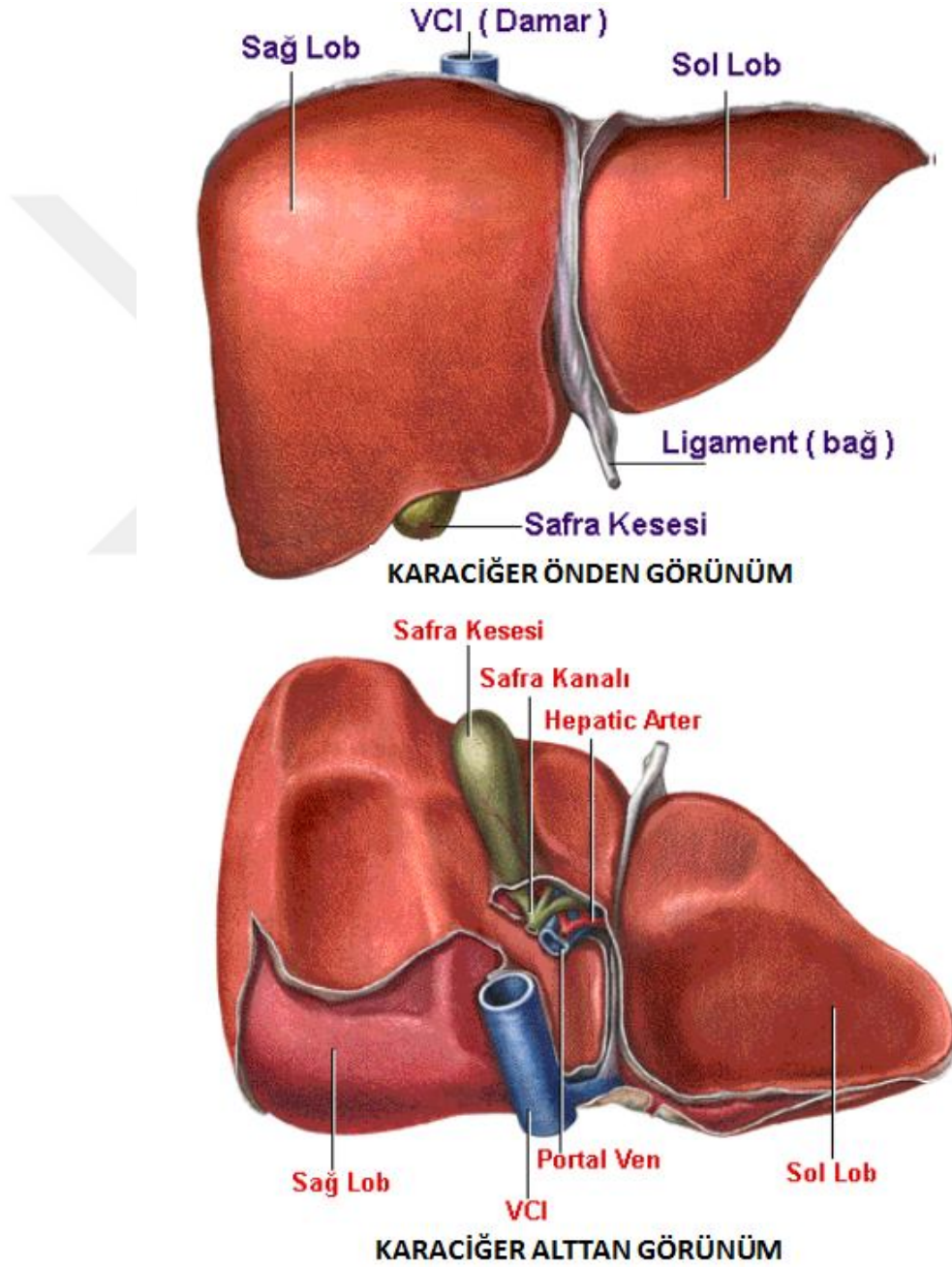
Karaciğer transplantasyonları farklı nedenlerle gelişen akut veya kronik karaciğer hastalıklarının en etkili tedavi yöntemlerinden birisi haline gelmiştir. İleri evrede karaciğer yetmezliği olan birçok hastanın nakil öncesi yıllarla, hatta aylarla sınırlı olan yaşamları, karaciğer transplantasyonu sayesinde uzatılmış ve yaşam kaliteleri de bu tedavi yöntemiyle daha iyi bir hale getirilmiştir (24, 25).

2.2. Karaciğer

2.2.1. Karaciğer Anatomisi

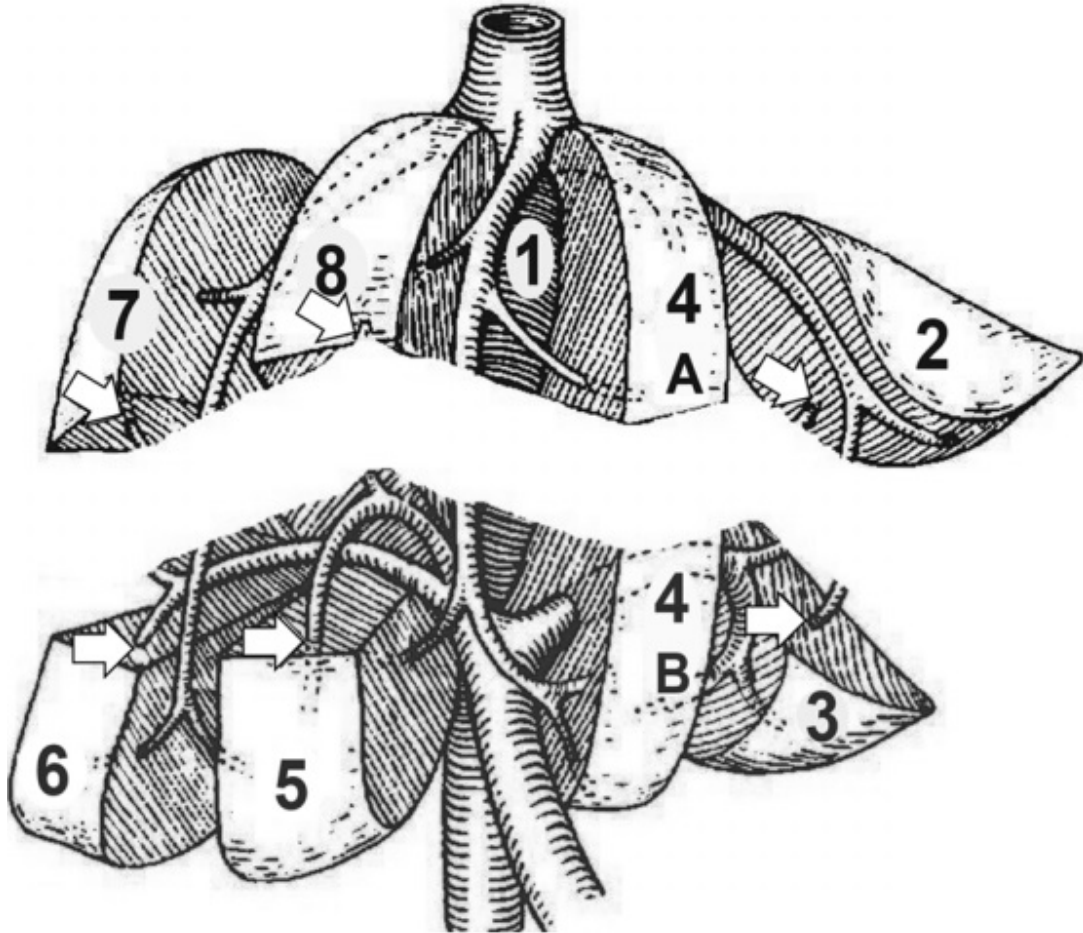
Karaciğer, karın boşluğunda bulunan organların ve vücudun endokrin ve ekzokrin salgı yapan en büyük bezidir. Abdominal boşluğun sağ üst bölgesinde, diyaframın altında, bağırsak ve midenin üzerinde yerleşiktir (26). Boyut olarak karaciğerin uzunluğu 25-30 cm, sağda ön taraftan arkaya doğru 14-16 cm, yüksekliği ise 8 cm'dir (27). Karaciğer doğumdan sonra yaklaşık 150 g, erişkinlerde ise 1400 ile 1800 g ağırlığındadır ve vücut ağırlığının yaklaşık 1/50'sini oluşturmaktadır (28).

Karaciğerin büyük çoğunluğu kostalar tarafından örtülüdür. Sadece arcus costarum arasında kalan üçgen biçimindeki küçük bir alan karın ön duvarı ile doğrudan temas eder. Karaciğer diyaframın alt yüzüne gevşek bağ dokusu ile tutunur ve karın içerisindeki diğer organların üzerine oturur. Karaciğerin diyafram ile komşu olan periton ile çevrili konveks üst yüzüne *diyaframatik yüz (facies diaphragmatica)*, iç organlar ile komşu olan konkav alt bölgesine ise *visseral yüz (facies visceralis)* denir (29), (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Karaciğerin anatomik yapısı (30).

Karaciğerin lobus hepatis dekster ve lobus hepatis sinister olmak üzere iki büyük lobu ve visseral yüzde yer alan lobus quadratus ve lobus caudatus olmak üzere iki küçük lobu vardır (31). Fakat bu tanımlama karaciğerin gerçek segmental anatomisini tam olarak açıklamaz. Karaciğer, portal triadın dalları tarafından kanlanan segmentlere ayrılır ve hepatik venler ile drene olur. 1957 yılında Couinaud tarafından tanımlanan bu anatomik ayırmda sağ ve sol loblar arasındaki anatomik bölünme safra kesesi yatağının medial kenarından arkada vena kavaya olan hattı takip eder. Bu sınıflamaya göre kaudat lob (1. segment) arkada sağ ve sol hepatik loblar arasında yerleşmiştir. Sol lob üç segmentli olup sol lateral segmentleri (2. ve 3. segmentler) ve sol medial segment (4. segment) içerir. Sağ lob ise hepatik arter ve portal venin dallarına göre dört segmente ayrılır. Bunlar anterior-inferior (5. segment), posterior-inferior (6. segment), posterior-superior (7. segment) ve anterior-superior (8. segment) dur (32, 33), (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Karaciğer segmentasyonu (34).

Karaciğer loblarının anatomik ve fonksiyonel sınıflandırması birbirinden farklıdır. Anatomik olarak, kaudat lob ile kuadrat lob, sağ loba ait iken, bu iki lob vena porta hepatis ve arteria hepatica propria'nın ramus sinister'leri ile kanlanır. Ayrıca, bu iki lobun safra drenajı ductus hepaticus sinister ile sağlanır. Bu nedenle, kaudat lob ve kuadrat lob fonksiyonel açıdan sol lobun bir parçasıdır (31).

Karaciğerin arka kısmında periton bulunmayıp, bu kısım fibröz bağ doku ile diyaframa tutunmuştur. Karaciğerin aşağı, arkaya ve sola bakan alt taraftaki yüzeyi karın boşluğundaki iç organlar ile komşudur. Bu bölgede porta hepatis (hilus) bulunmaktadır. Arteria hepatica propria, vena porta, safra kanalları, lenfatik damarlar ve sinirler karaciğere hilustan giriş çıkış yapırlar (35), (Şekil 2.1).

2.2.1.1. Karaciğerin Damarları

Karaciğere arteria hepatica propria ile oksijenden zengin kan ve vena portayla da besinden zengin olan venöz kan gelir. Karaciğere gelen toplam kanın %20'si arteria hepatica propria ile gelirken, %80'ini vena porta ile taşınır. Trunkus coeliacus'tan çıkan arteria hepatica communis, arteria gastroduodenalis ve arteria gastrica dekstra dallarını verdikten sonra arteria hepatica propria adını alır. Porta hepatis'te arteria hepatica propria, arteria hepatica dekstra ve arteria hepatica sinistra; vena porta ise vena porta dekstra ve vena porta sinistra olmak üzere ikiye ayrılır. Daha sonra bu damarlar karaciğer içerisinde intersegmental ve interlobüler dallara ayrılır. Karaciğerin venöz kanı ise vena hepaticalar ile vena kava inferiora açılır (29, 36).

2.2.1.2. Karaciğerin Sinir Desteği

Karaciğerin sinir pleksusu, sağ ve sol vagal sinirler, T 7-10. sempatik ganglionlar ve sağ frenik sinirden gelen dalların pleksus çölyakus ile birleşmesinden oluşur. Bu pleksustan çıkan sinir lifleri karaciğer içerisinde safra kanalları, portal ven ve hepatic arter ile birlikte seyreder (37).

2.2.1.3. Karaciğerin Lenf Dolaşımı

Karaciğerin lenf damarları hilusta bulunan hepatik lenfatik düğüme (nodi lymphatici hepatis), buradan da çölyak lenfatik düğüme (nodi lymphatici caeliaca) drene olur. Ayrıca lenf damarlarının bir kısmı da diyafram bölgesindeki ve karın arka duvarındaki lenf düğümlerine drene olur (38).

2.2.1.4. Karaciğer Safra Kanalları

Hepatositler tarafından sentezlenen safra, öncelikle safra kanalikülleri ile santral venden portal triada doğru akar. Üretilen safra, sırasıyla safra kanaliküllerine, Hering kanalına, duktuli biliferiye ve buradan da lobülün dışında duktus interlobularisler dökülür.

Interlobüler kanallar da sağ ve sol hepatik safra kanallarına drene olur ve bu iki kanalla birleşerek duktus hepaticus kommunisi oluşturur. Bu da ligamentum hepatoduodenalis içinde duktus sistikus ile birleşerek duktus koledekusu meydana getirirler (39, 40).

2.2.2. Karaciğer Histolojisi

Karaciğerin histolojik olarak yapısal elemanları, parankim, fibröz glisson kapsülü, sinüzoidal kapillerler ve perisinüzoidal aralıklardır. Parankim, organize hepatosit kordonlarından oluşmaktadır. Bu kordonlar yetişkinlerde normalde tek hücre kalınlığındadırlar ve sinüzoidal kapillerler tarafından birbirlerinden ayrılmışlardır. Altı yaşına kadar olan çocuklarda ise karaciğer parankimi iki hücre kalınlığındaki kordonlar halinde düzenlenmiştir (41, 42).

Bağ dokusu yapısındaki stroma, organı dıştan saran Glisson kapsülü ile devamlılık göstermektedir. Glisson kapsülünden organ içerisine uzanan trabeküller parankimi lobüllere ayırır. Kan damarları, sinirler, lenf damarları ve safra kanalları bağ dokusu yapısındaki stroma içinde ilerlemektedirler (41). Kollajen en sık sekrete edilen ekstrasellüler matriks proteindir ve çok sayıda karaciğer hücresinin temasta olduğu yüzeye tutunmasını kolaylaştırır (43, 44).

Sinüzoidal kapillerler (sinüzoidler), hepatosit kordonları arasındaki vasküler kanallardır. Perisinüzoidal aralıklar (Disse aralıkları) ise hepatositler ile sinüzoid endoteli arasında yer alan boşluklardır (41, 42).

2.2.2.1. Karaciğer Lobülleri

Karaciğerin yapısı histolojik olarak fonksiyonel açıdan klasik lobül, portal lobül ve karaciğer asinüsü olmak üzere üç kısımda incelenir (41, 42), (Şekil 2.3).

- **Klasik lobül**

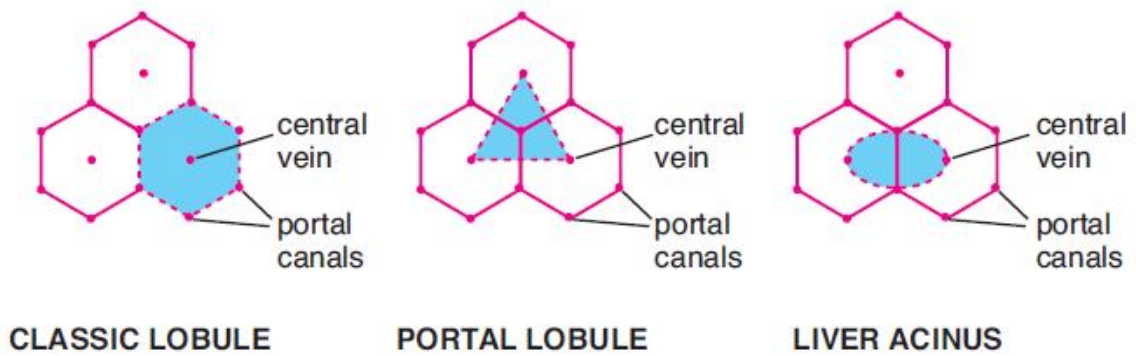
Klasik lobül, karaciğer parankiminin organizasyonunu anlatmak için kullanılan en yaygın yöntemdir ve ışık mikroskopik olarak ayırt edilmesi kolaydır. Klasik lobül, hepatik arter ve portal ven dallarının organ içindeki dağılımını ve onlardan gelen kanın karaciğer hücrelerini perfüze ederken takip ettiği yolağı temel almaktadır. Klasik lobül kabaca altıgen şekilde organize olmuş parankim bölgeleridir. Her bir klasik lobül anastomozlaşmış hepatosit dizilerinden oluşmaktadır. Tek hücre tabakası halindeki hepatosit kordonları, portal ve arteriyal kan karışımı ile perfüze eden anastomozlaşmış sinüzoid sistemi tarafından birbirinden ayrılmaktadır. Her bir lobül yaklaşık olarak 2.0x0.7 mm ölçülerindedir. Her lobülün merkezinde, sinüzoidlerin drene olduğu, nispeten büyük bir venül olan terminal hepatik venül (santral ven) bulunmaktadır. Hepatosit hücre kordonları, sinüzoidler gibi santral venden lobülün periferine doğru ışınal şekilde uzanırlar. Klasik lobüllerin kesiştiği yerde portal triadların varlığıyla karakterize gevşek stromal bağ dokusu olan portal alanlar (portal kanallar) bulunmaktadır. Bu bağ dokusu karaciğerin fibröz kapsülüyle devamlılık göstermektedir. Lobüller arası (interlobüler) bölgede ise bağ dokusu oldukça azdır. Portal alanlarda hepatik arter, portal ven ve safra kanalikülü (portal triad) başta olmak üzere kan damarları, sinir lifleri ve bağ doku elemanları bulunur. Portal alanlar lobülün periferindeki hepatositler tarafından sınırlandırılmaktadır. Portal kanalın kenarlarında, bağ dokusu yapısındaki stroma ile hepatositlerin arasında periportal aralık (Mall aralığı) olarak adlandırılan dar bir aralık bulunmaktadır. Bu aralığın, karaciğerde lenf sıvısının kaynaklandığı yerlerden biri olduğu düşünülmektedir (41, 42).

- **Portal lobül**

Portal lobül, karaciğerin ekzokrin fonksiyonlarının önemini belirtmektedir. Karaciğerin başlıca ekzokrin fonksiyonu safra salgılanmasıdır. Böylece, portal lobülün morfolojik eksen, klasik lobülün portal triadının interlobüler safra kanalıdır. Portal lobülün dış kenarları, bir portal triada en yakın üç santral ven arasında çizilen sanal çizgilerdir. Bu çizgiler kabaca üç klasik karaciğer lobülünün safra kanalına drene olan safrayı üreten kısımlarını içeren üçgen doku bloklarını tanımlarlar. Bu konsept, karaciğer parankiminin yapısının, diğer ekzokrin bezlerin parankimlerine benzer olarak tanımlanmasına olanak sağlamaktadır (41, 42, 45).

- **Karaciğer asinüsü**

Karaciğer asinüsü, kan perfüzyonu, metabolik aktivite ve karaciğer patolojisi arasında en iyi korelasyon sağlayan yapısal birimdir. Karaciğer asinüsü (hepatik asinüs) eşkenar dörtgen şeklindedir ve karaciğer parankiminin en küçük fonksiyonel birimini temsil etmektedir. Asinüsün kısa eksen, portal triadın iki klasik lobül arasındaki sınır boyunca uzanan terminal dalları tarafından belirlenmektedir. Asinüsün uzun eksen, kısa eksene en yakın iki santral ven arasında çizilen bir çizgidir. Bu nedenle, iki boyutlu görünümde karaciğer asinüsü, komşu klasik lobüllerin parçalarından oluşmaktadır. Bu organizasyon şekli, karaciğerin ekzokrin salgılama fonksiyonunun, portal lobülünkine benzer şekilde tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Her karaciğer asinüsündeki hepatositler, kısa eksen çevreleyen, elips şeklinde üç konsantrik zon halinde incelenmektedir (41, 42, 46).



Şekil 2.3. Karaciğer lobülleri (41).

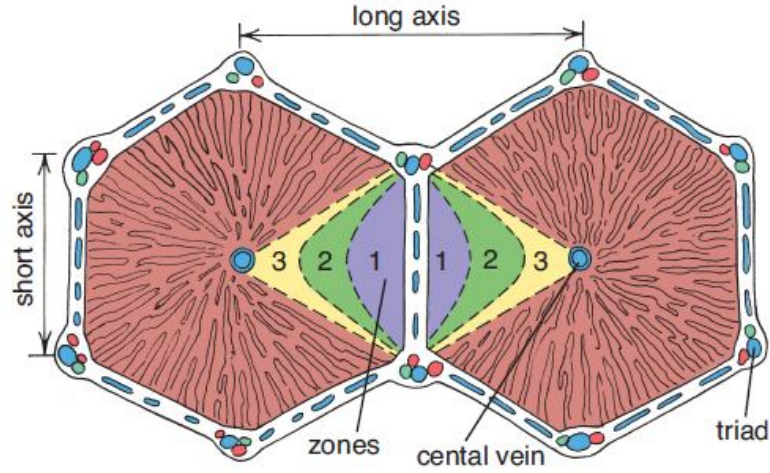
Zon 1, kısa eksene ve portal venin ve hepatik arterin penetre edici dallarından gelen kan desteğine en yakın olandır. Bu bölge klasik lobüllerin periferine karşılık gelmektedir.

Zon 3, kısa eksenden en uzak ve terminal hepatik vene (santral ven) en yakın olan zondur. Bu zon, klasik lobülün terminal hepatik veni çevreleyen merkezi kısmına karşılık gelmektedir.

Zon 2, 1. ve 3. zonlar arasında yer almaktadır, fakat aralarında keskin sınır yoktur.

Zonasyon (zonlanma), karaciğer hücrelerinin vasküler perfüzyonunun derecesi ya da kalitesiyle ilişkili olarak karaciğer parankiminde dejenerasyon, rejenerasyon ve spesifik toksik etkilerin tanımlanmasında ve yorumlanmasında önemlidir. Sinüzoidal kan akımının bir sonucu olarak, oksijen konsantrasyonu, hepatositlerin metabolik aktiviteleri ve karaciğer enzimlerinin dağılımı bu üç zon boyunca değişkenlik göstermektedir. İskemik ve toksik maddelere maruziyet nedeniyle oluşan karaciğer hasarının dağılımı, bu zonlar kullanılarak açıklanabilir (41, 42, 47).

Zon 1'deki hücreler, oksijeni, besin maddelerini ve toksinleri sinüzoidal kandan alan ve safra kanalı tıkanıklığını takiben morfolojik değişiklikler gösteren ilk hücrelerdir. Bu hücreler dolaşım bozukluğunda en son ölen ve ilk dejenere olan hücrelerdir. Bununla birlikte, zon 3'teki hücreler, perfüzyondaki azalma durumunda iskemik nekrozu (sentrilobüler nekroz) ve yağ birikimini ilk gösteren hücrelerdir. Bu hücreler, safra stazına ve toksik maddelere en son yanıt veren hücrelerdir. Zon 1 ve 3 arasında enzim aktivitesi, sitoplazmik organellerin sayı ve büyüklükleri ve glikojen birikimlerinin boyutunda da normal değişiklikler görülmektedir. Zon 2'deki hücreler, zon 1 ve 3'teki hücrelere göre orta düzeyde fonksiyonel ve morfolojik karakteristiğe ve yanıtı sahiptirler (41, 42, 48, 49), (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Karaciğer asinüs zonları (41)

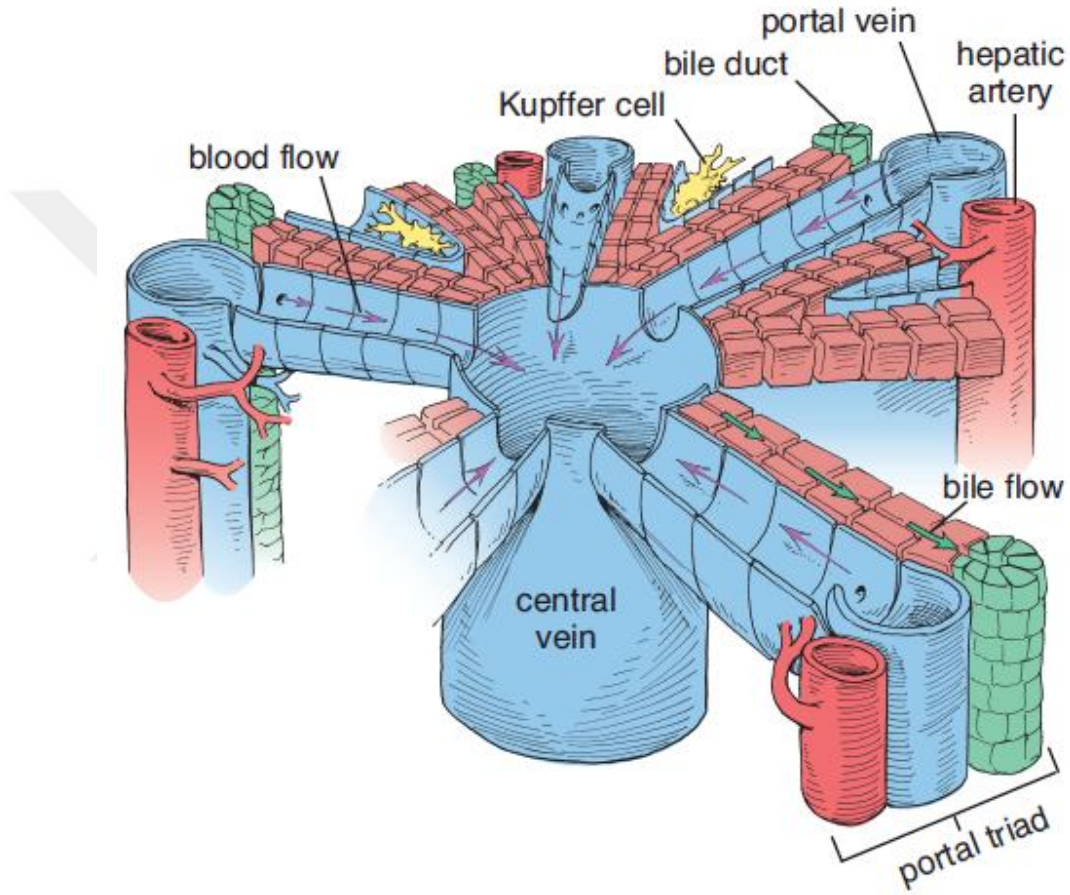
2.2.2.2. Karaciğerin Damar Tipleri ve Kan Akımı

Portal kanallarda bulunan kan damarları interlobüler damarlar olarak adlandırılmaktadırlar. Sadece en küçük portal triadları oluşturan interlobüler damarlar sinüzoidlere kan gönderirler. Daha büyük interlobüler damarlar, lobülün periferinde yer alan dağıtıcı damarları oluşturacak şekilde dallanırlar. Bu dağıtıcı damarlar, sinüzoidlere giriş damarları gönderirler. Sinüzoidlerde kan merkeze, santral vene doğru akmaktadır. Santral ven klasik karaciğer lobülünün merkezi eksenı boyunca ilerler, lobül içinde ilerledikçe kalınlaşır ve bir sublobüler vene boşalır. Birkaç sublobüler ven, vena kava inferiora boşalan daha büyük hepatik venleri oluşturmak üzere birleşirler.

Karaciğerdeki portal ven ve dallarının yapısı, genel olarak tipik venlerin özelliklerini göstermektedir. Lümeni, ilişkili olduğu arterin lümeninden çok daha geniştir. Hepatik arterin yapısı diğer arterlere benzemektedir (kalın müküler bir duvarı vardır). Sinüzoidlere direkt arteriyel kan sağlamasının yanında, hepatik arter büyük portal kanallardaki bağ dokusuna ve diğer yapılara da arteriyel kan sağlamaktadır. Bu büyük portal kanallardaki kapillerler, kanı interlobüler venlere, bu venler sinüzoidlere boşalmadan önce geri götürürler.

Kanı hepatik sinüzoidlerden alan santral ven ince duvarlı bir damardır. Santral venin endotelial döşemesi, spiral olarak düzenlenmiş az miktarda bağ dokusu lifleri tarafından çevrelenmiştir. Klasik lobül içindeki merkezi pozisyonundan dolayı bu şekilde adlandırılan

santral ven, aslında hepatik venler sisteminin terminal venülüdür ve bundan dolayı terminal hepatik venül olarak adlandırılması daha uygundur. Sublobüler ven, terminal hepatik venüllerden kan almaktadır ve endotelin hemen dışında hem kollajen hem de elastik bağ dokusu liflerinden oluşan belirgin bir tabakaya sahiptir. Sublobüler venler ve drene oldukları hepatik venler tek başlarına ilerlerler. Hepatik venlerde kapakçık (valf) yoktur (41, 42), (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Karaciğer lobül kan ve lenf akımı (41)

Hepatik sinüzoidler, tip III kapiller (sinüzoid kapiller) yapısında olup kesintili endotel hücreleri ile kaplıdır (42, 50). Kapiller endotelleri diyaframsız, geniş fenestralar içerirler. Ayrıca komşu endotel hücrelerinin aralarında Kupffer hücrelerinin yerleştiği geniş aralıklar bulunmaktadır.

Hepatik sinüzoidler, duvarlarındaki ikinci bir hücre tipi olan stellat sinüzoidal makrofaj ya da Kupffer hücresinin sinüzoid duvarının normal bir elamanı olmasıyla diğer

sinüzoidlerden farklıdır (41). Kupffer hücreleri mononükleer fagositik sisteme aittirler (50). Mononükleer fagositik sistemin diğer üyeleri gibi Kupffer hücreleri de monositlerden köken almaktadırlar (41). Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) (41), Kupffer hücrelerinin sinüzoid duvarının elamanı olduklarını açıkça göstermektedir (41, 42). Önceden Kupffer hücreleri endotel hücrelerinin luminal yüzeylerinde bulunur şekilde tanımlanmışlardır. Bu eski histolojik tanımlama muhtemelen Kupffer hücrelerinin uzantılarının luminal tarafta bazen endotel hücrelerinin uzantılarının üzerine binmeleri nedeniyle. Kupffer hücreleri komşu endotel hücreleriyle bağlantı oluşturmazlar. Kupffer hücrelerinin uzantılarının sıklıkla sinüzoidal lümeni katettikleri ve neredeyse kısmı olarak oklüzyona uğrattıkları gözlenir. Kupffer hücrelerinin sitoplazmalarında kırmızı kan hücre fragmanlarının ve ferritin formunda demirin bulunması, bu hücrelerin dalaktan karaciğere gelen hasarlı ya da yaşlanmış eritrositlerin son yıkımlarında görevli olabileceklerini düşündürmektedir. Ferritin demirinin bir kısmı hemosiderin granüllerine dönüştürülerek hücrelerde depolanabilir. Bu fonksiyon splenektomiden sonra kırmızı kan hücrelerinin ortadan kaldırılması için gerekli olduğundan yüksek düzeyde artmaktadır (41, 42).

Perisinüzoidal aralık, kan ile karaciğer hücreleri arasında madde alış verişinin olduğu alandır. Perisinüzoidal aralık diğer adıyla Disse aralığı, hepatositlerin sinüzoidal yüzeyleri ile sinüzoidleri döşeyen endotel hücrelerinin ve Kupffer hücrelerinin hepatositlere bakan yüzeyleri arasında yer almaktadır. Hepatositlerin Disse aralığına bakan yüzeyinde bu aralığa doğru küçük, düzensiz mikrovilluslar uzanmaktadır (41, 42).

Mikrovilluslar, hepatositlerle plazma arasında madde alış verişini sağlayan yüzey alanını altı kat kadar arttırmaktadırlar. Endotel hücreleri fenestraları, endotel hücreleri arasındaki boşluklar ve kesintisiz bir bazal laminanın bulunmaması nedeniyle, sinüzoiddeki kan plazması ile hepatosit plazma membranı arasında belirgin bir bariyer bulunmamaktadır. Hepatosit tarafından sentezlenen protein ve lipoproteinler perisinüzoidal alandaki kana taşınırlar. Bu yolak safra haricindeki karaciğer salgıları içindir (41).

Perisinüzoidal alanda bulunan diğer hücre tipi hepatik stellat hücredir (Ito hücresi) (Şekil 2.6). Bu hücrelerin sitoplazmaları, A vitamininin retinil esterleri şeklinde depolandığı ana bölgelerdir (42, 50). Kronik inflamasyon ya da karaciğer sirozu gibi bazı patolojik durumlarda hepatik stellat hücreler lipid ve A vitamini depolama yeteneklerini kaybederek

miyofibroblastların özelliklerini sergileyen hücrelere farklılaşırlar. Bu hücreler hepatik fibrojenizde önemli rol oynamaktadır ve perisinüzoidal alanda Tip 1 ve Tip 3 kollajen sentezleyip birikimine neden olurlar, bu olay da karaciğer fibrozisiyle sonuçlanır (51). Fibroze bağlı olarak gelişen bu kollajen, portal alanın bağ dokusuyla ve santral veni çevreleyen bağ dokusuyla devamlılık gösterir. Perisinüzoidal fibröz stroma miktarındaki artış karaciğerin toksik maddelere verdiği yanıtın erken bir sinyalıdır (41).

Hepatik stellat hücrelerin sitoplazmaları desmin ve düz kas α -aktin filamentleri gibi kontraktıl elemanlar içermektedir. Hücre kontraksiyonu esnasında vasküler kanalı daraltıp sinüzoidlerdeki vasküler direnci arttırarak portal hipertansiyona yol açmaktadırlar. Bunlara ek olarak, hepatik stellat hücreler karaciğer hasarının onarımı esnasında ekstraselüler matriksin yeniden şekillendirilmesinde rol oynamaktadırlar (52).

2.2.2.3. Karaciğer Lenf Kanalları ve Akımı

Hepatik lenf perisinüzoidal aralıkta oluşmaktadır. Perisinüzoidal aralıkta kalan plazma, periportal bağ dokusuna drene olur. Burada, portal kanalın stroması ile en dışta bulunan hepatositler arasında periportal alan (Mall aralığı) denen küçük küçük bir alan tanımlanmıştır. Sıvı, bu toplanma bölgesinden sonra, portal triadın diğer komponentleriyle birlikte seyreden lenfatik kapillerlere girer. Lenf, gittikçe büyüyen damarların içinde safra ile aynı yönde hareket eder (hepatositlerin seviyesinden portal kanallara doğru ve sonunda karaciğer hilusuna). Hepatik lenfin %80'i bu yolağı takip eder ve duktus torasikusa drene olarak gelen lenf sıvısının büyük bölümünü oluşturur (41, 42, 53).

2.2.2.4. Hepatositler

Karaciğerde çeşitli hücreler bulunmaktadır ve bunların %80'i hepatositlerdir (50, 54). Hepatositler, karaciğer lobülünün anastomozlaşan hücre plaklarını oluştururlar. Hepatositler polihedral, 6 ya da daha fazla yüzeyli ve her düzlemde 20-30 μ m çapındaki hücrelerdir. Hepatositlerin nükleusları geniş, küre şekillidirler ve hücrenin merkezinde yer almaktadırlar (Şekil 2.6). Yetişkin karaciğerindeki birçok hücrede çift nükleus bulunmaktadır; hücrelerin çoğu tetraploiddir. Nükleoplazmada heterokromatin dağınık kümeler halinde ve nüklear zarfın

altında ayrı bir bant halinde bulunmaktadır. Her çekirdekte bir ya da iki belirgin çekirdekçik bulunur. Hepatositler, sindirim sistemi ile ilişkili hücreler arasında uzun ömürlü hücrelerdir, ortalama yaşam süreleri 5 aydır. Bunlara ek olarak hepatositler, karaciğer hastalıkları, cerrahi operasyon ya da hepatotoksik süreçler nedeniyle karaciğerin hasara uğradığı durumlarda, yüksek düzeyde rejenerasyon yeteneğine sahiptirler. Hepatosit sitoplazması genellikle eozinofiliktir (41, 42). Rutin ve özel boyama teknikleriyle spesifik sitoplazmik komponentler tanımlanabilir. Bunlar:

- Granüllü endoplazmik retikulumu (gER) ve serbest ribozomları temsil eden bazofilik alanlar.
- Her hücrede sayısı 800'den 1000'e ulaşan, vital boyama ya da enzim histokimyası ile gösterilebilen çok sayıda mitokondriyon.
- Her hücre spesifik boyama ile gözlenebilen çoklu küçük golgi kompleksleri.
- İmmünohistokimya ile gösterilen çok sayıda peroksizom.
- Periyodik asit-Schiff (PAS) prosedürü ile boyanan glikojen birikimleri. Bununla birlikte, iyi korunmuş bir HE preparatında glikojen düzensiz şekilli boşluklar olarak görülür ve genellikle sitoplazmada köpüksü bir görünüm oluşturur.
- Uygun bir fiksasyondan ve Sudan ya da toluidin mavisi ile boyamadan sonra görülen çeşitli boyutlardaki lipid damlacıkları. Rutin olarak hazırlanmış histolojik kesitlerde bazen çözünmüş lipid damlacıklarını temsil eden yuvarlak boşluklar görülür.
- Lizozomlarda bulunan lipofuskin pigmenti rutin HE boyamalarıyla çeşitli miktarlarda görülür. PAS metoduyla da belirgin sınırlı kahverengi granüller görülebilir (41, 55).

Karaciğer hücrelerinin fonksiyonel olarak iki tip yüzeyi vardır (Şekil 2.6). Bunlardan birincisi perisinüzoidal aralığa, ikincisi ise komşu hepatositler arasında ve safra kanalikülüne bakmaktadır. Perisinüzoidal aralığa bakan yüzeyler, diğer epitel hücrelerinin bazal yüzeylerine karşılık gelmektedir. Komşu hücrelere ve safra kanaliküllerine bakan yüzeyler sırasıyla diğer epitel hücrelerinin lateral ve apikal yüzeylerine karşılık gelmektedirler (41, 42, 56).

Hepatositlerde çok sayıda peroksizom bulunmaktadır. Hepatositlerde hücre başına 200-300 kadar peroksizom bulunmaktadır. Bunlar nispeten büyük ve 0.2-1.0 µm arasında değişen çapa sahiptirler. Peroksizomlar oksijenin kullanıldığı başlıca yerlerden biridir ve bu açıdan mitokondriyonlara benzer bir fonksiyon görmektedirler. Peroksizomlar büyük

miktarda oksidaz içermektedirler. Oksidaz, hücre için toksik bir ürün olan hidrojen peroksiti (H_2O_2) oluşturmaktadır. Peroksizomlarda bulunan katalaz enzimi hidrojen peroksiti parçalar. Bu tip reaksiyonlar karaciğerde meydana gelen birçok detoksifikasyon işleminde rol alırlar. Aslında, sindirilen etanolün yaklaşık yarısı karaciğer peroksizomlarında bulunan enzimler tarafından asetaldehite dönüştürülmektedir. İnsanlarda peroksizomlarda katalaz ve alkol dehidrogenaz enzimleri bulunmaktadır. Bunlara ek olarak, peroksizomlar fazla yağ asitlerinin parçalanmasında (β -oksidasyon), pürinlerin (AMP, GMP) fazlasının ürik aside yıkılmasında, kolesterol, safra asitleri ve myelin yapımında kullanılan bazı lipidlerin sentezinde görevlidirler (41, 42, 57, 58).

Hepatositlerde aER geniş yayılım gösterebilir (Şekil 2.6). aER, toksinlerin ve ilaçların parçalanmasında ve konjugasyonunda görevli enzimlerin yanında lipoproteinlerin kolesterol ve lipid kısımlarının sentezinden sorumlu enzimleri de içermektedir. Hepatositler ilaçlar, toksinler ya da metabolik uyarımlarla karşılaştıklarında aER hücrede baskın organel durumuna gelebilir. Bazı ilaçlar ve hormonlar aER aktivitesinin stimülasyonuna ek olarak yeni aER membranlarının ve ilişkili enzimlerin sentezlenmelerini indüklemektedirler. Alkol, ilaçlar (fenobarbital, anaboliksteroidler ve progesterone) ve kanser tedavisinde kullanılan bazı kemoterapötik ajanların uygulanmasından sonra aER hipertrofiye uğramaktadır. aER'nin etanol tarafından uyarılması diğer ilaçları, bazı kanserojenleri ve bazı pestisitleri detoksifiye etme yeteneğini arttırmaktadır. Diğer taraftan, aER tarafından metabolize edilen, karbontetraklorür (CCl_4) ve 3,4-benzpiren gibi bazı toksik bileşikler hepatotoksik hasarı arttırmaktadır (41, 59).

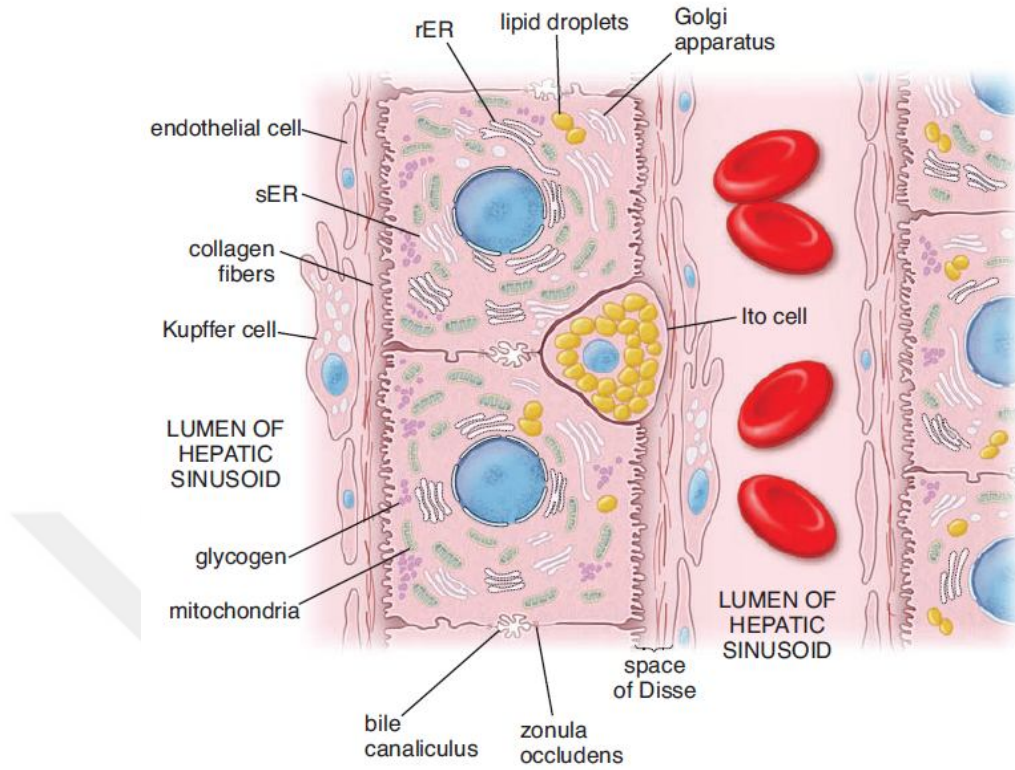
Hepatositlerde çok sayıda Golgi kompleksi bulunmaktadır (Şekil 2.6). Hepatositlerin Elektron Mikroskopik incelemeleri, Golgi kompleksinin rutin histolojik numunelerde görülenlerden daha karmaşık olduğunu göstermektedir. Karaciğerin kalın kesitlerinin gümüş çöktürme yöntemiyle hazırlanan preparatları, Golgi ağının genişliğini göstermek için uygundur. Hepatositlerde, her biri sıkıca paketlenmiş üç-beş sisternadan oluşan 50 kadar Golgi birimi ve irili ufaklı birçok vezikül bulunmaktadır. Bu birimler aslında ağır metal preparatlarında kıvrımlı Golgi kompleksinin dallarıdır. Golgi kompleksinin safra kanaliküllerinin yakınında yoğunlaşan elemanlarının safranin ekzokrin sekresyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, hücrenin sinüzoidal yüzeylerine yakın Golgi sisternaları ve veziküller 25-80 nm çapında elektron-yoğun granüller içermektedirler ve bu

granüllerin VLDL ve diğer lipoproteinlerin prekürsörleri olduklarına inanılmaktadır. Bu maddeler, hepatositlerin endokrin salgı fonksiyonunun bir bölümü olarak dolaşıma salıverilirler. Benzer yoğun globüller, aER'nin genişlemiş sisternalarında ve bazen sentezlendikleri yer olan gER sisternalarının genişlemiş uçlarında görülmektedirler (41, 42, 60).

Safra kanaliküllerinin yakınında yoğunlaşan lizozomlar, histolojik kesitlerde görülen peribiliyer yoğun cisimciklere karşılık gelmektedirler. Hepatosit lizozomları öyle heterojenlerdir ki, TEM düzeyinde bile sadece histokimyasal yolla pozitif olarak tanınabilirler. Normal lizozomal enzimlere ek olarak, TEM'in ortaya koyduğu diğer komponentler:

- Pigment granülleri (lipofuskin)
- Kısmen sindirilmiş sitoplazmik organeller
- Miyelin figürler

Hepatosit lizozomları demir (ferritin kompleksi halinde) için normal bir depo yeri, bazı depo hastalıklarında da demir birikim bölgesi olabilmektedirler. Lizozomların sayısı, basit obstrüktif safra stazı, viral hepatit ve anemi gibi çeşitli patolojik durumlarda artış gösterir. Fakat normal karaciğer fonksiyon aralığı, özellikle de safra salgılama hızı oldukça geniştir. Peribiliyer sitoplazmanın Golgi kompleksinde ya da lizozomlarında safra salgılama hızıyla ilişki kurulabilecek istatistiksel olarak anlamlı morfolojik değişiklik meydana gelmemektedir (41, 42, 57).



Şekil 2.6. Hepatositlerin ve ilişkili yapı ve hücrelerin şematik çizimi (41)

2.2.2.5. Karaciğerin Safra Kanalı Sistemi

Biliyer ağaç (Safra kanal sistemi), içinden safranin hepatositlerden safra kesesine ve oradan da bağırsağa aktığı çapı gittikçe artan üç boyutlu kanal sistemidir. Yetişkin bir insan karaciğerinde, birbiri ile bağlantılı 2 kilometreden fazla, farklı şekil ve boyutlarda safra duktülleri ve kanalları bulunmaktadır. Bu yapılar sadece pasif borular değildir; çünkü bu kanallar hormonal ve nöral stimülasyona yanıt olarak safra akışını modifiye etme ve safranin kompozisyonunu değiştirme yeteneğine sahiptirler. Biliyer ağaç, safra akımını takip eden ve safra içeriğini düzenleyen kolanjiyositler ile döşelidir. Kolanjiyositler, biliyer ağacı döşeyen epitel hücreleridir. TEM ile incelendiğinde kolanjiyositler sitoplazmalarındaki az sayıda organelleriyle, komşu hücrelerin arasındaki sıkı bağlantılarla ve tam bir bazal lamina bulunmasıyla tanınmaktadırlar. Kolanjiyositlerin apikal bölgesi, lümene çıkıntı yapan mikrovillusları ile hepatositlere benzer görünümündedir. Bunlara ek olarak, her bir kolanjiyosit,

luminal akımdaki değişimleri algılayan primer silyum içermektedir. Bu değişimler kolanjiyosit sekresyonunda değişikliklerle sonuçlanır. Küçük safra duktülleri, esas olarak kübik şekilli küçük kolanjiyositlerle döşelidir. Fakat safra kanalının çapı arttıkça bu hücreler daha büyük ve daha prizmatik şekil alırlar. Biliyer ağacın en küçük dalları, hepatositlerin safrayı salgıladığı safra kanalikülleri, ideal altı yüzlü hepatositlerin etrafında, dört yüzlü tam bir döngü oluştururlar. Safra kanaliküllerinin yaklaşık 1-2µm çapında lümenleri vardır ve hücrenin geriye kalan kısımlarından zonula adharens ve desmozomları da içeren sıkı bağlantı birimleri ile izole edilmişlerdir. Komşu iki hepatositin mikrovillusları kanalikülün lümenine uzanırlar. Safra akışı merkezden periferik doğrudur, yani terminal hepatik venül (vena sentralis) bölgesinden portal kanala doğrudur. Safra kanalikülü, portal kanalın yanında, ancak hala lobülün içinde kısa Hering kanallarına dönüşür (41, 42, 56).

Hering kanalı, kısmen hepatositlerle kısmen de kübik biçimdeki kolanjiyositlerle döşenmiştir. Kolanjiyositlere benzer olarak, hepatositlerin apikal yüzeylerinde mikrovilluslar ve sıkı bağlantılar vardır ve distal biliyer epitelde olduğu gibi bazal bölgeleri bazal laminaya oturmaktadır. Fonksiyonel olarak, Hering kanalı kontraktil aktivite sergiler, bu olay portal kanala doğru olan tek yönlü safra akışını destekler. Hering kanalı hepatositler ve kolanjiyositler arasındaki kritik arayüzde yer aldığı için hepatik kök hücresinin Hering kanallarında ya da kanalların hemen yakınında bulunduğu öne sürülmüştür. Bu hipotez, hepatositlere büyük zarar veren patolojik durumların çoğunda Hering kanallarının yakınında karaciğer hücre prekürsörlerinin görülmesiyle desteklenmiştir. Bu hücreler göç edebilirler ve hepatositlere ya da safra kanalı hücrelerine farklılaşabilirler. İmmünohistokimyasal boyamalarla bu hücrelerin biliyer antijenlerin ve hepatosit antijenlerinin belirteçlerinin her ikisini de eksprese ettikleri ve kronik patolojik süreçler tarafından hasarlanan karaciğer dokusunun onarılmasında yer aldıkları gözlenmiştir (41, 42, 61).

Safra kanalı biliyer ağacın tamamen kolanjiyositlerle döşenmiş bölümünü temsil etmektedir. Hering kanalından gelen safra, intrahepatik safra duktülünden akmaya devam eder. İntrahepatik safra duktülü tamamen kolanjiyositlerce döşenmiştir. Hering kanalı ile safra duktülü arasındaki ana fark, yapının lobüldeki yeri değil, yapının kısmen ya da tamamen kolanjiyositlerce döşenmiş olmasıdır (41, 42).

Safra kanalları yaklaşık 1.0-1.5 µm çapındadırlar ve safrayı, portal triadın bir bölümünü oluşturan interlobüler safra kanallarına taşırlar. İnterlobüler kanalların çapı 15-40 µm arasındadır ve lobüllerin yakınında kübik şekilli kolanjiyositler tarafından döşenmiştir ve kanallar porta hepatis'e yaklaştıkça bu hücreler giderek prizmatik hal alırlar. Prizmatik hücrelerin, safra kesesinde ve ekstrahepatik safra kanallarındaki hücrelerde olduğu gibi iyi gelişmiş mikrovillusları vardır. Safra kanalları genişledikçe çok sayıda elastik lif içeren sıkı bağ dokusu kılıfı ile çevrelenirler. Kanallar hilusa ulaştıklarında bu bağ dokusunda düz kas hücreleri görülür (41, 61).

İnterlobüler kanallar birleşerek sağ ve sol hepatik kanalları oluştururlar ve bu kanallar da hilusta birleşerek ortak hepatik kanalı (duktus hepaticus communis) oluştururlar (41, 42, 62).

2.2.3. Karaciğer Fizyolojisi

Karaciğer, çeşitli moleküllerin sentezi, salgılanması gibi birbirinden bağımsız birçok fonksiyonu yapabilen bir organdır (63). Gastrointestinal sisteme bağlı bir organ olarak, önemli metabolik işlevlerin ve detoksifikasyon süreçlerinin merkezinde yer alır (64-66).

Plazma proteinlerinin çoğu karaciğer tarafından üretilip dolaşıma verilmektedir. Karaciğer, kandan vitaminlerin ve besinlerin alınması, depolanması ve dağıtılmasını sağlamaktadır. Kan glukoz düzeyinin devamlılığını sağlar ve çok düşük dansiteli lipoproteinlerin (VLDL) dolaşımdaki düzeyini ayarlar. Aynı zamanda karaciğer bir ekzokrin organdır. Safra tuzları, fosfolipidler ve kolesterol içeren safra salgısını üretir. Son olarak, karaciğer önemli endokrin-benzeri fonksiyonlar gerçekleştirmektedir. Karaciğer dolaşımdaki plazma proteinlerinin birçoğunu üretmektedir (41).

Karaciğer tarafından yapılan ve dolaşıma verilen plazma proteinleri şunlardır.

- Non-immün α -globulinler ve β -globulinler, plazma kolloid ozmotik basıncının sürekliliğini sağlarlar ve bazı maddeler için taşıyıcı protein olarak görev yaparlar.
- Protrombin ve fibrinojen, kan pıhtılaşması kaskadının önemli komponentleridir.
- Karaciğer lipoproteinleri, özellikle de VLDL'leri sentezlemektedir. Trigliseritlerin karaciğerden diğer organlara taşınmasında VLDL'ler rol oynamaktadır. Karaciğer, düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) ve yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL) gibi

plazma proteinlerini de az miktarda sentezlemektedir. Kolesterol esterlerini karaciğerden diğer dokulara LDL'ler taşırlar. HDL'ler ise kolesterolü periferik dokulardan alarak karaciğere taşırlar.

- Glikoproteinler, haptoglobin, hemopeksin ve transferrin gibi demir taşınmasında görev alan proteinlerdir.
- Albüminler, plazma kolloid osmotik basıncının devamlılığını sağlayarak plazma hacminin ve doku sıvısı dengesinin düzenlenmesinde görevlidirler.

Karaciğer bazı vitaminleri kandan alır, sonra ya depolar ya da biyokimyasal olarak modifiye eder (41, 42, 67). Bunlar:

- A vitamini karaciğerde en fazla depo edilen vitamindir (68). A Vitamin (retinol), görme işlevinin yapılmasında çok önemlidir. A Vitamin, rodopsinin sentezi için gerekli olan retinalin prekürsürüdür. A vitamininin alınmasını, depolanmasını ve dolaşımdaki seviyesinin düzenlenmesini karaciğer sağlamaktadır. A vitamin düzeyi kanda azaldığı zaman, karaciğerdeki hepatik stellat hücrelerinin depolama bölgeleri harekete geçer. Daha sonra, A vitamini retinol formunda, retinol-bağlayıcı proteine (RBP) bağlanarak dolaşıma verilir. Karaciğer RBP'yi de sentezlemektedir ve RBP sentezi plazmadaki A vitamini düzeyi tarafından düzenlenmektedir.
- D vitamini (kolekalsiferol), fosfat ve kalsiyum metabolizmasında çok önemli bir vitamindir. D vitamini besinlerden D₃ vitamini olarak alınır. Ayrıca deride, ultraviyole ışığa maruziyet sırasında 7-dehidrokolesterolün dönüştürülmesiyle de üretilmektedir. A vitamininden farkı, D vitamini karaciğerde depolanmaz ve iskelet kaslarına ve adipoz dokuya dağıtılır. D vitamini metabolizmasında karaciğerin önemli bir rolü vardır. Karaciğer, D₃ vitaminini, 25-hidroksikolekalsiferole dönüştürür. Böbreklerde D₃ vitamininden, 10 kat daha aktif olan 1.25-hidroksikolekalsiferole dönüşüm gerçekleşmektedir. D vitamini, dişlerin gelişmesi ve büyümesi ve iskelet sistemi için gereklidir.
- K vitamini, protrombin ve diğer birçok pıhtılaşma faktörlerinin karaciğer sentezinde önemlidir. D vitamin gibi, K vitamini de iki kaynaktan alınmaktadır. K vitamini ya besinlerle alınır ya da bağırsak bakteriyel florası tarafından sentezlenir. Daha sonra şilomikronlar ile karaciğere taşınır, hızlıca emilir. Karaciğerde ya kısmen kullanılır ya da kısmen VLDL fraksiyonu ile salgılanır.

Ayrıca karaciğer, demirin homeostazında, metabolizmasında ve depolanmasında görevlidir. Karaciğer, demir transferinde ve metabolizmasında görev yapan transferrin, hemopeksin ve haptogloblin dahil hemen hemen bütün proteinleri sentezlemektedir. Plazma demir-transport proteini, transferrindir. Plazmada serbest hemoglobine, haptogloblin bağlanır ve demirin korunması için bu kompleksin tamamı karaciğer tarafından plazmadan uzaklaştırılır. Serbest hem'in kanda taşınmasında hemopeksin görevlidir. Demir, karaciğer hücresinin sitoplazmasında ya ferritin formunda depolanır ya da hemosiderin granüllerine dönüştürülebilir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, demirin uzun süreli ana depolanma yerlerinin hepatositler olduğunu göstermişlerdir (41, 67).

Hepatositler ilaçların, toksinlerin ve vücuda yabancı olan diğer proteinlerin (ksenobiyotikler) indirgenmesinde görev yaparlar. Çok sayıda ilaç ve toksin hidrofilik değildir. Bu yüzden, böbrekler tarafından dolaşımdan etkin bir şekilde temizlenemezler. Karaciğer bu zararlı maddeleri daha çözünabilir formlarına çevirir. Hepatositler bu dönüşümü iki fazda gerçekleştirmektedir.

Faz I (oksidasyon): Yabancı bileşiklerin karboksilasyonu (COOH^- grubu eklenmesi) ve hidroksilasyonudur (OH^- grubu eklenmesi). Sitokrom P450 enzim sisteminin görev aldığı Faz I, hepatosit mitokondrilerinde ve granülsüz endoplazmik retikulumunda (aER) gerçekleşmektedir.

Faz II (konjugasyon): Bu fazda glukronik asit, taurin veya glisin ile konjugasyon yapar. Bu süreç, faz I'den çıkan ürünü böbreklerden kolayca uzaklaştırılması için suda daha fazla çözünabilir hale getirir (41, 67).

Karaciğer, birçok fonksiyonunun yanı sıra karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında rol almaktadır (69). Karaciğerin karbonhidrat metabolizması üzerine etkileri, öncelikle glikojen depolama, fruktoz ve galaktozu glukoza çevirme, glikoneogenez, karbonhidrat metabolizmasının ara ürünlerinden birçoğunu oluşturması olarak sıralanabilir (70).

Karaciğer, hücresel olaylar için devamlı ve yeterli miktarda besin sağladığı için karbonhidrat metabolizmasında önemlidir. Gastrointestinal sistemden emilen glukoz karaciğere geldiğinde, glukoz-6-fosfata fosforile olur. Enerji ihtiyacına göre glukoz-6-fosfat ya karaciğerde glikojen şeklinde depolanır ya da glikolitik yollarda kullanılır. Açlıkta glikojen, glikojenoliz ile parçalanır ve oluşan glukoz kan dolaşımına verilir (41).

Glukoneogenez, kan glukozunun normal seviyede kalmasını sağlamaktadır. Glukoneogenez kan glukozu normal seviyenin altına düştüğünde önemli ölçüde gerçekleşir. Bu durumda daha çok aminoasitlerden faydalanılır. Aminoasitler glukozla dönüştürülerek kan glukoz seviyesi normal duruma getirilir (68).

Normal şartlar altında ihtiyaç fazlası karbonhidratlar yağ asitlerine çevrilir. Bu yağ asitleri yağ dokusunda trigliseridlere dönüştürülerek depolanır ve karaciğere taşınır ya da kas dokusunda enerji kaynağı olarak kullanılır (71).

Hepatosit karaciğerde lipid metabolizmasında merkezi rol oynar (72). Karaciğer, lipidlerin metabolizmasında da fonksiyon görmektedir. Plazma kaynaklı yağ asitlerinin, hepatositlerde beta-oksidasyona uğraması sonucu enerji elde edilir (41, 68). Yağ asitlerinin oksidasyonu, yağ dokusundan salınan serbest yağ asitlerinin plazma konsantrasyonları ile orantılıdır. Yağ aside mobilizasyonu, glukagon ve diğer hormonlar tarafından uyarılır, insülin tarafından ise inhibe edilir (73).

Karaciğer, ekstrahepatik dokular tarafından enerji kaynağı olarak kullanılan keton cisimciklerini de üretmektedir (karaciğer enerji kaynağı olarak keton cisimcikleri kullanamaz) (41, 74).

Karaciğerin önemli diğer bir fonksiyonu kolesterol metabolizmasında rol almasıdır. Kolesterol, organellerin biyosentezinde ve safra tuzlarının oluşumunda kullanılmaktadır (41). Karaciğerin protein metabolizmasındaki en önemli rolü, aminoasitlerin deaminasyonudur. Karaciğer amonyak ile ürenin vücuttan uzaklaşmasını sağlar. Vücuttaki metabolik olaylar için önemli aminoasitlerin ve diğer maddelerin birbirine dönüşümünde etkindir. İnsan vücudunun proteinleri kullanılabilmesi için deaminasyon olması mutlaka gereklidir. Deaminasyon karaciğer ve böbrekte gerçekleşir. Ancak böbrekte olan deaminasyon karaciğerde oluşana göre daha önemsizdir. Karaciğerde ürenin oluşumu sayesinde amonyak vücuttan uzaklaştırılır. Kanda amonyak miktarının çok artması toksikasyona neden olur (68). Son olarak karaciğer, non-esansiyel aminoasitlerin sentezini ve dönüşümünü sağlar (41).

Karaciğer, pankreas, sindirim kanalı ve dalaktan kanla gelen maddeler de dahil olmak üzere çok sayıda metabolik dönüşümde yer almaktadır. Bu ürünlerin bir kısmı, karaciğerin ekzokrin salgısı olan safranin yapımında görevlidir. Safra, uzaklaştırılmak için bağırsağa geri dönen konjuge edilmiş ve indirgenmiş atık ürünleri ve bağırsakta absorpsiyona yardımcı olmak için metabolitlere bağlanan maddeleri içermektedir (41, 67).

Karaciğerin endokrin benzeri fonksiyonları şunlardır.

- D vitamini, karaciğerde dolaşımdaki D vitamininin baskın şekli olan 25-hidroksikolekalsiferole dönüştürülür.
- Büyüme hormonu (GH), pituitier bez tarafından salgılanır. GH'nin fonksiyonu karaciğerde üretilen büyüme hormonu-serbestleştirici hormon (GHRH) tarafından modifiye edilir ve gastrointestinal kanalın enteroendokrin hücrelerinin salgıladığı somatostatin tarafından inhibe edilir.
- Tiroksin, tiroid bezi tarafından tetraiyodotironin (T₄) olarak salgılanan bir hormondur. T₄ karaciğerde, deiyodinasyon ile biyolojik olarak aktif formu olan triiyodotironine (T₃) dönüştürülür.
- Pankreas, insülin ve glukagon hormonlarının her ikisi de salgılar. Bu hormonlar birçok organda indirgenirler, ancak böbrek ve karaciğer bu hormonların indirgendiği en önemli organlardır (41, 67).

2.2.4. Karaciğer Embriyolojisi

Karaciğer stroması mezodermden, parankimi ise endodermden gelişir. Karaciğer, safra kesesi ve safra yolları 3 ile 4. haftalar arasında ön bağırsağın kaudalinden ventral yönde bir çıkıntı (hepatik divertikül) olarak belirir (75-77). Kalp gelişimi sırasında, kardiyak mezodermden salınan fibroblast büyüme faktörü (FGF) salgılanır ve bipotent hücreleri etkileyerek hepatik divertikül oluşumunu uyarır (76, 78-80). İnsanlarda karaciğer divertikülü 22-24. günlerde ortaya çıkar (78). Karaciğer divertikülünün ön tarafından karaciğer ve intrahepatik safra yolları gelişirken, arka tarafından safra kesesi ve ekstrahepatik safra yolları gelişir (79). Divertikül, gelişmekte olan kalp ve mide arasındaki splanknik bir mezoderm kitlesi olan septum transversum doğru uzanır (76). Karaciğer divertikülünün büyümesini etrafındaki bu mezoderm desteklemektedir (80-82).

Septum transversum bu bölgedeki ventral mezogastriyumu oluşturur. Hepatik divertikül, hızla büyüyerek ventral mezogastriyumun iki yaprağı arasında büyüyen iki parçaya bölünür (76). Hepatik divertikülün daha büyük olan kranial parçası, karaciğer taslağı 'primordium hepaticum' adını alır (75, 82, 83). Uygun sinyaller etkisiyle hepatik divertikül, hepatosit kordonları şeklinde düzenlenen hepatoblastlara farklılaşır. Hepatoblastlar da

hepatositlere dönüşür ve aralarında safra kanallıkları şekillenir, ayrıca divertikülden hepatik kanallar gelişir (84).

Endodermal hücreler çoğalarak, hepatosit kordonlarını ve intrahepatik safra yollarını döşeyen epitel hücrelerini oluştururlar. Hepatik kordonlar, endotelle döşeli boşlukların çevresinde ağ oluşturarak hepatik sinüzoidlerin taslaklarını meydana getirirler. Karaciğerin hematopoetik dokusu, fibröz dokusu ve Kupffer hücreleri septum transversum mezenşiminden gelişir. Beşinci haftadan onuncu haftaya kadar karaciğer hızla büyümeye devam eder ve karın boşluğunun üst kısmının büyük bir bölümünü kaplar. Karaciğer gelişimini ve fonksiyonel segmentasyonunu, umbilikal venden gelen kanın oksijen miktarı belirler (76).

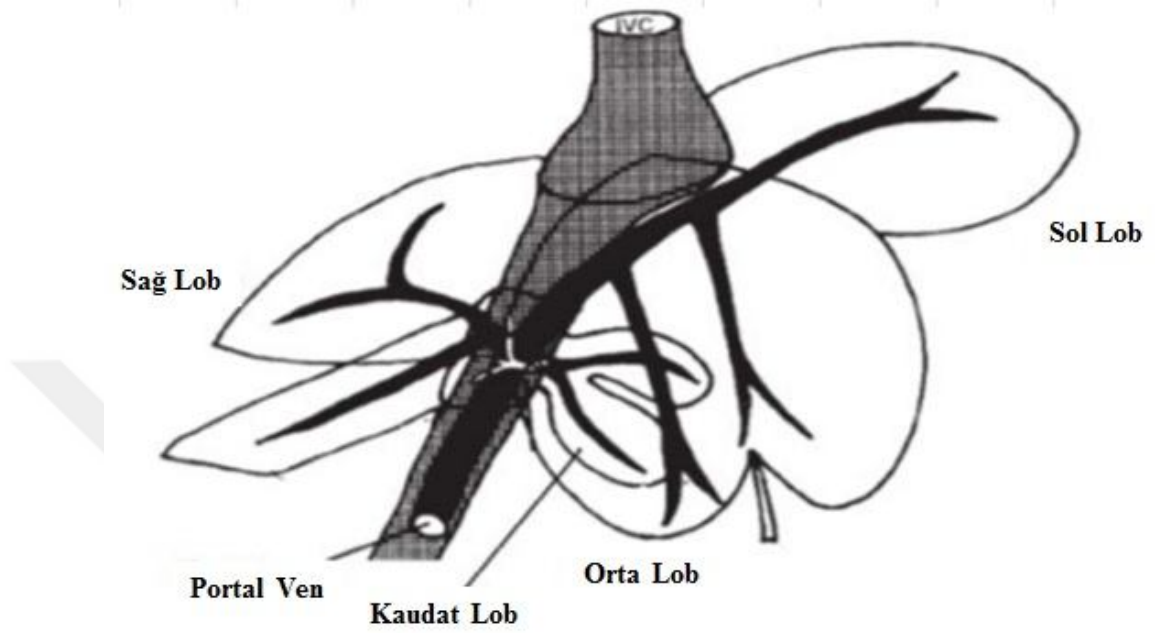
Septum transversuma ait mezoderm, karaciğerin bağ dokusu kısmını oluşturarak organı, lob ve lobüllere ayırır (85). Başlangıçta karaciğerin sağ ve sol loblarının büyüklüğü aynıdır ancak kısa bir süre sonra sağ lob daha fazla büyür (76). Karaciğerin sol lobu, midenin gelişimi nedeniyle boş yer bulmakta zorluk çeker (83). 6. haftada başlayan hematopoez karaciğere parlak, kırmızı bir renk verir. 9. haftayla birlikte, karaciğer fetusun toplam ağırlığının yaklaşık %10'unu oluşturur (76). İntrauterin 12. Haftada hepatositler safra yapımına başlar (80, 82). Hepatik divertikülün kaudal parçasından (pars sistika) safra kesesi, divertikülün sap kısmından ise sistik kanal oluşur (76, 83).

Başlangıçta, epitel hücreleri ekstrahepatik safra kanallarını tıkamıştır fakat daha sonra epitel hücrelerin dejenerasyonu ile vakuoller oluşur ve kanal gelişir. Duodenumu hepatik ve sistik kanallara bağlayan kordondan, koledok kanalı gelişir. Koledok kanalı başlangıçta duodenum halkasının ön kısmına bağlıdır fakat duodenumun gelişmesi ve rotasyonu ile arka yüze taşınır. 13. haftadan sonra koledok kanalından geçerek duodenuma giren safra, mekonyuma koyu yeşil bir renk verir (76).

2.2.5. Ratlarda Karaciğerin Yapısı ve Özellikleri

Karın boşluğunda sağ üst tarafta geniş yer kaplayan karaciğer ortalama bir sıçanda yaklaşık 10 g ağırlığındadır. Karaciğerin büyük bölümü diafragma ile sağ alt kostaların altında yerleşmiştir. Area nuda bölgesi dışında peritonla sarılı olarak bulunur (86, 87).

Karaciğer derin oluklar ile sağ lob, sol lob, kaudat lob ve orta lob olmak üzere 4 lobdan meydana gelir (86, 87), (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Sıçan karaciğer anatomisi (88).

Ligamentum teres hepatis'in oluşturduğu bir yarıkla ikiye ayrılan orta lob, sol lobun üstüne şapka şeklinde yerleşmiştir. Sağ lob, sağ böbreğin üzerine oturmuş olup vena cava inferior'u sarmaktadır. Sıçanlarda safra kesesi bulunmadığı için karaciğerin tüm loblarından toplanan safra kanallarla boşalmakta ve bu kanalların birleşiminden oluşan hepatik kanaldan bir tüp şeklinde doğrudan duodenuma açılmaktadır (86, 87), (Şekil 2.8).



Şekil 2.1. Rat karaciğerinin görünümü (87).

Histolojik organizasyon ve fizyolojik fonksiyon açısından rat karaciğeri insan karaciğeriyle oldukça büyük benzerlik göstermektedir.

2.3. UW Solüsyonu

Wisconsin Üniversitesinde 1980'lerin başında pankreas ve karaciğer transplantasyonuna başlandığında bu organların 24 saatten uzun süre korunamadığı takdirde transplantasyon işlemlerinin efektif yürütülmesinin zor olduğu farkedildi. Bu yıllarda Collins solüsyonu kullanılmakta ve 4-8 saatlik prezervasyon sağlanabilmekteydi. Bu sürenin kısa olması organların alınabileceği uzaklığı azaltmakta, iki cerrahi ekip oluşturulmasını zorunlu kılmakta (biri organ alımı diğeri transplantasyon) ve ameliyatın acil koşullarda yapılmasına neden olmaktaydı. Bu sorunlar nedeniyle Wisconsin Üniversitesi laboratuvarında böbrek ve karaciğer prezervasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Sıcak ve soğuk iskemi ve reperfüzyon hasarının mekanizması ile ilgili bilgiler ışığında karaciğer ve pankreasın prezervasyonunu olumlu yönde etkileyecek maddeleri içeren ve Wisconsin Üniversitesi solüsyonu adı içeren bir soğuk muhafaza solüsyonu geliştirildi. Klinik çalışmalarla UW solüsyonunun iyi sonuçlar verdiği doğrulandı. UW solüsyonunun temel bileşenleri kullanılarak başka araştırmacılar tarafından benzer solüsyonlar da geliştirildi. UW solüsyonu pankreas, böbrek, kalp, barsak, karaciğer, akciğer gibi farklı organların prezervasyonlarında kullanılabildiğinden diğer prezervasyon solüsyonlara üstünlük göstermektedir. UW solüsyonun ve diğer solüsyonlarının etkinliğinin farklı olmasının nedeni tam olarak bilinmemektedir. En uzun süreli organ prezervasyonu, UW solüsyon ile elde edilmektedir (1, 89).

Yapılan birçok deneysel çalışmada UW solüsyonunun diğer solüsyonlarla karşılaştırıldığında damar endotelini daha iyi koruduğu gösterilmiştir (89). Solüsyonun osmolalitesi 320 mosm/L, oda ısısında pH'sı 7.4 olup, potasyum 135 mmol/L, sodyum 35 mmol/L, magnezyum 5 mmol/L olup, ayrıca allopurinol, glutatyon, insulin ve dexamethason, bactrim gibi koruyucu maddeler ilave edilmiştir (90, 91).

UW solüsyonun içerisinde bulunan maddeler, serbest oksijen radikalleri oluşumunu azaltarak bunların hasar yapıcı etkisini önemli ölçüde azaltırlar. Laktobiyonat, rafinoz ve

hidroksietil starch ise transkapiller osmotik sıvı geçişini azaltarak, hipotermik koruma sırasında hücresel ödemin önüne geçer (92, 93).

Ayrıca laktobiyonat ve glutatyon güçlü birer matriks metalloproteinaz (MMP) inhibitörüdür (94, 95). UW solüsyonunun elektrolit konsantrasyonu, hücre içi elektrolit konsantrasyonuna eşdeğer olduğu için, hücre membranında Na^+ ve K^+ geçiş gradienti, dolayısıyla hücre içerisine Na^+ ve su girişi azalır, sonuç olarak intraselüler ödem oluşumu engellenir. Ayrıca hücre membranında Na^+ ve K^+ geçişi minimal düzeyde olduğu için Na-K-ATP-az pompası çok az kullanılmakta ve ATP korunmaktadır. UW solüsyonunda bulunan allopurinol, ksantin oksidazı inhibe ederek serbest oksijen radikallerinin üretimini engellemektedir. Glutatyonda yine antioksidan etki göstermektedir. Adenozin, reperfüzyon sırasında ATP yapımını kolaylaştırmakta, magnezyum ise membran stabilizasyonunu sağlamaktadır. Bu etkilerinden dolayı, UW solüsyonu organ prezervasyonunda ideale yakın bir solüsyon olarak karşımıza çıkmaktadır (96).

UW solüsyonu içeriğindeki glutatyon ve adenozin iskemi süresince oksijen radikallerinin sitotoksik etkisini azaltır, reperfüzyon döneminde ATP sentezini stimüle eder ve dolayısıyla iskemiye hassas hücrelerin daha iyi korunmasını sağlar (92).

Tablo 1 ve Tablo 2’de UW solüsyonuna ait çeşitli özellikler ve solüsyon içerikleri verilmiştir.

Tablo 2.1. UW Solüsyonunun Özellikleri (4)

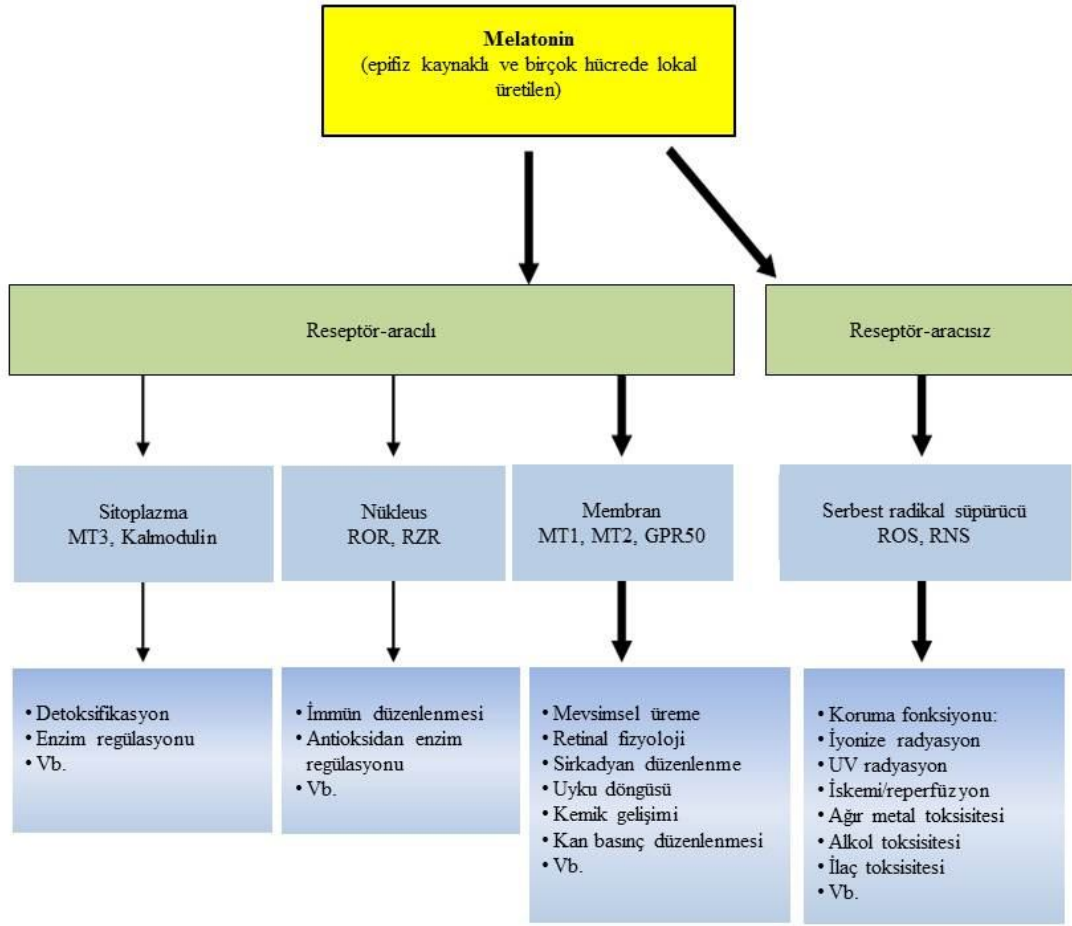
	UW (VIASPAN)
İçerik	K+ düzeyi yüksek
Vizkozite	6.2 cp-yüksek-
Hacim	6–8 lt- 50–80 ml/kg
Akışkanlık	Düşük
Soğutma	Yavaş
Yan etki	Kardiyak arrest
Maliyet	1900–2600 dolar
Flushing	Var

Tablo 2.2. UW Solüsyonu İçeriği ve Fonksiyonu (1, 4, 89)

İÇERİKLER	UW	FONKSİYONLARI
Osmolarite (mosm/L)	320	
Sodyum (mmol/L)	40	
Potasyum (mmol/L)	120	
Magnezyum(mmol/L)	5	Membran stabilizatörü
Kalsiyum (mmol/L)	-	
Sülfat (mmol/L)	5	
Laktabiyonat(mmol/L)	100	Hücrel şişliği engeller, geçirgen olmayan anyon
Fosfat(mmol/L)	25	Tampon-pH düzenler
Raffinoz (mmol/L)	30	Hücrel şişliği engeller
Adenosin (mmol/L)	5	ATP prekürsörü, radikal temizleyici, vazodilatör
Glutasyon (mmol/L)	3	Antioksidan-radikal temizleyicidir
Allopurinol (mmol/L)	1	Ksantinoksidaz inhibitörü, radikal temizleyici
Histidin (mmol/L)	-	Antioksidan
Triptofan (mmol/L)	-	Membranoprotektif etki
Ketogluterat(mmol/L)	-	Membranoprotektif etki
Starch(g/L)	50	İnterisyel ödemi azaltır+kolloid
Mannitol (mmol/L)		Antiödem, antioksidan
pH	7,2–7,4	

2.4. Melatonin

Melatonin; endojen olarak başlıca pineal bezden (epifiz bezi) salgılanan, uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur (7, 8). Ayrıca, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla sitoprotektif ve antioksidan etkilere de sahip olduğu gösterilen melatoninin, kanser ve yaşlanmanın önlenmesinde de etkili olabileceği öne sürülmektedir. Sentezini takiben, pineal bezden doğrudan dolaşıma verilir. Lipofilik özelliği sayesinde hücrelerin tüm kompartmanlarına girebilen melatonin için sitozolik ve nükleer bağlanma bölgeleri de tanımlanmıştır (9). Böylece melatonin, hücre zarını, organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikal hasarından koruyabilmektedir. Hücre membranı ile temas ettiğinde, fosfolipid tabakanın dış yüzeyine tutunan melatonin, radikallerle membrandan önce temasa geçerek onları detoksifiye eder ve membranı korur. Melatonin varlığında, mitokondriyal solunum zincirinden kaynaklanan radikallerin üretimi de azalmaktadır. Çekirdeğe kadar ulaşabilme özelliği, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, melatonine bir üstünlük sağlamaktadır (10, 11). Yapılan çeşitli çalışmalar melatoninin oksidatif karaciğer hasarını önlemede etkili olduğunu işaret etmektedir. Farelerde yapılan kolestaz ile birlikte alfa-naptili sotiokyanat tarafından uyarılan karaciğer hasarına karşı melatoninin koruyucu etkisi gösterilmiştir. Ayrıca melatonin karbon tetraklorür uygulanmış farelerde karaciğer lipit peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Melatoninin alkolik karaciğer hasarında oksidatif stresi, inflamatuvar yanıtı ve apoptozisi azaltarak koruyucu etki gösterdiği yönünde bulgular bildirilmektedir (97), (Şekil 2.9).

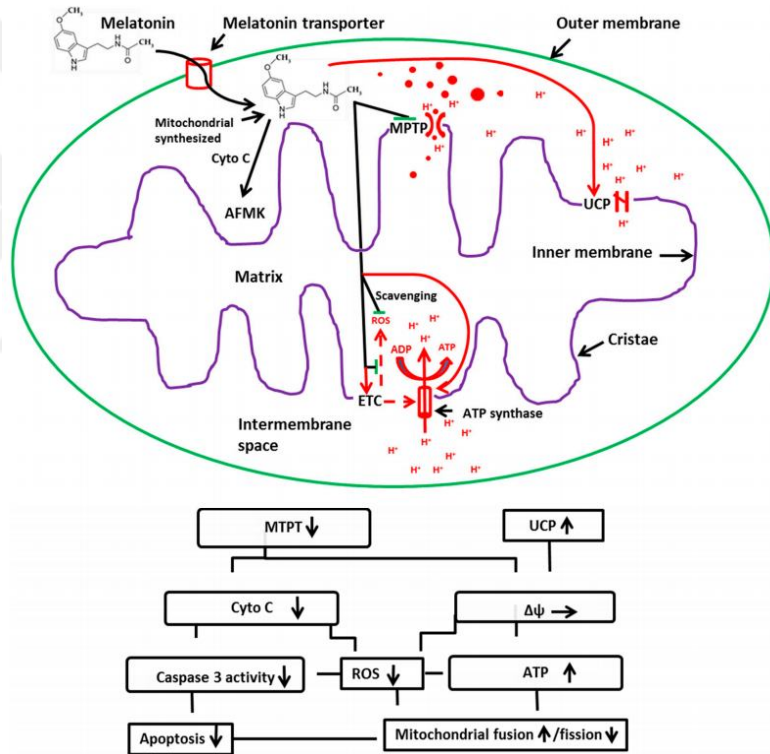


Şekil 2.8. Melatonin insanlardaki çeşitli fonksiyonları (98).

2.4.1. Melatonin ve Mitokondri İlişkisi

Mitokondri, serbest radikal oluşumunun önemli bir bölgesidir, çünkü elektron transport zinciri yoluyla transferleri sırasında ortaya çıkan elektronlar, moleküler oksijeni süperoksit anyon radikaline ($O_2^{\cdot -}$) indirger. Bu oksitleyici madde, geçiş metallerinin varlığında $OH^{\cdot -}$ 'ye dönüştürülen hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturmak üzere hızla değişime uğrar. Alternatif olarak, $O_2^{\cdot -}$ yüksek toksik olan peroksinitrit ($ONOO^{\cdot -}$) üretmek üzere nitrik oksit ile birleşebilir. Melatonin mitokondriyal düzeyde bir antioksidan oldukça etkilidir. Mitokondriyonlarda melatoninin koruyucu etki gösterdiği geçerliyse, melatonin mitokondriyal hasarı azaltmak ve enerji üretimini korumak için büyük bir avantaj sağlayacaktır (99), (Şekil 2.10).

Mitokondriyonlarda yüksek düzeyde konsantre olan mitokondriyal hedefli sentetik antioksidanlar olan Mito Q ve Mito E ile karşılaştırıldığında (100), melatonin bu organelin hasarını her yönüyle azaltmada daha etkilidir (101). Bunun anlamı, melatonin herhangi bir yolla uygulandığında, mitokondri matriksinde biriktiği bilinen sentetik antioksidanlardan daha etkili olduğu ve mitokondriye yüksek miktarda ulaştığı ve bu kritik öneme sahip organellerin işlevini koruduğu bilinmektedir. Melatonin, endojen olarak üretilmesinin yanı sıra, diyetle veya hap olarak alındığında da mitokondriye kolaylıkla ulaşır. Bu nedenle, doğal olarak meydana gelen mitokondriyal hedefli bir antioksidan olarak sınıflandırılabilir. Melatonin, mitokondriyal elektron taşıma proteinleri üzerinde düzenleyici etkileye sahip olabilir, ancak bu fonksiyonların mekanizması henüz tam olarak tanımlanamamıştır (98).



Şekil 2.9. Melatoninin mitokondri üzerindeki etkileri (102).

2.5. Organ Prezervasyonu

2.5.1. Prezervasyon Prensipleri

Organ transplantasyonunun tüm basamaklarında, organın içyapısında önemli değişikliklere neden olur. Organların vücuttan çıkartıldıktan sonra korunmasında en önemli

etken iskemi ve hipotermidir (103). İskemi sonucu hücre içi hidrojen miktarı artar ve pH düşer. pH'nın düşmesi, aerobik metabolizmayı anaerobik hale çevirir ve laktik asit miktarı artar. İskemiyle beraber hücre zarı geçirgenliği de artar. Kalsiyum hücre dışından hücre içine geçer. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun yükselmesi, damar düz kaslarında kontraksiyonu başlatır. Bu da vazospazma ve iskemik hasara neden olur (90).

Organ kanlanması kesilmesi yoluyla gelişen iskemik süreçte eğer metabolizma yavaşlatılabilirse, gelişecek olan hücre hasarı da doğru orantılı olarak yavaşlayacaktır. Hücre metabolizmasının yavaşlatılmasında temel faktör hipotermidir (104). Hipotermi, metabolizmayı ve hücredeki enzimatik yıkımı yavaşlatır. Doku ısısının 37°C dereceden 0°C dereceye düşürülmesi ile hücredeki metabolizma hızı 12 kat yavaşlar. Hipotermi sonucu mitokondriyal enzim aktivitesi de azalır (90, 105). Hipotermi, bu yararlı etkilerinin yanında hücre zarı yapısında değişikliklere ve ATP pompa aktivitesinin bozulmasına neden olur. Hücre zarının geçirgenliğinin artması sonucu Na^+ hücre içine girerken, K^+ hücre dışına çıkar ve hücre içinde onkotik basınç artar, hücre içine su çekilir, hücre şişer ve parçalanır (104, 106).

2.5.2. Prezervasyon Hasarı Mekanizmaları

A) Pre-prezervasyon Hasarı

Preprezervasyon hasarı, nakledilecek organda önceden mevcut olan hasardır. Yani prezervasyon solüsyon infüzyonu yapılmadan önce meydana gelmiş olan hasarlardır (107).

B) Soğuk Prezervasyon Hasarı

Organ korunması için standart metod, soğuk prezervasyonudur. Karaciğerde metabolik aktiviteyi azaltabilmek için kullanılacak solüsyonun ısı 0–4°C arasında tutulur ve enerji ihtiyacı azalmış olur. Nakledilecek organda, her 10°C'lik azalma ile metabolik aktivite 1.5-2.5 kat azalır. Sıcaklığın, enzimlerin aktivitesi üzerine etkisi ise değişkendir. Örneğin, Na-K ATP-az ve Ca-ATP-az enzimlerinin aktiviteleri sıcaklık 20°C'nin altına düşünce fonksiyonları tamamen dururken, bazı proteazlar 1°C sıcaklıkta bile fonksiyonlarını devam ettirebilirler (108).

C) Sıcak İskemi Hasarı

Donörden alınan karaciğerin ameliyat alanına getirilmesi ile başlar ve anastomozlar tamamlanıncaya kadar devam eder. Bu süreçte karaciğer tedrici olarak ısınır ve yeterince perfüze olamaz, ortalama 40 dakika (dk) geçtikten sonra karaciğerin merkez sıcaklığı 2°C'den 20°C'ye kadar yükselir. Bununla beraber enzim aktivitesi ve metabolik hız artar, geriye kalan glikojen depoları da çok hızlı bir şekilde tüketilir. Bu derecedeki sıcaklıklar sinüzoidal endotelial hücrelerden daha çok hepatositlere zararlıdır. Sıcak iskeminin uzun süre devam etmesi, tek başına organ yetmezliğine neden olabilir (109).

D) Reperfüzyon Hasarı

İskemi sonrası oluşan reperfüzyon, karaciğerde hasara neden olur. Bu hasar, normalde aktif halde olmayan trombosit ve lökositlerin aktive olarak endotele yapışmasına ve inflamatuvar mediatörlerin salınımına bağlıdır. Soğuk depolama periyodunda metabolik olaylar yavaş seyreder. Ancak reperfüzyon periyodundaki olaylar ise saniyeler ve dakikalar içinde gelişir. Soğuk prezervasyonun uzadığı durumlarda, yaygın trombosit, intravasküler tromboz ve beyaz küre adezyonu meydana gelir (110). Reperfüzyon periyodunun sonucunu, alıcıya bağlı faktörlerde etkiler. Örneğin alıcı hipotansif ise, greft reperfüzyonu sırasında hem diğer organlarda hem de greftte sıkıntı oluşma riski artar. Sistemik inflamatuvar yanıt sendromuna bağlı olarak alıcı kanında aktive olmuş lökosit, trombosit ve artmış inflamatuvar mediatörlerin varlığı da hasarı artıran faktörlerdir. Yapılan deneysel çalışmalarda, portal venin uzun süre klemplenmesi nedeniyle barsaklardan endotoksin salındığı, bunun sonucunda karaciğerde Kupffer hücrelerinin aktifleşerek, tümör nekroz faktör- α (TNF- α) salgıladığı ve sistemik şok benzeri bir tablo meydana geldiği gösterilmiştir (111).

2.5.3. Prezervasyon Solüsyonları

Organ korunması ve çıkartılan organın damar yoluyla yıkanması amacıyla farklı solüsyonlar kullanılabilir. Her bir solüsyonun içeriği ve yapısı farklı olmasına rağmen hepsinin de amacı aynıdır; doku harabiyetini geciktirmek, hücre ödemi önlemek ve en iyi organ fonksiyonunu sağlamaktır (103).

Son yıllarda 160–170 değişik organ koruma solüsyonu tanımlanmıştır. Bunlar arasında HTK, UW, Collins, Euro-collins, UW-PEG, Polysol, Kyoto, New Kyoto v.b. sayılabilir. Fakat tüm dünyada en sık kullanılan ve üzerinde çalışma yapılanlar HTK ve UW solüsyonlarıdır (2, 112, 113).

2.5.4. Prezervasyon Solüsyonlarının Kullanımı

Organ prezervasyonu, transplantasyon sürecinin önemli bir komponentidir ve alıcıya implantasyonuna kadar geçen süre boyunca canlılığının korunmasını sağlar(114).

Organ prezervasyon tekniklerinin temelinde transplante edilecek organı kansız hale getirme ve hipotermi sağlama ön plandadır (4). Hipotermi, hücrel metabolizmayı azaltır ancak tamamen ortadan kaldırmaz (115).

Canlı donörden organın çıkarılması ve kadavra kaynaklı organlarda ameliyat sırasında bu işlemler başlar. Karaciğer, primer olarak UW solüsyonu ile korunur, UW ile 24 saate kadar güvenli prezervasyon sağlanır (4). UW solüsyonunun organ fonksiyonlarını uzun süre korur ve enerji seviyelerini en üst seviyede tutar. UW solüsyonu karaciğer, böbrek ve pankreasın uzun süre korunmasında deneysel ve klinik çalışmalarda kullanılmaktadır (92, 96, 116).

Prezervasyonda sağlanan gelişmelere rağmen greft disfonksiyon oranı hala %5 ile %20 arasında değişmektedir (6). Primer non-fonksiyonun (PNF) yüksek olmasının nedeni, yetersiz soğuk depolama ve mükemmel solüsyonun henüz bulunmamış olmasıdır. Bu nedenle, soğuk prezervasyon sırasında organ korunmasını arttırmak için yeni stratejiler bulmak kaçınılmaz bir ihtiyaçtır (4).

2.5.5. Koruma Süreleri

Organizmadan organların çıkarılmasıyla gelişen hücre hasarı ve ölümünü önlemek için organların organizmadaki ortamına benzer yapay bir ortam oluşturmak ideal korumanın temelidir. Ancak bu ortamın aynısını oluşturmamız mümkün değildir. Bu yüzden şimdiye kadar yapılan benzer ortamlarda hücre hasarı ve sonrasında hücre ölümü tam olarak engellenememiştir (3). Her bir organ için hücre hasarı ve ölümünün maksimum süreleri

farklılık göstermektedir. Bu süreler böbrekte 72 saat, pankreasta 48 saat, karaciğerde 24 saat, kalp ve akciğerde 6 saat iken, korneada yaklaşık 1 hafta kadardır (4).

2.5.6. Karaciğer İçin Prezervasyon Teknikleri ve Stratejileri

2.5.6.1. Organın Önceden Hazırlanması

Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda iskemik hasara karşı etkili olduğu gösterilen birçok protektif yöntemin çok azı kliniğe uyarlanabilmiştir. Karaciğeri uzun iskemi süresine adapte etmek için kısa süreli iskemi ve ardından kısa süreli reperfüzyon, karaciğeri iskemiye karşı koruyan oldukça basit ve etkili bir yöntemdir. Çalışmalar bu yöntemin, normotermik iskemik karaciğerde reperfüzyon hasarını önlediğini ve ölümcül olan hasarı, ölümcül olmayan hasara çevirdiğini göstermiştir (117, 118). Bu yöntem, kaspaz yolunu inhibe ederek hepatosit ve sinüzoidal endotelyal hücre apoptozisini engeller. Endotelyal yuvarlanma, ayrılma ve MMP aktivitesini azaltır. Ek olarak reperfüzyon sonrası sinüzoidal endotelyal hücre apoptozisini tama yakın engeller (119, 120). Apoptozis mekanizmalarının erken engellenmesi, hayvan modellerinde reperfüzyon sonrası parankimal hasarı azaltır (121).

2.5.6.2. Organ Çıkartıldıktan Sonra Prezervasyon İçin En Sık Kullanılan Yöntemler

1. Basit (Sitatik) Hipotermik Saklama

Basit hipotermik saklama, en fazla kullanılan ve tercih edilen yöntemdir. Basit hipotermik saklamada, organlar çıkartıldıktan sonra soğuk koruyucu solüsyonla (+4°C) damardan yıkanır ve steril bir torbaya yerleştirilir. Bu steril torba, buz parçacıkları bulunan ikinci bir torbanın içine yerleştirilerek 0-4°C derece arasında saklanır (122-125). Bu yöntemin en önemli üstünlüğü basit, taşınmasının kolay ve ucuz olmasıdır (125). UW solüsyonundan önce, karaciğerin basit hipotermik korumayla 6 saat içinde transplante edilmesi gerekirken UW solüsyonunda basit hipotermik saklama süresi 16 saate kadar uzamıştır. Bu durum organların uzak yerlere ulaştırılmasını mümkün kılmıştır (92, 126).

2. Devamlı Perfüzyon ile Saklama (Makine Perfüzyonu)

Organların korunma süresi ve kalitesini artırmak amacıyla McAnulty JF tarafından hipotermi ve perfüzyon tekniği birleştirilerek bulunan hipotermik perfüzyon makinesi pahalı ve komplike olduğu için çok yaygın kullanılmamıştır (127). Daha sonraları hipotermi yerine normotermik makine perfüzyonu (NKP) geliştirilmiştir (128). Makine perfüzyonu, nakledilecek organda biyoyıkımı durduran ve devamlı doku prezervasyonunu sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntemle oksijen ve ATP sentezi için gerekli olan esansiyel substratlar (glukoz, aminoasit, nükleotid gibi) sürekli olarak organa taşınır. Ayrıca metabolizmanın son ürünlerini de ortamdan uzaklaştırır (122-124). Wisconsin Üniversitesinde yapılan çalışmalarda makine perfüzyonu için UW solüsyonuna benzeyen ancak laktobionat yerine glukonat içeren bir sıvı geliştirilmiştir. Laktobionat bilinmeyen nedenlerden dolayı makine perfüzyonu için uygun değildir (122).

İskemik hasar yollarının kontrolü için ATP harcanması en aza indirilmelidir. Karaciğerin oksijene edilmiş bir solüsyonla yıkanmasıyla ATP kaybının önüne geçilmiş olur. Oksijenize, kansız perfüzyon karaciğer fonksiyonlarını korur ve ATP kaybının azalmasını sağlar. St. Peter ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 24 saatlik soğuk prezervasyon sonrası sıcak oksijenize makine perfüzyonunun karaciğer fonksiyonlarını düzelttiğini göstermişlerdir. Aksine normal soğuk depolama (UW veya HTK solüsyonları) ile 24 saatin sonunda karaciğer canlılığını büyük ölçüde kaybeder (129-131).

Organların devamlı perfüzyonu içinde ideal perfüzyon solüsyonu hala tanımlanamamıştır. Perfüzyon solüsyonları organa oksijen taşıyıcı ile oksijen ulaştırmalıdır. Basit oksijene tampon solüsyonları yeterli oksijeni sağlamak için yüksek akıma ihtiyaç duyarlar ve bu solüsyonlar eritrositlerin oksijen taşıyıcısı olduğu zamanlarda görülmeyen dejeneratif değişiklikler oluştururlar (3, 132, 133).

Vücut dışı perfüzyon sistemlerinin klinikte rutin kullanılması için bu komplike makinaların pratik hale getirilmesi gerekir. Günümüzde devamlı perfüzyon prezervasyonu sadece birkaç merkezde ve böbrek nakillerinde kullanılmaktadır. Makine perfüzyonunun greft kalitesini arttırdığı ve daha uzun koruma sağladığı bilinmesine rağmen, günümüzde standart uygulanan yöntem asellüler perfüzyon solüsyonları ile organın yıkanması, 0–4°C arasında saklanması ve en kısa sürede transplantasyonun gerçekleştirilmesidir. Bu koşullarda elde edilen klinik sonuçlar kabul edilebilir sınırlar içindedir (131).

Tablo 2.3. Devamlı Prezervasyon ile Saklanan (DPS) Yöntemin, Statik Hipotermik Saklama (SHS) Yöntemine Avantajları ve Dezavantajları (107).

	SHS	DPS
Besleyici Faktörler (O ₂ , vs)	Yok	Var
Metabolitlerin Uzaklaştırılması	Yok	Var
Kanın Uzaklaştırılması	Yetersiz	Yeterli
Hücre Hasarının Saptanabilmesi	Mümkün Değil	Mümkün
Graft Disfonksiyonu	Fazla	Az
Prezervasyon Süresi	Az	Fazla
Diğer Merkezlere Nakil	Kolay	Zor
Deneyimli Personel	Gerektirmez	Gerektirir
Cihaz arızası olasılığı	Yok	Var
Ücret	Ucuz	Pahalı

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Araştırma Tipi

Çalışma deneysel hayvan çalışması olup İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde "National Institutes of Health, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" kurallarına uygun olarak gerçekleştirildi.

3.2. Araştırma Yeri ve Ortamı

Bu çalışmada kullanılan sıçanlar, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Araştırma Ünitesi'nden temin edilmiştir. Çalışmada, ortalama ağırlıkları 250–300 gr, 10-12 aylık, 28 adet Wistar Albino dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar randomize seçilerek 3 grup oluşturuldu. Sıçanlar, deney süresince optimum laboratuvar koşullarında, ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığı, $50\pm 10\%$ nemli ortam, 12 saatlik aydınlık –12 saat karanlık periyodu) polikarbon kafeslerde tutulup, standart kuru peletler halindeki sıçan yemi ile beslendi. Deneyde kullanılacak sıçanlar 12 saat önce aç bırakılarak sadece su içmelerine izin verildi.

3.3. Deney Grupları

Bu deneysel çalışma, her biri rastgele seçilen kontrol grubu 8 ve diğer gruplar 10'ar sıçandan oluşan 3 grup üzerinde yapıldı.

Grup 1 (n=8) : SF (kontrol grubu)

Grup 2 (n=10) : UW

Grup 3 (n=10) : UW + Melatonin (10 mg/kg, i.p.)

Serum fizyolojik (SF) grubundaki sıçanların karaciğer örnekleri %10'luk formaldehit bulunan falkon tüpleri içerisinde bekletildi. UW grubundaki sıçanların karaciğer örnekleri falkon tüpleri içerisinde buz üstünde UW solüsyonunda bekletildi. UW+Mel grubundaki sıçanlara hepatektomi yapılmadan 45 dakika önce tek doz 0.5 ml %5 etanolde çözülmüş 10

mg/kg melatonin intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı ve hepatektomi sonrası sıçanların karaciğer örnekleri de falkon tüpleri içerisinde buz üstünde UW solüsyonunda bekletildi.

3.4. Anestezi

Bütün hayvanların anestezisi, 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar® Eczacıbaşı Warner-Lambert ilaç sanayi, Levent, İstanbul) ve 10 mg/kg xylazine hidrokloritin (Rompun® Bayer, Şişli, İstanbul) aseptik şartlarda intraperitoneal verilmesi ile sağlandı.

3.5. Deneysel Uygulama

Anestezi alan sıçanların, insizyon sahası traşlandı. Povidon iyot ile cilt antisepsisi sağlandıktan sonra, ameliyat düzeneğine kol ve bacakları tesbit edildi. Düzenek aspirasyon riskini önlemek amacıyla, 30° eğimle tutuldu ve steril örtü, insizyon alanı açıkta kalacak şekilde kapatıldı. Orta hat insizyonu tercih edildi. Laparotomi sonrası ince barsaklar karın dışına alındı, portal pedikül tanımlandı.

Sıçanlara laparotomi yapıldıktan sonra portal ven kanülide edilerek portal pedikülün distali bağlandıktan sonra karaciğer portal ven yolu ile +4° C'deki solüsyonlar hepatik venden berrak sıvı gelene kadar perfüze edildi ve ardından hepatektomi yapıldı. Tüm deney gruplarındaki sıçanların ketamin/ksilazin anestezisi altında karaciğerleri total olarak çıkarıldı ve sıçanlar ötenazi edildi.

Karaciğer örnekleri, hepatektomi yapıldıktan sonra içinde 20 ml UW solüsyonu bulunan falkon tüplerine konuldu ve tüpler, içi buz dolu saklama kaplarına yerleştirildi. Tüm gruplardaki karaciğer örneklerinden 0. ve 12. saatlerde histolojik incelemeler için örnekler alındı. Biyokimyasal inceleme amacıyla, 0. ve 12. saatlerde MDA, GSH, TAS ve TOS analizleri için her gruptan rastgele seçilen 6 sıçana ait karaciğer doku örnekleri alındı. UW ve UW+Mel grubu 12. saatteki AST, ALT ve ALP analizleri için de rastgele 6 falkon tüpünden UW solüsyonu örnekleri alındı. Histolojik inceleme için alınan örnekler %10 formaldehit solüsyonuna konuldu. Biyokimyasal analiz için alınan doku ve UW solüsyon örnekleri ise -80°C'de muhafaza edildi.

3.6. Işık Mikroskopik Teknikler

Deney sürecinde alınan karaciğer doku örnekleri %10'luk formaldehit içerisinde her bir sıçan için ayrı saklama kabında 48 saat süreyle tespit edildi. Tespit sonunda çeşme suyunda yıkanan dokular, etanol serilerinde (%50-99.9) dehidrasyon ve ksilen serilerinde parlatma işlemlerinden geçirilerek parafin bloklar içerisine gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM 2145) yardımıyla 5 µm kalınlığında kesitler lamalar üzerine alındı. Kesitler etüvde 56°C'de 1 saat bekletildi. Deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden geçirilen kesitlere hematoxilen&ezin (HE), periyodik asit schiff (PAS) teknikleri kullanılarak histokimyasal olarak boyandı. Streptevadin biotin yöntemi kullanılarak immünohistokimyasal (IHC) Caspase 3 işaretlemesi yapıldı.

SF grubundaki karaciğer dokuları doğrudan %10'luk formaldehit içerisine konularak fiks edilmiştir. Dolayısıyla, saatler arası histolojik bulgu açısından fark olmayacağından, ışık mikroskopik değerlendirme ve gruplar arası karşılaştırmada SF grubu sadece SF 0. saat olarak ele alınmıştır.

3.6.1. Doku Takibi

Formaldehit ile tespit edilen karaciğer dokuları trimlenerek kasetlere yerleştirildikten sonra otomatik doku takip cihazında (Tissue-Tek VIP/SAKURA) aşağıdaki protokole göre doku takip basamaklarından geçirildi:

Tablo 3.1. Histolojik Doku Takip Prosedürü

1. Su	30 dk
2. Su	30 dk
3. % 80 alkol	30 dk
4. % 96 alkol	1 saat
5. % 96 alkol	1 saat
6. Absolü alkol	1 saat
7. Absolü alkol	1.5 saat
8. Ksilen	45 dk
9. Ksilen	45 dk
10. Ksilen	1 saat
11. Parafin I	40 dk (62°C)
12. Parafin II	40 dk (62°C)
13. Parafin III	40 dk (62°C)
14. Parafin IV	40 dk (62°C)

3.6.2. Mayers'in Hematoxylin&Eosin Metodu

Doku örneklerinden alınan kesitlere otomatik boya cihazı (Leica Autostainer XL) ile aşağıdaki prosedürdeki şekilde HE boyaması uygulandı.

Tablo 3.2. HE Boyama Prosedürü

1. İnkübasyon	(60°C, 50 dk)
2. Ksilen	5 dk x 3 defa
3. % 96 alkol	3 dk
4. % 96 alkol	3 dk
5. Absolü alkol	3 dk
6. Çeşme suyunda yıkama	5 dk
7. Mayer's Hematoxylin	15 dk
8. Çeşme suyunda yıkama	5 dk x 4 defa
9. Eosin	5 dk
10. %96 alkol	3 dk x 2 defa
11. Absolü alkol	3 dk x 2 defa
12. Ksilen	5 dk x 3 defa

Uygulanan bu işlemlerin ardından lamalar entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı.

3.6.3. Periodic Acid Schiff (PAS) Boyama Metodu

Deparafinizasyonu takiben distile suya alınan kesitlere sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

Tablo 3.3. PAS Boyama Metodu

Periyodi asit (0.5 g + 100 ml distile su)	5 dk
Disitle su	3 dk
Schiff	20 dk
Çeşme suyu	15-20 dk
Disitle su	3 dk
Hematoksilen	10 dk
Çeşme suyu	3 dk
Alkol %100	3 dk x 3 defa
Ksilen	3 dk x 3 defa

Uygulanan bu işlemlerin ardından lamalar entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı.

3.6.4. Caspase 3 İmmünohistokimya Boyama Metodu

Caspase 3 (CPP32, Ab-4, Rabbit Polyclonal Antibody, Thermo Scientific) immünohistokimya boyama için polilizinli lamlara alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlere deparafinizasyon aşamasını takiben sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

Tablo 3.4. İmmünohistokimya Boyama Metodu

Antijen Retrieval (Sitrata tamponu içinde, pH=6.0)	121°C, 15 dk
Distile Su	1 kez yıkama
PBS	1 kez yıkama
Peroksit Blok (Hidrojen Peroksit)	10 dk
PBS	1 kez yıkama
Protein Blok (Süper Blok)	5 dk
Primer Antikor (Caspase 3)	30 dk
PBS	1 kez yıkama
Sekonder Antikor (Biotinylated Goat Anti-polyvalent)	20 dk
PBS	1 kez yıkama
Streptevadin Peroksidaz (HRP)	10 dk
PBS	1 kez yıkama
Kromojen (1 damla kromojen + 1 ml tampon)	10 dk
PBS	1 kez yıkama
Distile Su	1 kez yıkama
Hematoksilen	60 sn
Musluk Suyu	3 kez yıkama
Distile Su	1 kez yıkama

HE ve PAS boyanan kesitler entellan kullanılarak; IHC uygulanan kesitler ise su bazlı kapatıcı kullanılarak lamel ile kapatıldı. Kesitler Nikon Eclipse Ni-U ışık mikroskobu, Nikon DS-Fi2 kamera ve Nikon NIS-Elements Documentation görüntü analiz programı (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) ile incelenerek fotoğraflar alındı.

HE ile boyanmış olan karaciğer kesitlerinde 20X objektif büyütmede 10 alan incelenmiştir. Histopatolojik değişiklikler (sinüzoidal dilatasyon, hidropik dejenerasyon, hepatosit nekrozu) 0 ile 3 arasında (0; yok, 1; karaciğerin $\leq$ % 25'inde ise hafif, 2; karaciğerin % 25'i -% 50'sini içeriyorsa orta derecede yaygın, 3; karaciğerin $\geq$ % 50 ise yaygın) maksimum toplam skor 9 olacak şekilde skorlandı. Periodic acid-Schiff ile boyanmış olan kesitlerde, hepatositlerde intrasitoplazmik glikojen boyanma yoğunluğu 0 ile 3 arasında skorlandı (0; pozitif boyanma yok, 1; zayıf boyanma, 2; orta derecede boyanma, 3; kuvvetli boyanma). İmmünohistokimyasal Caspase 3 boyaması yapılan kesitlerde sadece immün boyama şiddeti değerlendirildi. Caspase 3 immünreaktivite pozitifliği 0 ile 3 arasında skorlandı (0; boyanma yok, 1; zayıf boyanma, 2; orta dereceli yoğunlukta boyanma, 3; kuvvetli boyanma).

3.7. Biyokimyasal Analiz

Çalışma sonunda sıvı azot tankına alınan ve daha sonra -80°C derin dondurucuda bekletilen karaciğer dokularında MDA, TAS, TOS düzeyleri ve GSH aktivitesi ölçüldü.

3.7.1. Dokuların Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması

Derin dondurucuda muhafaza edilen karaciğer dokuları çalışma günü çıkarılarak tartıldı. %10'luk homojenat oluşacak şekilde fosfat tamponu ilave edilerek buz içinde 1-2 dakika süreyle 12000 devir/dakika homojenize edildi (IKA, Germany). Doku homojenatları 5000 rpm'de, +4°C, 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edildi.

3.7.2. Redükte Glutasyon (GSH) Düzeyinin Ölçümü

GSH analizi, Ellman'ın tarif ettiği yöntemle yapıldı (134). Analiz tüpünde bulunan GSH'nin 5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit ile reaksiyona girerek sarı-yeşilimsi renk vermesi ve

oluşan bu rengin ışık şiddetinin 410 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunarak GSH konsantrasyonunun tayin edilmesi şeklinde yapıldı.

3.7.3. Malondialdehid (MDA) Düzeyinin Ölçümü

MDA analizi Uchiyama ve ark. (135) yöntemine göre yapıldı. MDA konsantrasyonu, süpernatandaki MDA'nın 95°C'de tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renkli ürünün n-butanol fazından ekstrakte edilen süpernatanın spektrofotometre ile 535 ve 520 nm de ölçülmesiyle belirlendi.

3.7.4. Total Oksidan Kapasitenin (TOS) Ölçümü

Total oksidan kapasitenin ölçümünde, ticari TOS ölçüm kiti (RelAssay Diagnostic, Türkiye) kullanıldı. Yöntemin prensipi, örnekteki oksidanların ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonlara okside etmesine ve oluşan ferrik iyonların asidik ortamda kromojen madde ile renk oluşturması esasına dayanır (136). TOS ölçümü için, kitin prosedüründe belirtildiği şekilde, ELİZA 25 °C'ye ayarlanarak, 500 µL reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 75 µL serum karıştırılıp 530 nm'de absorbansı ölçüldü. Karışıma 25 µL reaktif 2 (pro-kromojen solüsyon) eklenerek 10 dk. inkübasyondan sonra tekrar 530 nm'de absorbans ölçülmesiyle TOS düzeyleri belirlendi.

3.7.5. Total Antioksidan Kapasitenin (TAS) Ölçümü

Ticari TAS ölçüm kiti (RelAssay Diagnostic, Türkiye) kullanıldı. Yöntemin prensipi, örnekteki antioksidanların, koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini, renksiz ABTS formuna indirgemesine dayanır (137). TAS ölçümü için, kitin prosedüründe belirtildiği şekilde, ELİZA cihazı 25°C'ye ayarlanarak, 500 µL reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 30 µL serum karıştırılıp 660 nm'de absorbansı ölçüldü. Karışıma 75 µL reaktif 2 (renkli ABTS solüsyonu) eklenerek 10 dk. inkübasyondan sonra tekrar 660 nm'de absorbans ölçülmesiyle TAS düzeyleri belirlendi.

3.7.6. Karaciğer Fonksiyon Testlerinin (ALT, AST, ALP) Ölçümü

Çalışma gününe kadar – 80°C de saklanan UW ve UW+Mel 12. saate ait UW solüsyon örnekleri çalışma günü 1000 x g 10 dakika santrifuj edildi. ELİSA ile ölçüm yöntemi Cloud-Clone Corp (23603 W. Fernhurst Dr, Unit 2201, Katy, TX 77494 USA) Marka Rat spesifik ELİSA kitleri ile AST, ALT ve ALP parametreleri çalışıldı.

4254315BAC Seri no'lu Rat kiti ile AST parametresi ölçümü yapıldı. 7.8 ng/mL, 15.6 ng/mL, 31.2 ng/mL, 62.5 ng/mL, 125 ng/mL, 250 ng/mL ve 500 ng/mL'lik 7 adet standart konsantrasyonları ve 1 adet blank ve numunelerden her bir plate kuyucuğuna 100 µL eklenerek, plate'in üzeri kapatılıp 37°C'de 1 saat inkübasyon yapıldı. Bir saatlik inkübasyonun ardından plate içeriği yıkama yapılmaksızın uzaklaştırılarak 100 µL Detection Reagent A solüsyonu eklenerek, plate üzeri kapatılıp 37°C'de 1 saat inkübasyon yapıldı. Bir saatlik inkübasyonun ardından 350 µL yıkama hacmi olacak şekilde 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından 100 µL Detection Reagent B solüsyonu her bir kuyucuğa eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübasyon yapıldı. 30 dakikalık inkübasyonun ardından 350 µL yıkama hacmi olacak şekilde 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra 90 µL substrat solüsyonu her bir kuyucuğa eklendi. 37°C'de 10-20 dakika olacak şekilde karanlık ortamda bekletilerek renk değişimi sağlandı. Ardından 50 µL stop solüsyonu eklenerek 450 nm'de Synergy H1 Microplate Reader'da okuma yapıldı.

7FE71FE716 Seri no'lu Rat kiti ile ALT parametresi ölçümü yapıldı. 0.78 ng/mL, 1.56 ng/mL, 3.12 ng/mL, 6.25 ng/mL, 12.5 ng/mL, 25.0 ng/mL ve 50 ng/mL'lik 7 adet standart konsantrasyonları ve 1 adet blank ve numunelerden her bir plate kuyucuğuna 100 µL eklenerek, plate'in üzeri kapatılıp 37°C'de 1 saat inkübasyon yapıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından plate içeriği yıkama yapılmaksızın uzaklaştırılarak 100 µL Detection Reagent A solüsyonu eklenerek, plate üzeri kapatılıp 37°C'de 1 saat inkübasyon yapıldı. Bir saatlik inkübasyonun ardından 350 µL yıkama hacmi olacak şekilde 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından 100 µL Detection Reagent B solüsyonu her bir kuyucuğa eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübasyon yapıldı. 30 dakikalık inkübasyonun ardından 350 µL yıkama hacmi olacak şekilde 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra 90 µL substrat solüsyonu her bir kuyucuğa eklendi. 37°C'de 10-20 dakika olacak şekilde karanlık

ortamda bekletilerek renk değişimi sağlandı. Ardından 50 µL stop solüsyonu eklenerek 450 nm’de Synergy H1 Microplate Reader’da okuma yapıldı.

7CE73AB2AF Seri no’lu Rat kiti ile ALP parametresi ölçümü yapıldı. 1.25 ng/mL, 2.5 ng/mL, 5.0 ng/mL, 10.0 ng/mL, 20.0 ng/mL, 40.0 ng/mL ve 80.0 ng/mL’lik 7 adet standart konsantrasyonları ve 1 adet blank ve numunelerden her bir plate kuyucuğuna 100 µL eklenerek, plate’in üzeri kapatılıp 37⁰C’de 1 saat inkübasyon yapıldı. Bir saatlik inkübasyonun ardından plate içeriği yıkama yapılmaksızın uzaklaştırılarak 100 µL Detection Reagent A solüsyonu eklenerek, plate üzeri kapatılıp 37⁰C’de 1 saat inkübasyon yapıldı. Bir saatlik inkübasyonun ardından 350 µL yıkama hacmi olacak şekilde 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından 100 µL Detection Reagent B solüsyonu her bir kuyucuğa eklenerek 37⁰C’de 30 dakika inkübasyon yapıldı. 30 dakikalık inkübasyonun ardından 350 µL yıkama hacmi olacak şekilde 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra 90 µL substrat solüsyonu her bir kuyucuğa eklendi. 37⁰C’de 10-20 dakika olacak şekilde karanlık ortamda bekletilerek renk değişimi sağlandı. Ardından 50 µL stop solüsyonu eklenerek 450 nm’de Synergy H1 Microplate Reader’da okuma yapıldı.

3.8. İstatistiksel Analiz

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi, grup varyanslarının homojenliği Levene testi ile incelendi. Normal dağılım gösteren veriler için tanımlayıcı olarak ortalama ve standart sapma kullanıldı. Bağımsız grup karşılaştırmalarında varyanslar homojen olduğunda tek yönlü varyans analizi ve Tukey ikili karşılaştırma yöntemi, varyanslar homojen olmadığında Welch testi ve Tamhane’s T2 ikili karşılaştırma yöntemi kullanıldı. Zaman içi değişimin ve grup*zaman etkileşiminin test edilmesi için tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ve sonrasında Bonferroni düzeltmeli iki karşılaştırmalar uygulandı. Skor verilerinin özetlenmesinde medyan, minimum ve maksimum değerler kullanıldı. Bağımsız grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U testi, Kruskal-Wallis testi ve Conover ikili karşılaştırma yöntemi uygulandı. Zaman içi değişim ise Wilcoxon eşleştirilmiş iki örneklem testi ile test edildi. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi 0.05 olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

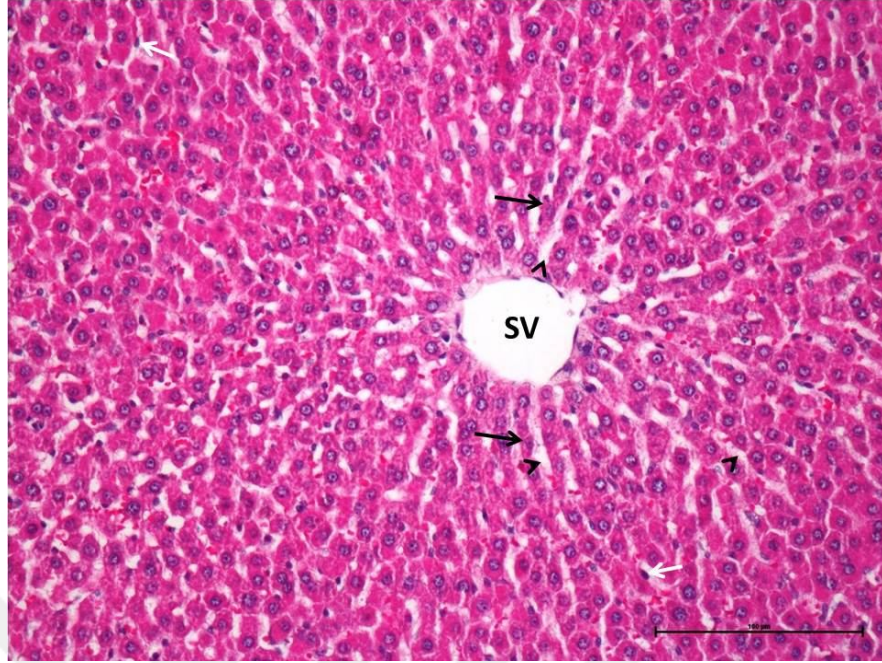
4.1. Histolojik bulgular

4.1.1. SF Grubu 0. Saat

Hematoksilen&eozin ile boyanmış kesitlerde karaciğer normal histolojik yapıda değerlendirildi. Karaciğeri dıştan çevreleyen, ince, fibröz bağ dokusu yapısında Glisson kapsülü normal histolojik yapıda görüldü. Karaciğer lobülleri merkezinde santral venler açık ve olağan yapıda izlendi. Santral venlerden lobüllerin periferine ışınal uzanan hepatosit kordonları ve sinüzoidler olağan düzenlenme ve normal histolojik yapıda değerlendirildi. Sinüzoidler açık olmakla birlikte yer yer sinüzoid lümeninde eritrositler mevcuttu. Hepatositlerde sitoplazmik eozinofilik-bazofilik boyanma yoğunluğu normal olarak değerlendirildi. Hepatosit nükleusları genellikle düzgün dairesel şekilli, ökromatik boyanmış, intraselüler merkezi yerleşimli olarak izlendi. Yer yer çift nükleuslu hepatositlere rastlandı. Sinüzoidlerin duvarında ve lümenine çıkıntı yapmış şekilde olağan yoğunlukta Kupffer hücreleri görüldü (Şekil 4.1). Kesitlerde karaciğer lobülleri periferinde, fibröz bağ dokusu portal triad alanları içinde arter, ven ve safra duktusu yapıları normal histolojik yapıda izlendi (Şekil 4.2).

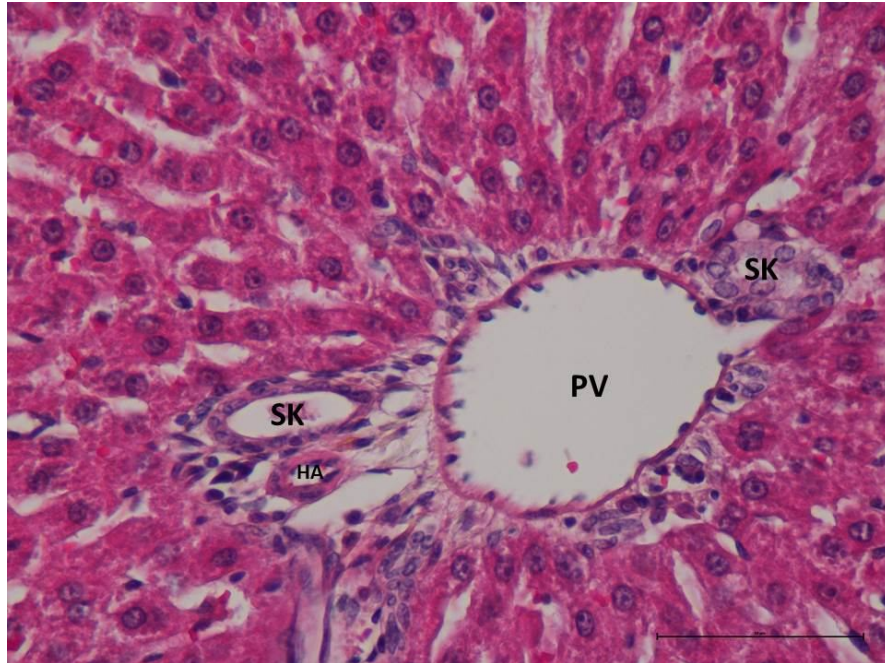
İmmünohistokimyasal boyama yöntemiyle Caspase 3 uygulanan karaciğer kesitlerinde zayıf Caspase 3 immünreaktivite pozitifliği saptandı. Bu grubun immünohistokimyasal Caspase 3 immünreaktivite skoru ortalaması (1 ± 0.0) olarak belirlendi (Şekil 4.3).

Periodic acid–Schiff (PAS) ile boyanan kesitlerde karaciğer parankiminde orta derecede ve kuvvetli PAS+ boyanma saptandı. Bu grubun PAS+ boyanma skoru ortalaması (2.5 ± 0.5) olarak belirlendi (Şekil 4.4).



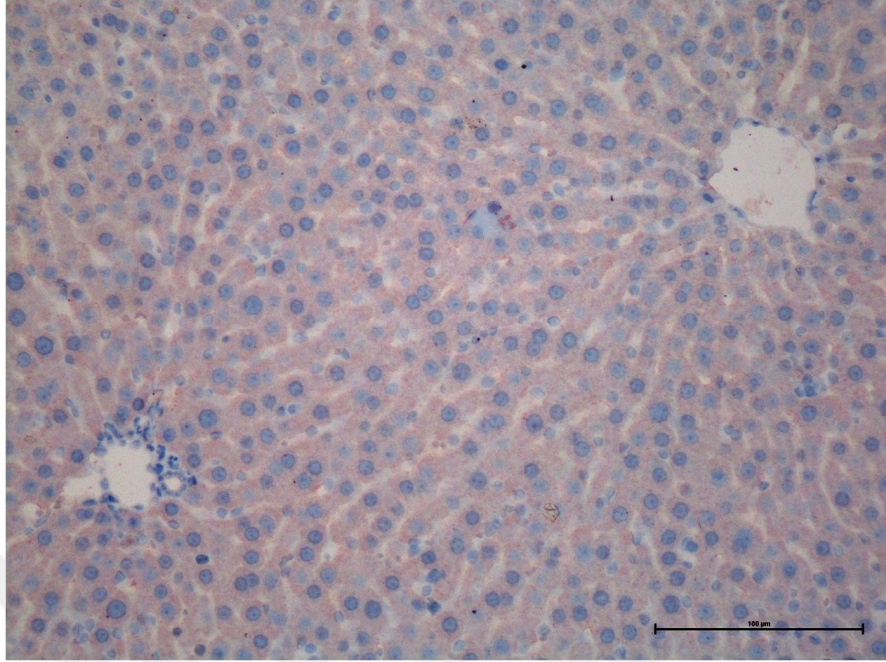
Şekil 4.1. SF Grubu karaciğer parankimi.

Normal görümlü karaciğer parankimi. SV: Santral ven, siyah ok: normal görümlü hepatosit kordonları, ok başı: normal sinüzoid yapıları, beyaz ok: Kupffer hücreleri. (HE, 20x, Ölçü C=100µm)

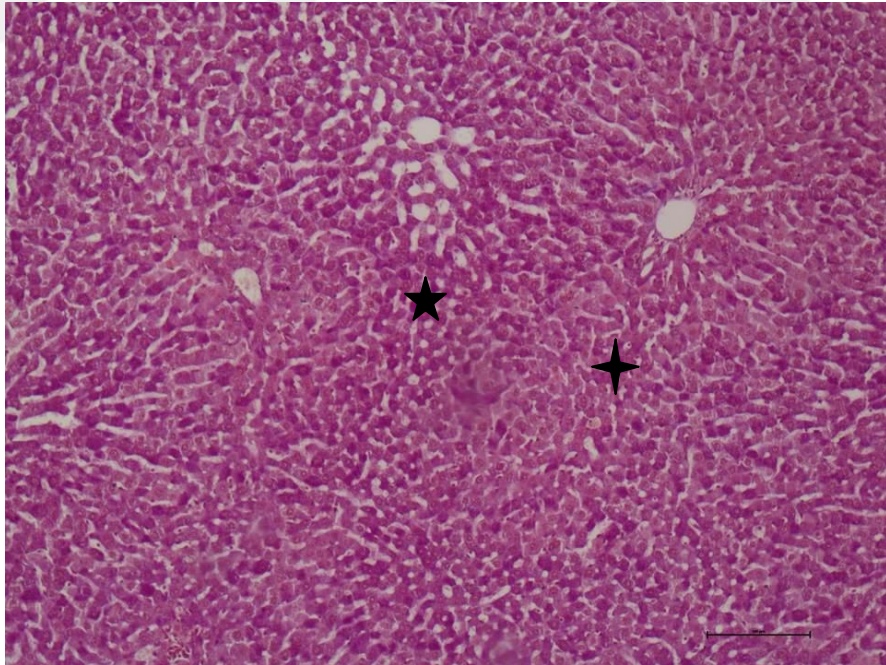


Şekil 4.2. SF Grubu portal alan.

Normal histolojik görünümde portal alan. PV: portal ven, HA: hepatik arter, SK: safra kanalı (HE, 40x, Ölçü C=50µm)



Şekil 4.3. SF Grubu Caspase 3 boyama.
Karaciğer parankiminde zayıf Caspase 3+ immunreaktivitesi. (IHC, 20x, Ölçü C=100µm)



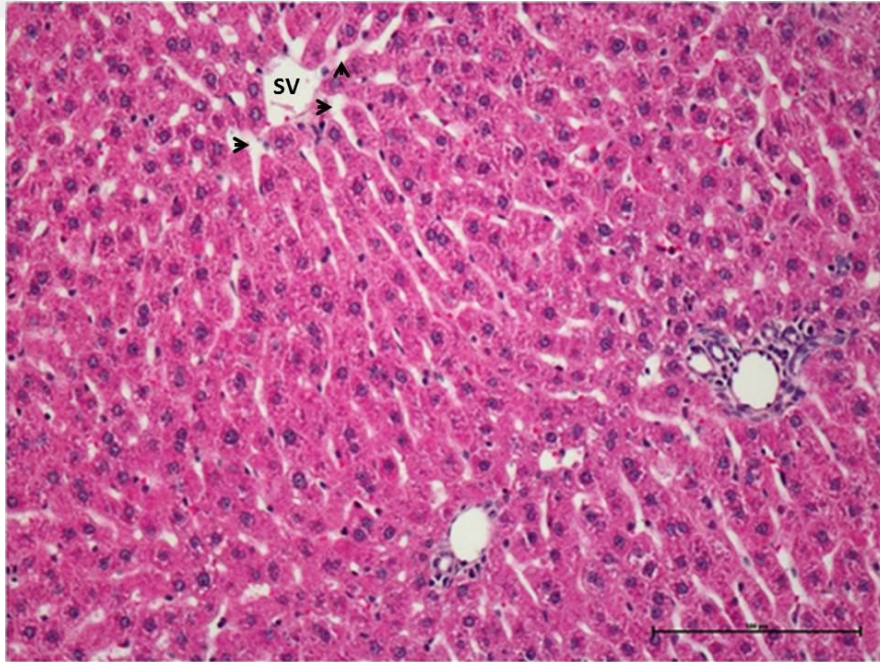
Şekil 4.4. SF Grubu PAS boyama.
Karaciğer parankiminde orta (dört köşeli yıldız) ve kuvvetli (beş köşeli yıldız) PAS+ boyanma. (PAS, 10x, Ölçü C=100µm)

4.1.2. UW Grubu 0. Saat

Hematoksilen&ezoin ile boyanmış karaciğer kesitleri SF grubunun mikroskopik bulguları ile benzer şekilde genel olarak normal histolojik yapıda değerlendirildi (Şekil 4.5, 4.6). Ancak incelenen kesitlerde nadir olarak perisantral sinüzoidlerde minimal düzeyde dilatasyon izlendi (Şekil 4.5).

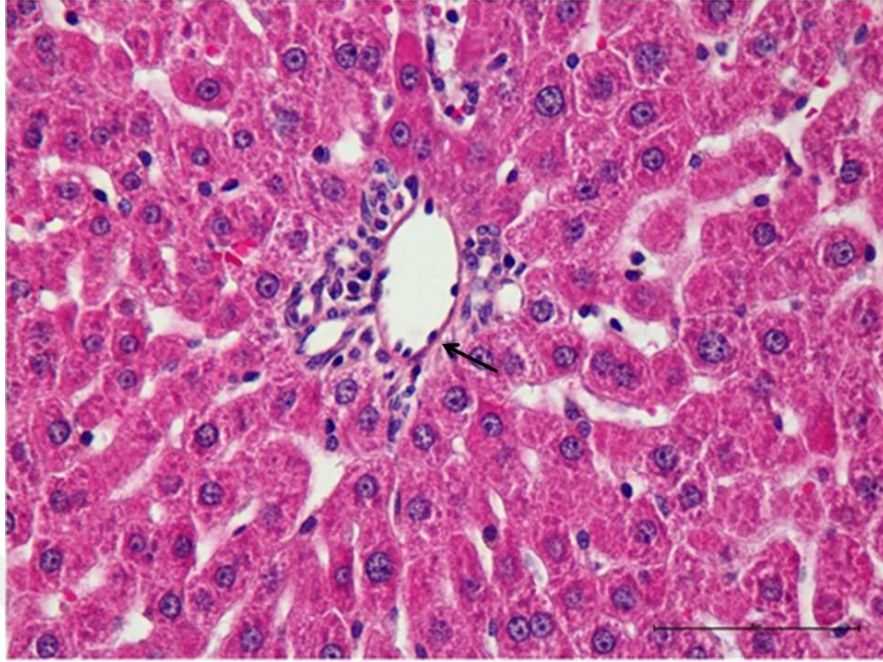
İmmünohistokimyasal Caspase 3 uygulanan karaciğerin bazı kesitlerinde portal alan ve santral ven çevresindeki ilk sıra hepatositlerde orta dereceli yoğunlukta Caspase 3 immünreaktivite pozitifliği gözlemlendi. Genel parankimal alanlarda zayıf Caspase 3 immünreaktivite pozitifliği saptandı (Şekil 4.7). Bu grubun Caspase 3 immünreaktivite skoru (1.2 ± 0.4) olarak belirlendi.

Periodic acid–Schiff (PAS) ile boyanan kesitlerde karaciğer parankiminde orta düzeyde ve kuvvetli PAS+ boyanma izlendi. Perisantral ilk sıra hepatositlerde zayıf PAS+ boyanma izlendi (Şekil 4.8). Bu grubun PAS+ boyanma skor ortalaması (2.6 ± 0.5) olarak bulundu.

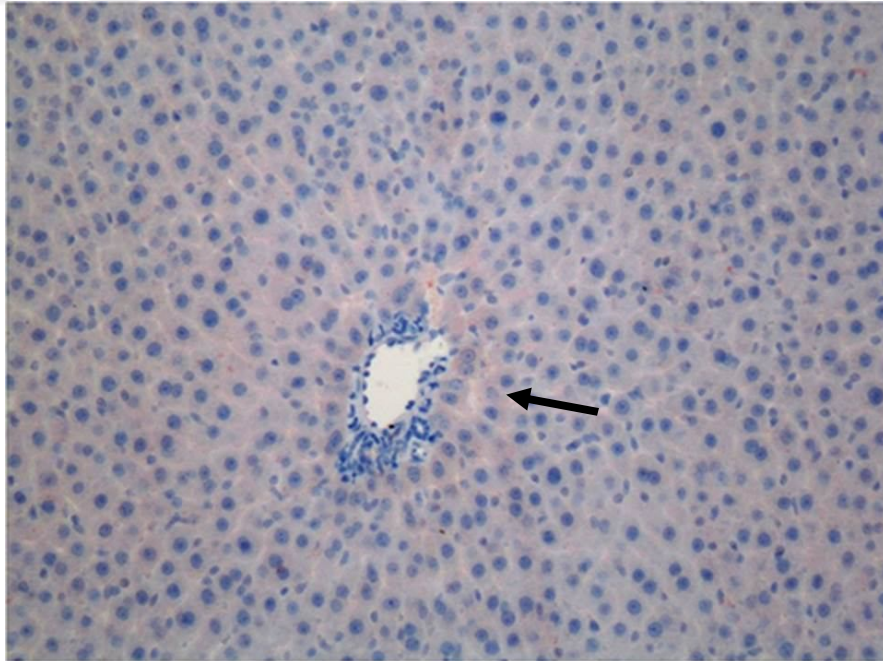


Şekil 4.5. UW Grubu 0. Saat karaciğer parankimi.

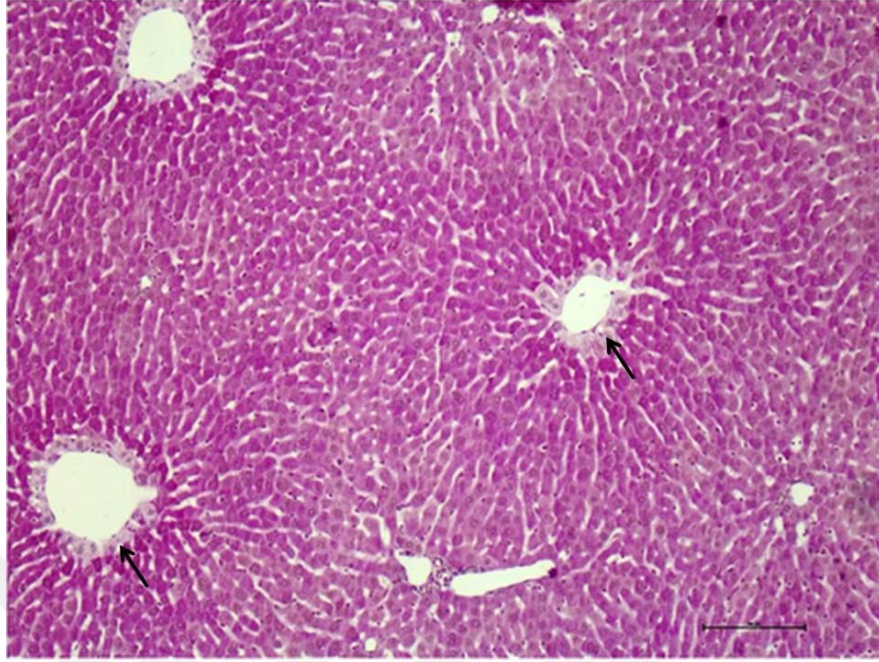
SV: santral ven. Ok başı: perisantral sinüzoidlerde minimal dilatasyon. (HE, 20x, Ölçü C=100µm)



Şekil 4.6. UW Grubu 0. saat portal alan
Ok: normal görünümlü portal alan. (HE, 40x, Ölçü C=50µm)



Şekil 4.7. UW Grubu 0. saat Caspase 3 boyama.
Ok: Portal alan çevresinde orta dereceli yoğunlukta Caspase 3+ boyanma. (IHC, 20x, Ölçü C=100µm)



Şekil 4.8. UW Grubu 0. saat PAS boyama.

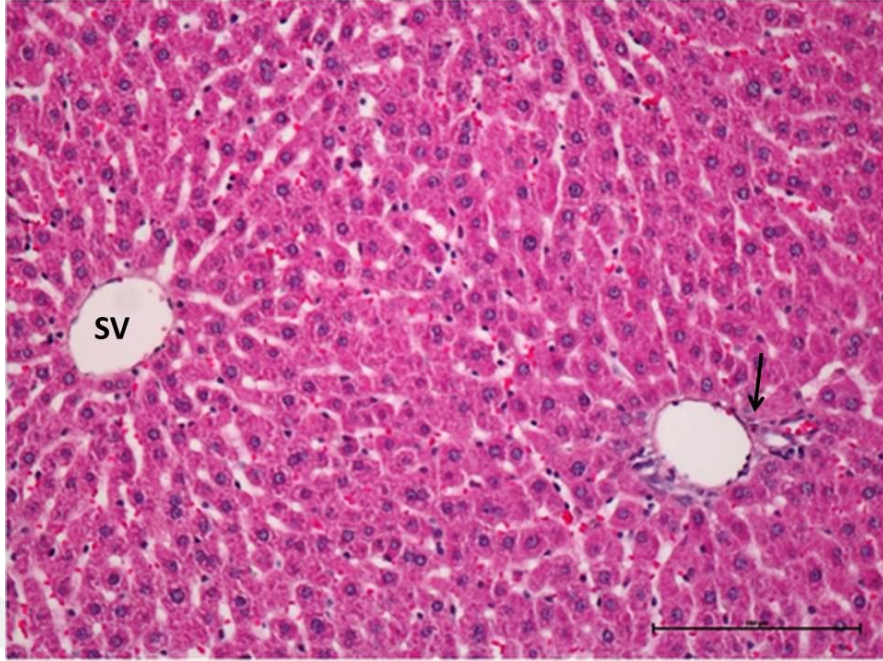
Ok: perisantral hepatositlerde zayıf PAS+ boyanma. (PAS, 10x, Ölçü C=100µm)

4.1.3. UW+Melatonin Grubu 0. Saat

Bu gruba ait hematoksilin&eozen ile boyanmış karaciğer kesitleri UW grubu 0. saat kesitlerinin mikroskopik bulguları ile benzer şekilde ve genel olarak normal histolojik yapıda değerlendirildi (Şekil 4.9, 4.10).

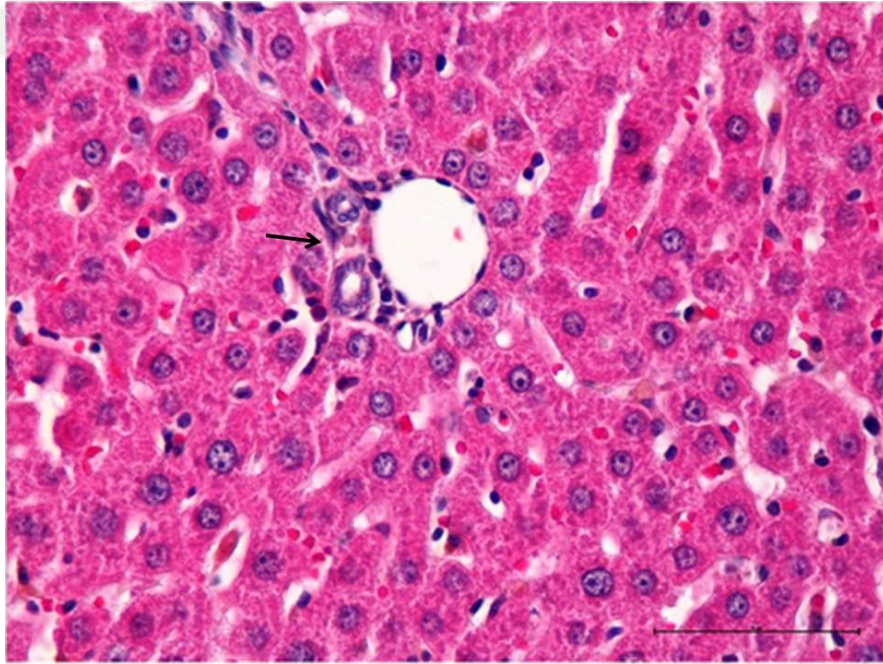
İmmünohistokimyasal Caspase 3 boyaması uygulanan karaciğer kesitlerinde zayıf Caspase 3+ boyanma saptandı. (Şekil 4.11). UW+Mel grubu 0. saat kesitlerinde immünohistokimyasal Caspase 3 immünreaktivite skoru (1 ± 0.0) olarak belirlendi.

Periodic acid–Schiff (PAS) ile boyanan kesitlerde karaciğer parankiminde orta düzeyde ve kuvvetli PAS+ boyanma izlendi (Şekil 4.12). Gruba ait PAS+ boyanma skoru ortalaması (2.5 ± 0.5) olarak hesaplandı.



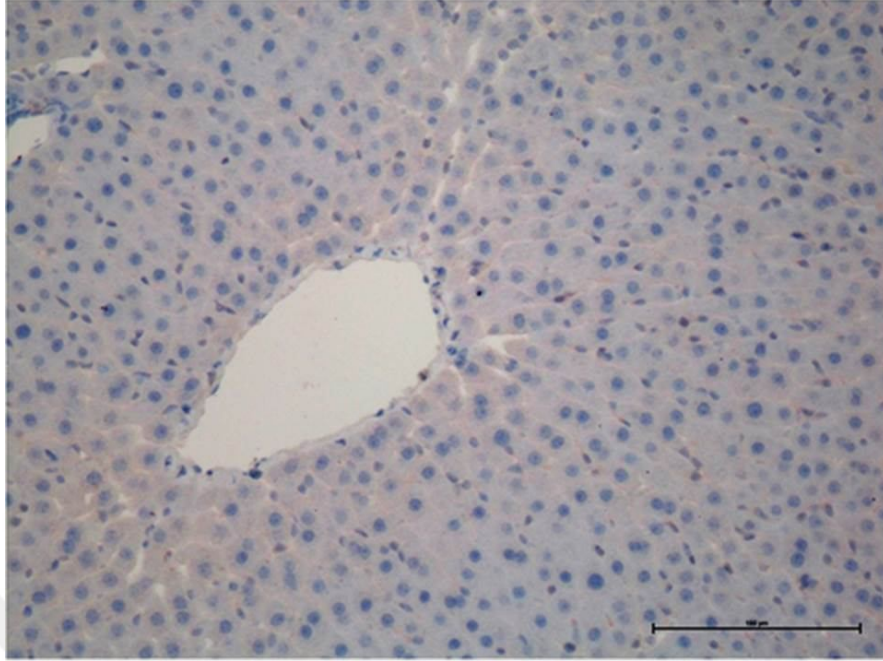
Şekil 4.9. UW+Mel Grubu 0. saat karaciğer parankimi.

Normal histolojik görünümde karaciğer parankimi. SV: santral ven, ok: portal alan (HE, 20x, Ölçü C=100µm)



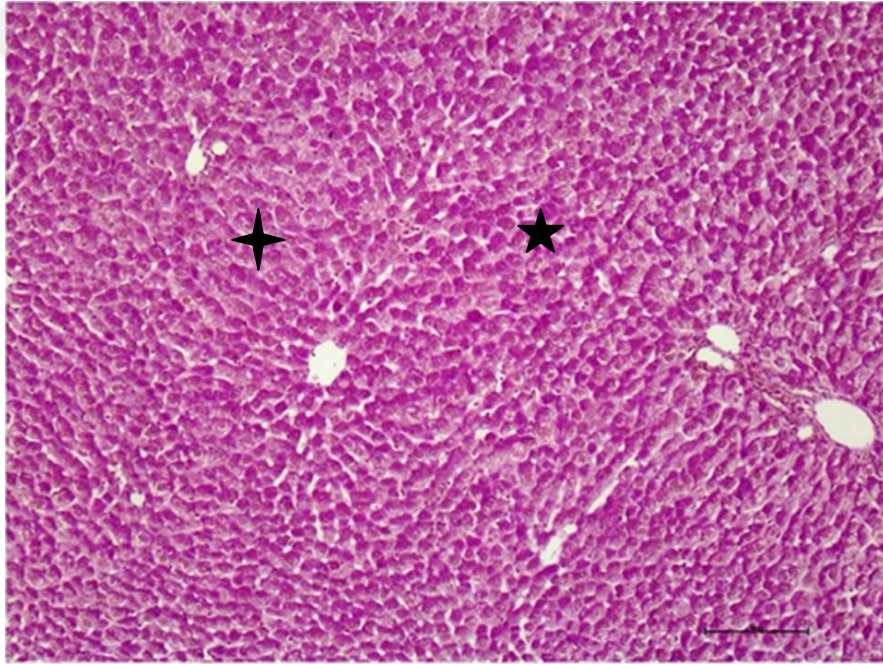
Şekil 4.10. UW+Mel Grubu 0. Saat portal alan.

Ok: normal histolojik görünümde portal alan. (HE, 40x, Ölçü C=50µm)



Şekil 4.11. UW+Mel Grubu 0. saat Caspase 3 boyama.

Karaciğer parankiminde zayıf Caspase 3+ immunreaktivitesi. (IHC, 20x, Ölçü C=100μm)



Şekil 4.12. UW+Mel Grubu 0. saat PAS boyama.

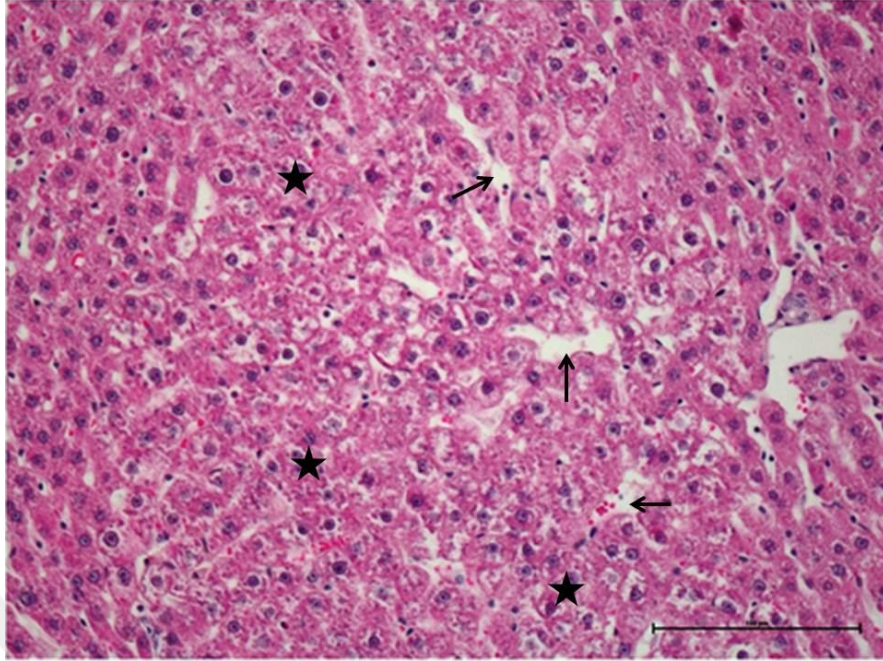
Karaciğer parankiminde orta (dört köşeli yıldız) ve kuvvetli (beş köşeli yıldız) PAS+ boyanma. (PAS, 10x, Ölçü C=100μm)

4.1.4. UW Grubu 12. Saat

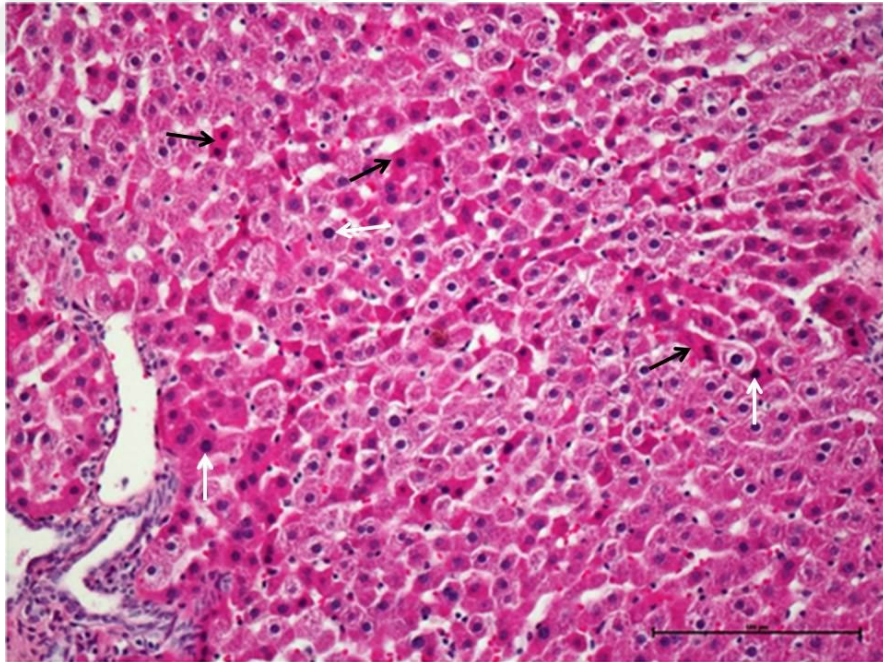
Bu gruba ait hematoksil-eozerin ile boyanmış bazı kesitlerde hepatosit kordonlarında dejenerasyon ve sinüzoidal dilatasyon görüldü (Şekil 4.13). Bazı parankimal alanlardaki hepatositlerde sitoplazmik eozinofili, nükleus kromatininde yoğunlaşma ile heterokromatik nükleus yapısı dikkati çekti (Şekil 4.14). Karaciğer parankimindeki hidropik değişiklik ve dejenerasyon bulgularında diğer tüm gruplara göre artış tespit edildi. Özellikle perisantral ve periportal alanlardaki ilk sıra hepatositlerde hidropik dejenerasyon bulgularının daha belirgin olduğu dikkati çekti. Bu hepatositlerin sitoplazmik boyanma yoğunluğunun belirgin şekilde zayıfladığı ve hepatositlerde hidropik değişikliklere bağlı olarak sitoplazmik dilatasyon olduğu görüldü (Şekil 4.15). Bu grupta ayrıca hepatositlerde tek hücre ve yer yer küçük hepatosit gruplarında nekroz saptandı (Şekil 4.16). Bu gruba ait total histolojik hasar skoru 1 ± 0.8 olarak belirlendi.

Bu gruba ait immünohistokimyasal Caspase 3 boyamada, orta derecede Caspase 3+ boyanma saptandı. Perisantral ve periportal hepatositlerde ise kuvvetli Caspase 3+ immünreaktivitesi tespit edildi (Şekil 4.17, 4.18). Bu grubun immünohistokimyasal Caspase 3 immünreaktivite skoru 1.7 ± 0.5 olarak belirlendi.

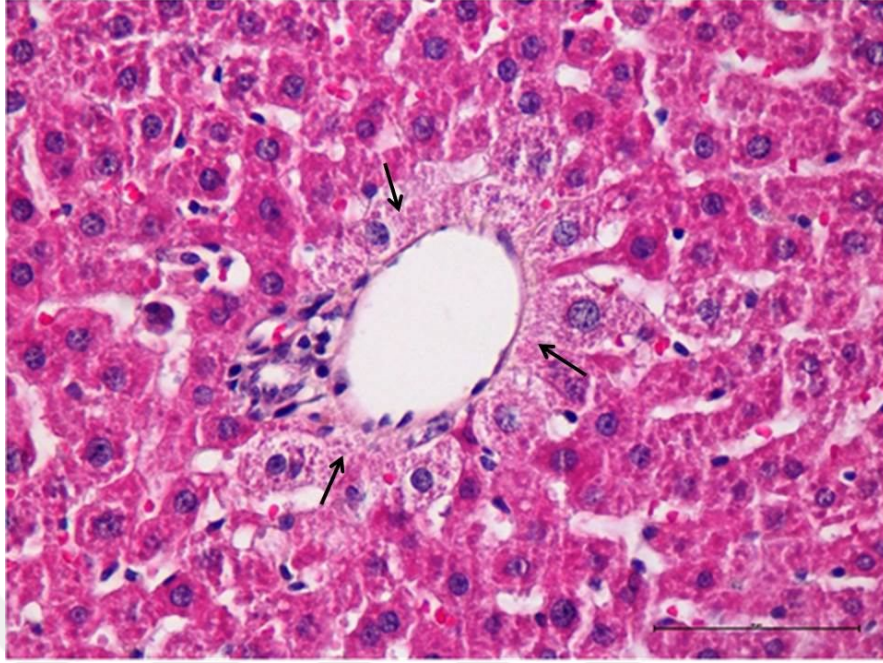
Periodic acid-Schiff (PAS) ile boyanan kesitlerde diğer gruplardaki ile benzer şekilde karaciğer parankiminde orta düzeyde ve kuvvetli PAS+ boyanma izlendi. Bazı perisantral ven ve periportal alandaki ilk sıra hepatositlerde ise zayıf düzeyde PAS+ boyanma gözlemlendi (Şekil 4.19, 4.20).



Şekil 4.13.UW Grubu 12. saat karaciğer parankimi.
Ok: sinüzoidal dilatasyon, yıldız: hepatosit kordonlarında hidropik dejenerasyon. (HE, 20x, Ölçü C=100µm)

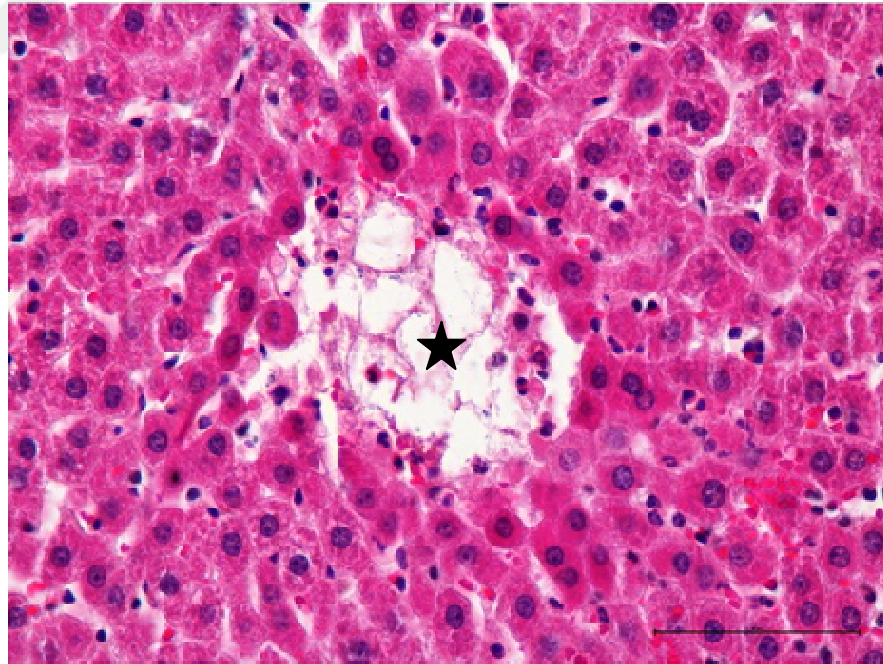


Şekil 4.14. UW Grubu 12. saat karaciğer parankimi.
Siyah ok: artmış sitoplazmik eozinofili, beyaz ok: heterokromatik nükleuslu hepatositler. (HE, 20x, Ölçü C=100µm)



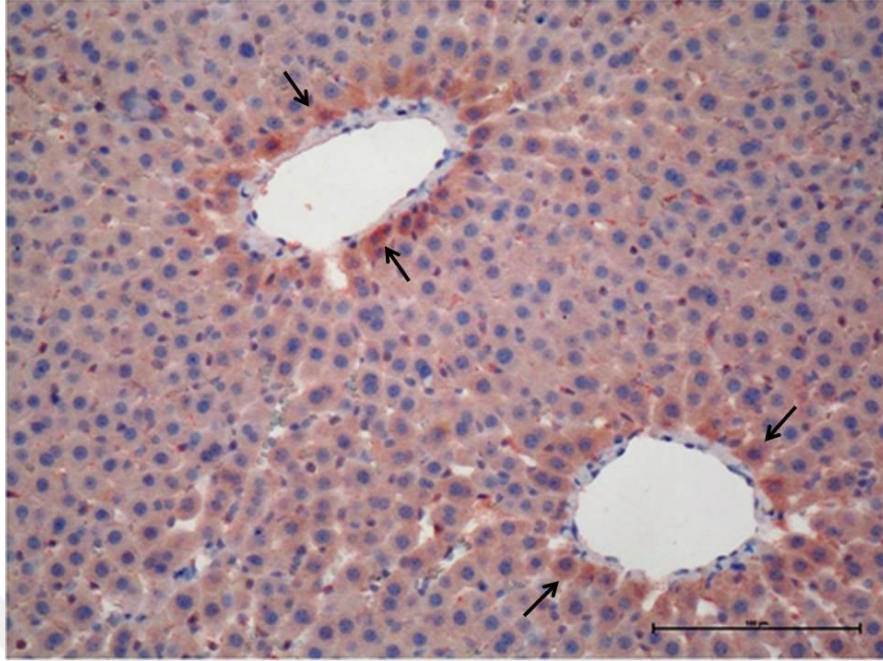
Şekil 4.15. UW Grubu 12. saat portal alan.

Ok: Periportal alanlarda ilk sıra hepatositlerde hidropik dejenerasyon. (HE, 40x, Ölçü C=50µm)

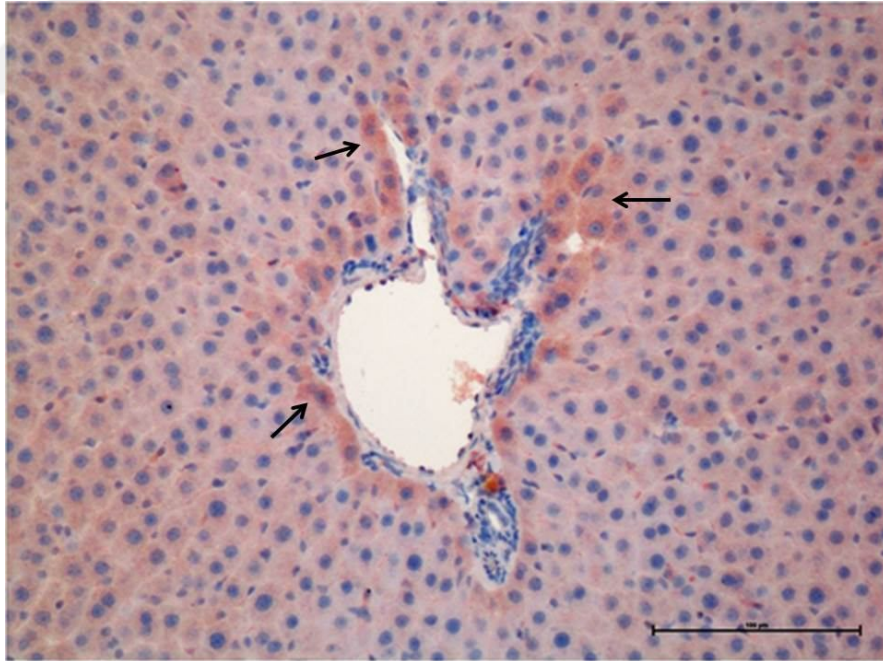


Şekil 4.16. UW Grubu 12. saat nekroz alanı.

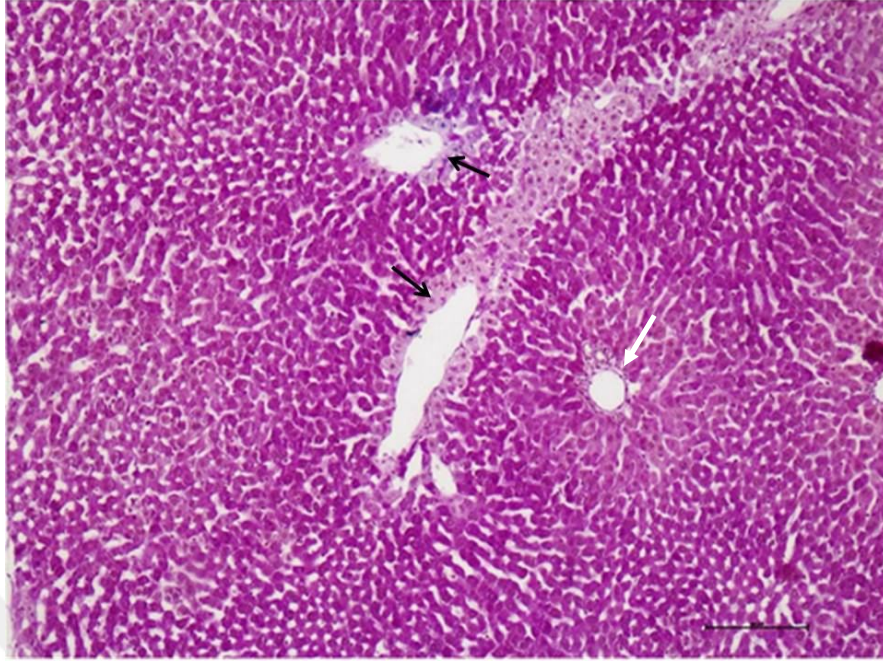
Yıldız: Hepatositlerde nekroz. (HE, 40x, Ölçü C=50µm)



Şekil 4.17. UW Grubu 12. saat Caspase 3 reaktivitesi.
Ok: Perisantral hepatositlerde kuvvetli Caspase 3+ boyanma. (IHC, 20x, Ölçü C=100µm)

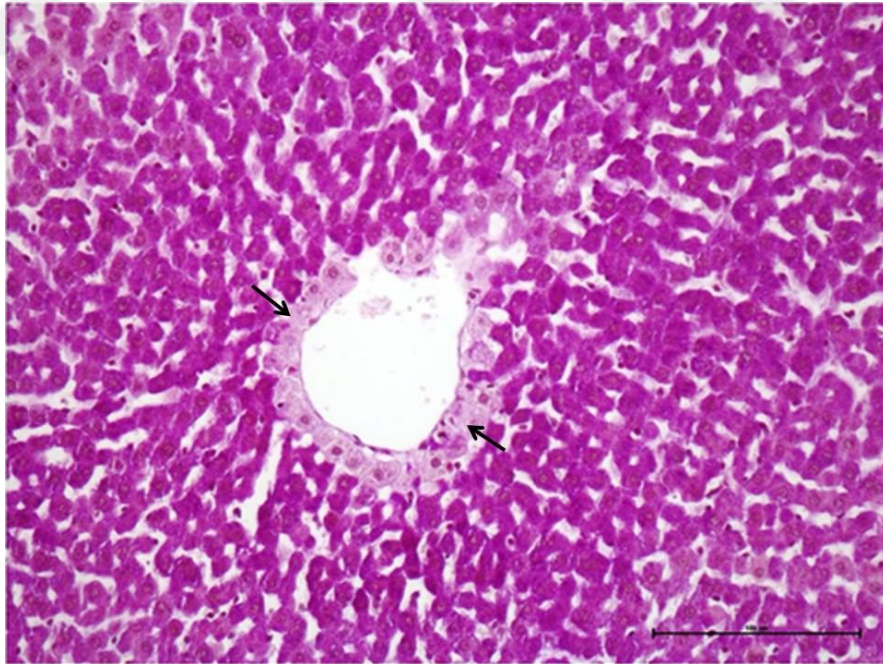


Şekil 4.18. UW Grubu 12. saat Caspase 3 reaktivitesi.
Ok: Periportal hepatositlerde kuvvetli Caspase 3+ boyanma. (IHC, 20x, Ölçü C=100µm)



Şekil 4.19. UW Grubu 12. saat PAS boyama.

Siyah ok: Perisantral ilk sıra hepatositlerde zayıf PAS+ boyanma, Beyaz ok: Periportal ilk sıra hepatositlerde zayıf PAS+ boyanma. (PAS, 10x, Ölçü C=100µm)



Şekil 4.20. UW Grubu 12. saat PAS boyama.

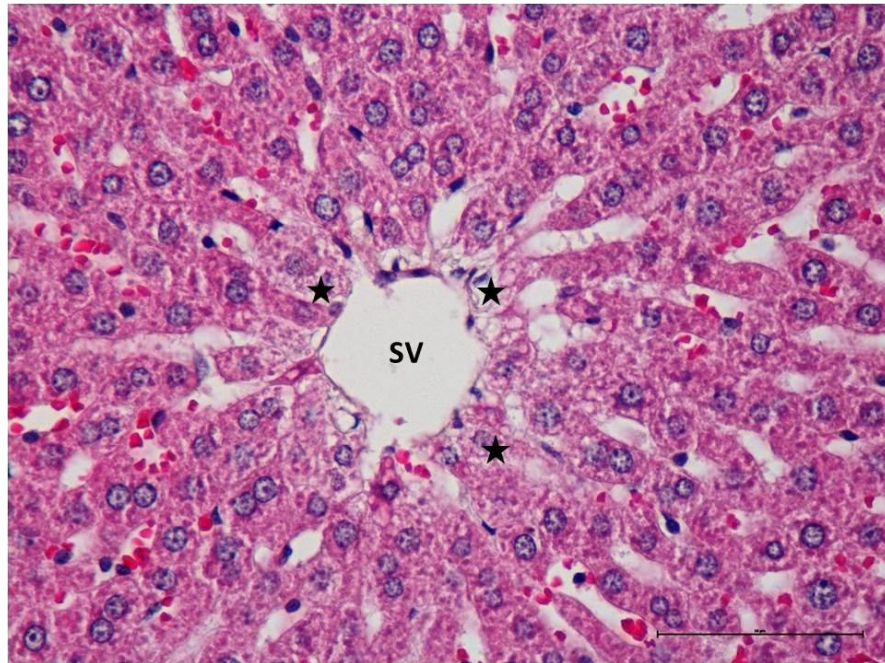
Ok: Perisantral ilk sıra hepatositlerde zayıf PAS+ boyanma. (PAS, 20x, Ölçü C=100µm)

4.1.5. UW+Mel Grubu 12. Saat

Bu gruba ait hematoksilin&eoizin ile boyanmış karaciğer kesitlerinde yer yer perisantral ilk sıra hepatositlerde minimal düzeyde hidropik değişiklikler, nadiren minimal düzeyde hepatosit nekrozu görülmekle birlikte, genel olarak hepatosit kordonları ve sinüzoid yapıları normal histolojik görünümde izlendi (Şekil 4.21). Portal triadlardaki ven, arter ve safra kanalı yapıları genel olarak normal histolojik görünümde izlendi (Şekil 4.22). UW+Mel Grubu, 12. saat kesitlerinin total histolojik hasar skoru 0.5 ± 0.5 olarak belirlendi.

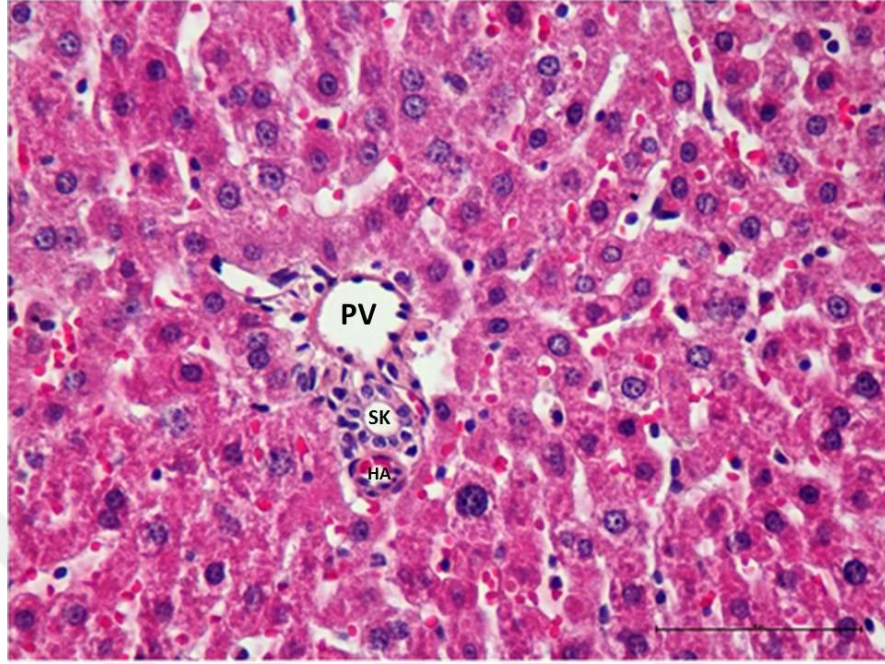
Bu gruba ait immünohistokimyasal Caspase 3 uygulanan karaciğer kesitlerinde zayıf Caspase 3 immünreaktivite pozitifliği saptandı. Perisantral hepatositlerde Caspase 3 immünreaktivite pozitifliği boyanma yoğunluğu açısından diğer parankimal alanlardaki hepatositler ile benzer görünümde izlendi (Şekil 4.23). Bu grubun immünohistokimyasal Caspase 3 immünreaktivite skoru 1.2 ± 0.4 olarak belirlendi.

Periodic acid–Schiff (PAS) ile boyanan kesitlerde diğer gruplardaki ile benzer şekilde karaciğer parankiminde orta ve kuvvetli PAS+ boyanma izlendi. Ancak bazı periportal alandaki ilk sıra hepatositlerde zayıf PAS+ boyanma görüldü (Şekil 4.24).



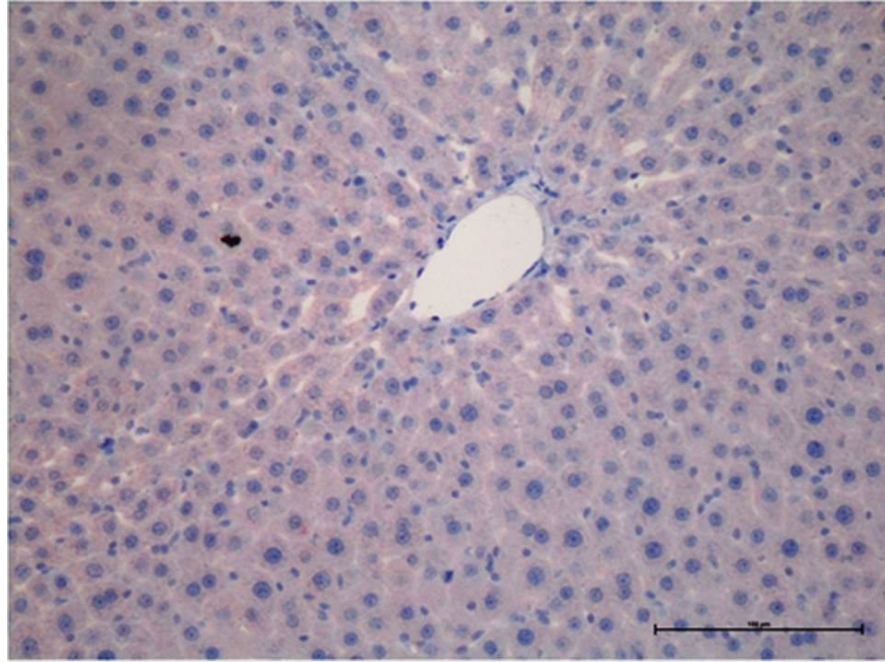
Şekil 4.21. UW+Mel Grubu 12. saat karaciğer parankimi.

SV: santral ven, yıldız: hidropik dejenerasyon alanları. (HE, 20x, Ölçü C=100μm)



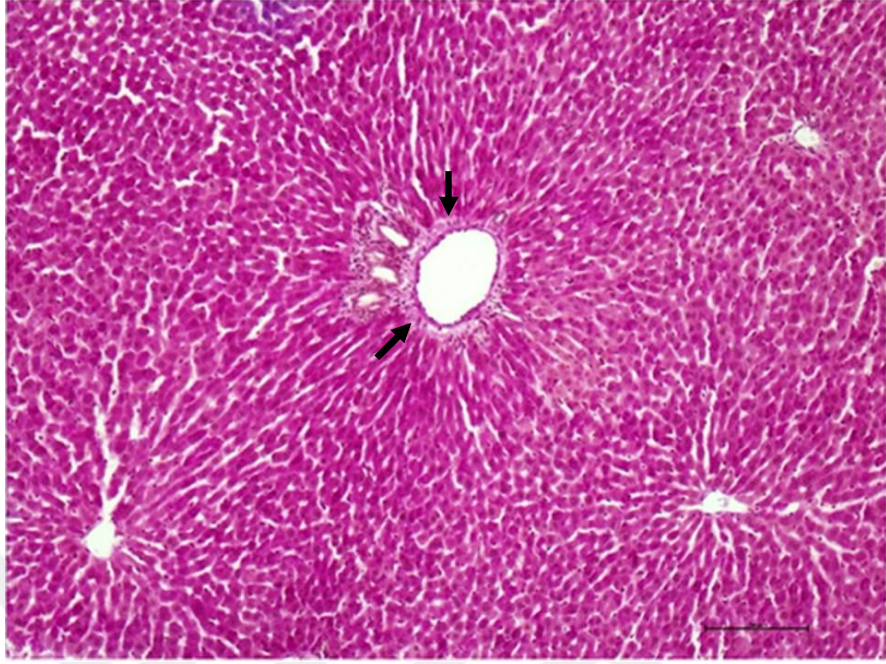
Şekil 4.22. UW+Mel Grubu 12. saat portal alan.

Normal histolojik görünümde portal alan. PV: portal ven, HA: hepatik arter, SK: safra kanalı (HE, 40x, Ölçü C=50µm)



Şekil 4.23. UW+Mel Grubu 12. saat Caspase 3 reaktivitesi.

Perisantral alanda zayıf Caspase 3+ boyanma. (IHC, 20x, Ölçü C=100µm)



Şekil 4.24. UW+Mel Grubu 12. saat PAS boyama.
Ok: Periportal hepatositlerde zayıf PAS+ boyanma. (PAS, 10x, Ölçü C=100µm)

Tablo 4.1. Histolojik Parametre Bulgularının İstatistiksel Analizi

		0. saat	12. saat	p-değeri (W)
		Medyan(Min-Maks.)	Medyan(Min-Maks.)	
Sinuzidal dilatasyon	SF	0 (0-0)		
	UW	0 (0-1)	0 (0-1)	0,655
	UW+Mel	0 (0-1)	0 (0-1)	0,157
	p-değeri (KW)	0,407	p-değeri (M) 1.000	
Hidropik dejenerasyon	SF	0 (0-0)		
	UW	0 (0-1)	0 (0-2)	0,257
	UW+Mel	0 (0-1)	0 (0-1)	1
	p-değeri (KW)	0,407	p-değeri (M) 0.121	
Hepatosit nekrozu	SF	0 (0-0)		
	UW	0 (0-0)	0 (0-1)	0,157
	UW+Mel	0 (0-0)	0 (0-1)	0,317
	p-değeri (KW)	1	p-değeri (M) 0.542	
Total skor	SF	0 (0-0)		
	UW	0 (0-1)	1 (0-2)	0,058
	UW+Mel	0 (0-1)	1 (0-1)	0,18
	p-değeri (KW)	0,129	p-değeri (M) 0.150	

KW: Kruskal-Wallis testi

W: Wilcoxon eşleştirilmiş iki örneklem testi

M: Mann-Whitney U testi

Tablo 4.2. Caspase 3 ve PAS Boyama İstatistiksel Analizi

		0. saat	12. saat	p-değeri (W)
		Medyan(Min-Maks.)	Medyan(Min-Maks.)	
Caspase 3	SF	1 (1-1)		
	UW	1 (1-2)	2 (1-2)a	0,025
	UW+Mel	1 (1-1)	1 (1-2)b	0,157
	p-değeri (KW)	0,154	p-değeri (M) 0.005	
PAS	SF	2.5 (2-3)		
	UW	3 (2-3)	3 (2-3)	1
	UW+Mel	2.5 (2-3)	3 (2-3)	0,739
	p-değeri (KW)	0,883	p-değeri (M) 1.000	

KW: Kruskal-Wallis testi

W: Wilcoxon eşleştirilmiş iki örneklem testi

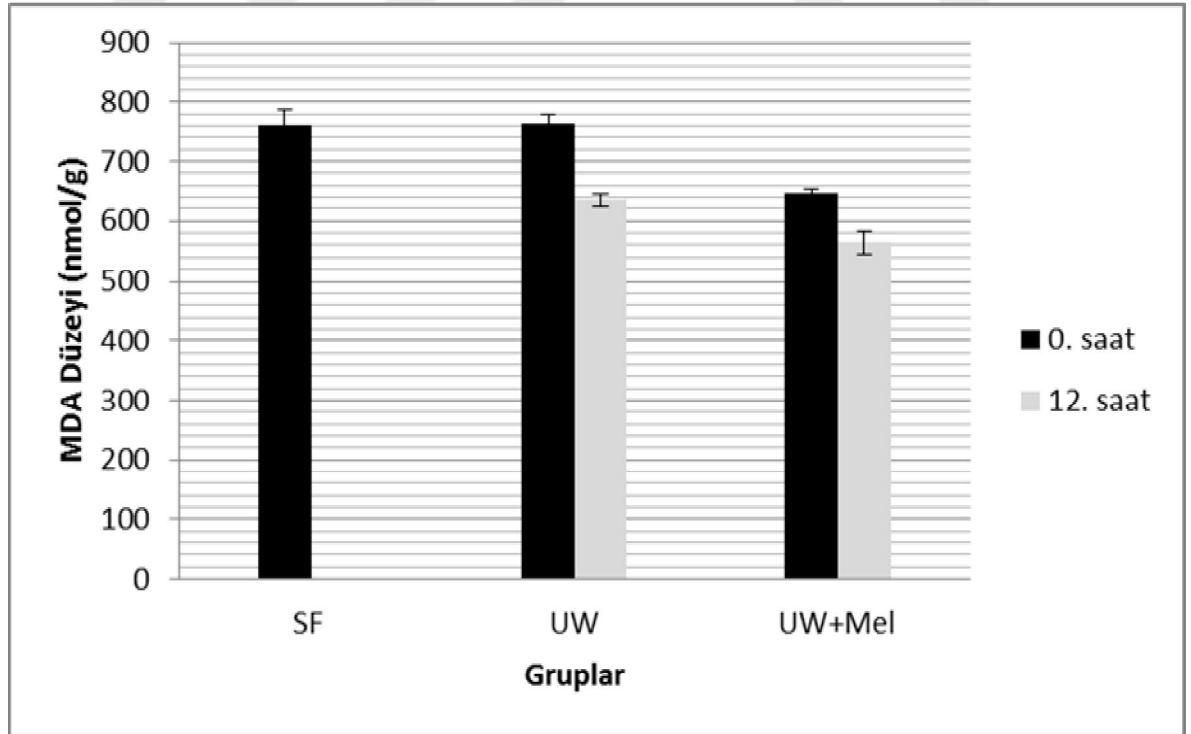
M: Mann-Whitney U testi

* Üst simgeler her bir zaman diliminde gruplar arası farklılığı göstermektedir. Farklı üst simgeye sahip gruplar istatistiksel olarak farklıdır.

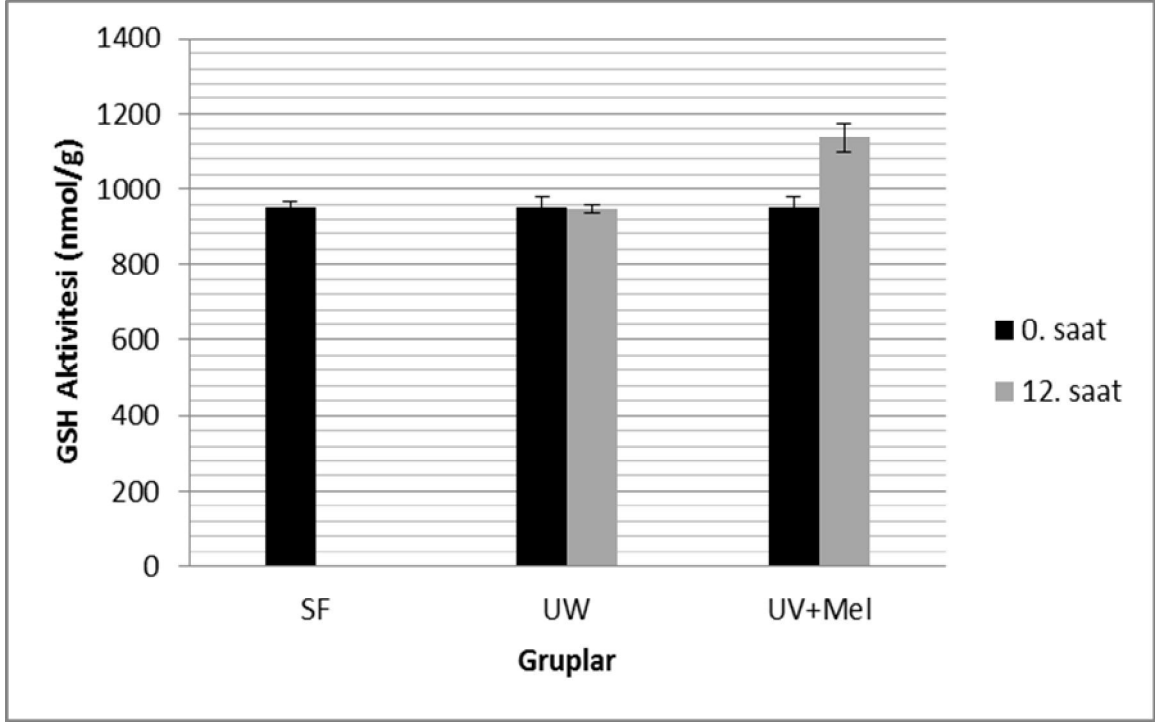
Tablo 4.3. Oksidatif Stres Parametreleri İstatistiksel Analizi

Parametreler	Grup	0. saat		12. saat		p
		Ortalama	SS	Ortalama	SS	
MDA	SF	760,84 ^a	25,74			
	UW	764,43 ^a	14,59	635,51 ^a	11,51	<0,001
	UW+Mel	647,93 ^b	6,46	564,46 ^b	19,88	<0,001
GSH	SF	950,77 ^a	15,48			
	UW	952,24 ^a	26,1	945,95 ^a	10,01	0,528
	UV+Mel	950,15 ^a	29,5	1137,12 ^b	38,89	0,001
TAS	SF	3,53 ^a	0,27			
	UW	3,66 ^a	0,2	3,65 ^a	0,37	0,945
	UW+Mel	3,48 ^a	0,31	7,01 ^b	0,11	<0,001
TOS	SF	47,75 ^a	1,41			
	UW	47,64 ^a	3,93	40,54 ^a	5,07	<0,001
	UW+Mel	39,78 ^b	3,07	32,99 ^b	0,97	0,007

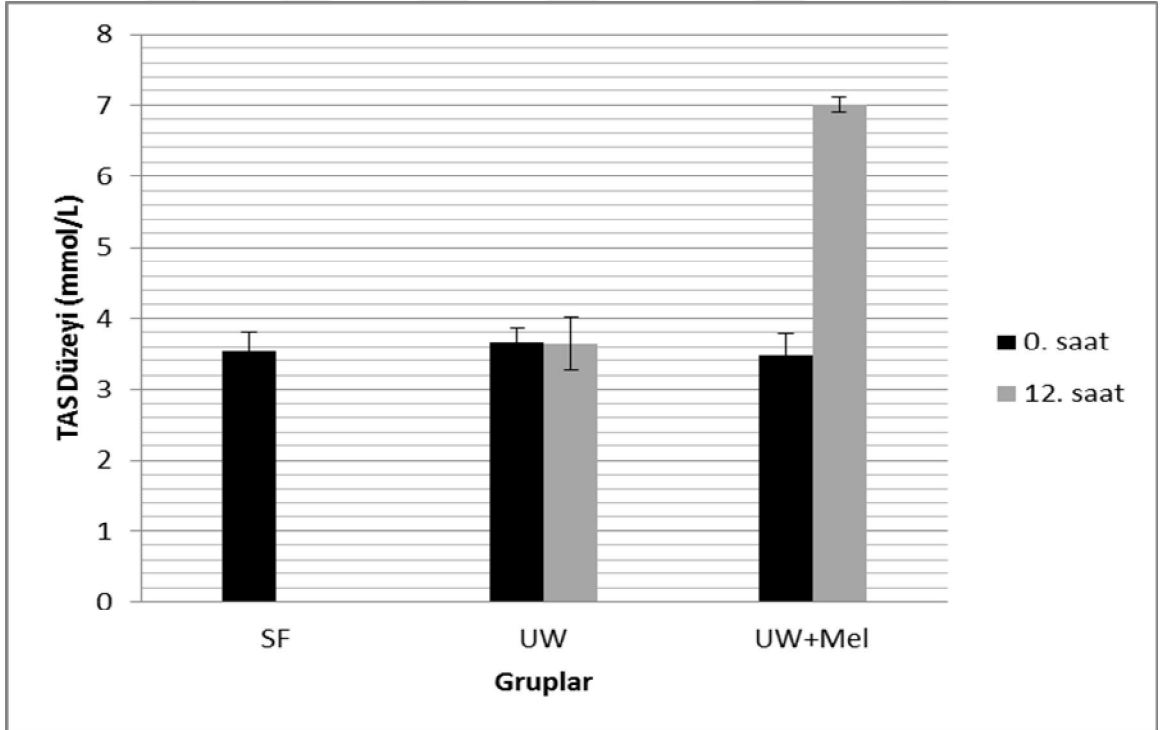
*Üst simgeler her bir zaman diliminde gruplar arası farklılığı göstermektedir. Farklı üst simgeye sahip gruplar istatistiksel olarak farklıdır.



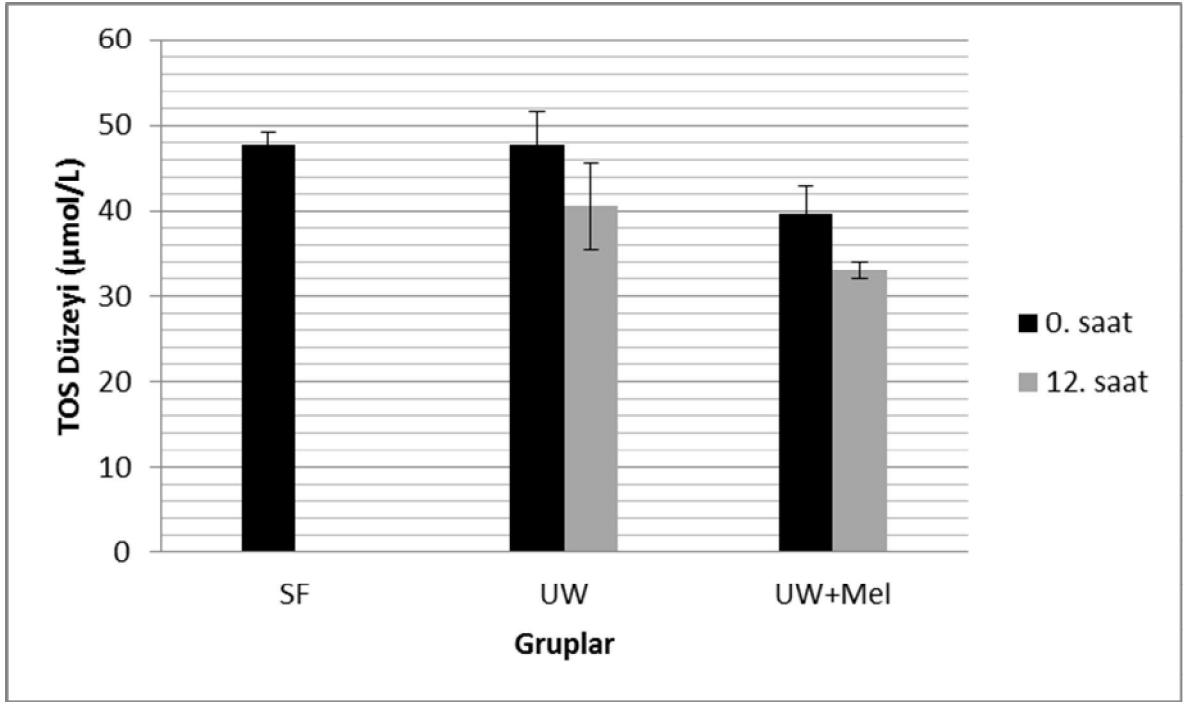
Şekil 4.25. Gruplar arası süreye bağlı MDA düzeylerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.26. Gruplar arası süreye bağımlı GSH aktivitelerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.27. Gruplar arası süreye bağımlı TAS aktivitelerinin karşılaştırılması.

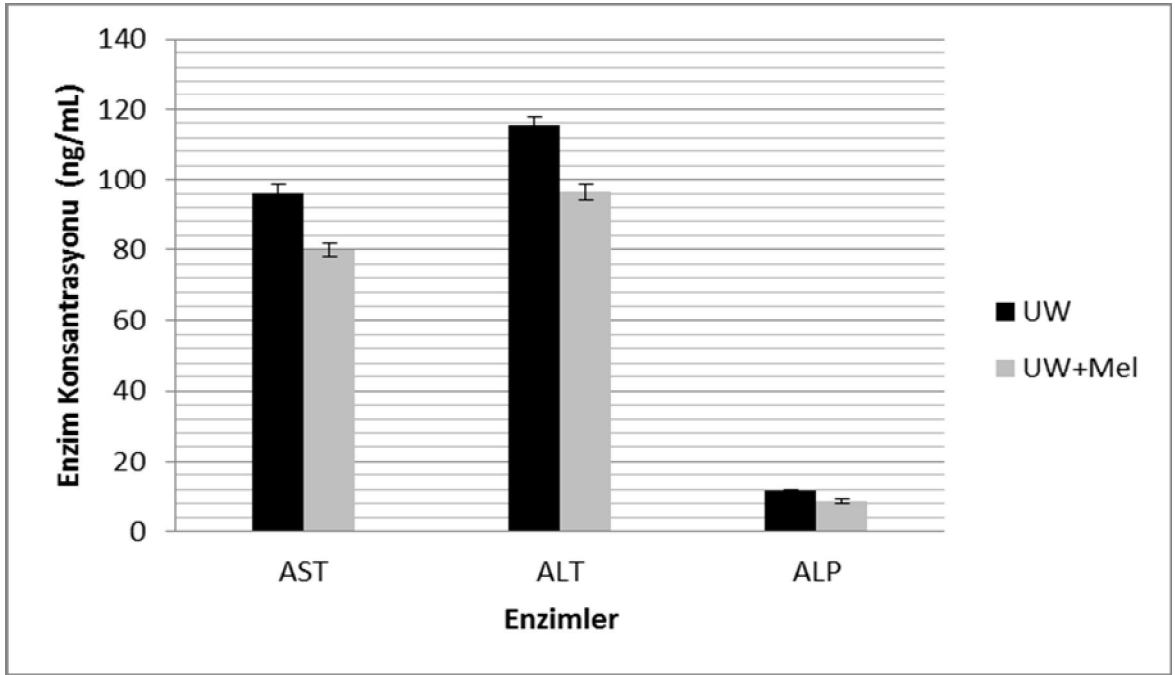


Şekil 4.28. Gruplar arası süreye bağımlı TOS aktivitelerinin karşılaştırılması.

Tablo 4.4. 12. Saatte Alınan Solüsyon Örneklerinde AST, ALT, ALP Parametreleri İstatistiksel Analizi

Parametreler	Grup	Ortalama	S.Sapma	p
AST	SF			<0,001
	UW	96,10 ^a	2,66	
	UW+Mel	79,79 ^b	1,82	
ALT	SF			<0,001
	UW	115,33 ^a	2,34	
	UW+Mel	96,33 ^b	2,34	
ALP	SF			<0,001
	UW	11,82 ^a	0,29	
	UW+Mel	8,71 ^b	0,46	

* Üst simgeler her bir zaman diliminde gruplar arası farklılığı göstermektedir. Farklı üst simgeye sahip gruplar istatistiksel olarak farklıdır.



Şekil 4.29. 12. saatte alınan solüsyon örneklerinde AST, ALT, ALP karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Organ transplantasyonu sürecinde nakledilecek organın veya dokunun normal histolojik yapısının, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin korunması yapılacak transplantasyonun başarısını doğrudan etkileyen en önemli faktördür. Bu nedenle, transplantasyon başarı oranlarını arttırmak için nakil sürecinde ilgili organ veya dokuların optimum düzeyde muhafazası için geçmişten günümüze bilimsel çalışmalar devam etmektedir.

Organ transplantasyonlarında nakil yapılacak organın prezervasyon süreci, organın donörden alınıp, alıcıya nakledilinceye ve normal biyolojik fonksiyonu başlayıncaya kadar olan süreyi kapsar. Bu süreçte temel amaç, donörden alınan organın nakledilinceye kadar geçen sürede dokusal ve hücrel yapı ve özelliklerinin optimum düzeyde korunması ve transplantasyonu takiben normal fonksiyonuna başlayarak devam edebilmesidir (1). Transplante edilecek organın bütünüyle veya kısmi olarak donörden alınması ile birlikte gelişen hücre hasarı ve fonksiyon kaybını önlemek için alınan organların organizmadakine benzer ortamlarda muhafaza edilmesi ideal korumanın temelidir. Ancak günümüzde hiçbir organ için organizmadaki canlı ortamı ile aynı olan prezervasyon solüsyonu veya ortamı bulunmamaktadır. Günümüzde kullanılmakta olan koruma solüsyonları hücre hasarı, fonksiyon kaybı ve belli bir süre sonra da hücre ölümünün önüne tam olarak geçememektedir (3). Bu nedenle organ transplantasyonlarında kullanılan koruma solüsyonlarının doku koruyucu özelliklerinin artırılması için hala çalışmalar devam etmektedir.

Hâlihazırda kullanılmakta olan UW ve HTK gibi prezervasyon solüsyonlarında doku koruma amacıyla solüsyon içerisine çeşitli antioksidanlar eklenmektedir (4, 107, 138). Bununla birlikte, antioksidanların oksidatif strese karşı hücre dayanıklılığını arttırdığı düşünüldüğünde, nakil öncesi donöre uygulanacak antioksidan takviyesi nakil yapılacak organdaki hücrelerin nakil esnasındaki strese karşı dayanıklılığını arttırması muhtemeldir. Bu nedenle, yaptığımız çalışmada karaciğer, donörden alınmadan belirli bir süre önce donörlere melatonin takviyesi yapılarak karaciğer hücrelerinin nakil esnasında ve yeni organizmaya adaptasyon sürecinde geçen zaman boyunca dirençlerinin artırılması ve hücrel bütünlüklerinin korunması amaçlanmıştır.

Yapılan çalışmada, antioksidan özelliği ile hücre zarını, organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikal hasarından koruyabilen, hücre içinde nükleusa kadar ulaşarak DNA'nın da oksidatif hasara karşı korunmasında rol alan ve diğer birçok antioksidana kıyasla daha etkin bir antioksidan olan melatonin kullanılmıştır (10, 11).

Deney kapsamında, SF grubu, UW grubu, UW+Mel grubu oluşturulup sakrifikasyon sonrası deneklerden karaciğer dokuları çıkarılıp materyal metotta belirtildiği şekilde uygulamalar yapılarak 0. ve 12. saatlerde doku örnekleri alındı. Alınan örnekler üzerinde rutin histolojik, biyokimyasal, immünohistokimyasal incelemeler yapılarak karaciğerin prezervasyon sürecinde korunması açısından melatonin olumlu etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Karaciğer parankiminin en büyük hücre grubu hepatositler olup özellikle karaciğer transplantasyonlarının başarısında bu hücrelerin histolojik ve biyokimyasal özelliklerinin korunması oldukça önemlidir (41). Bu amaçla kullanılan koruma solüsyonları içerisinde hepatositlerin özelliklerini koruyucu çeşitli moleküller ve antioksidan özellikli maddeler eklenmektedir. Örnek olarak, Polysol koruma solüsyonunda vitaminler, aminoasitler ve kuvvetli antioksidan özellikleri olan allopurinol, glutatyon, alfa-tokoferol ve askorbik asit gibi çeşitli SOR süpürücüleri kullanılmıştır. Bu solüsyonla yapılan deneysel çalışmada, kullanılan antioksidan maddelerin de etkisiyle karaciğer greftinin kalitesinin, mikro-sirkülasyonunun ve alıcıya uyumunun artmasının yanı sıra hepatositlerde de hücresel hasarın ve apoptozun azaldığı ve rejenerasyonun arttığı gösterilmiştir (139, 140). Günel Ö. ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada soğuk prezervasyon sürecinde melatoninin UW solüsyonu içerisinde karaciğerin korunmasına olumlu etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre, UW solüsyonu içerisinde melatonin eklenmesi sonucu 48 saate kadar etkin bir şekilde karaciğerin UW grubuna döre anlamlı derecede soğuk iskemi hasarından korunduğu tespit edilmiştir (141). Benzer şekilde, Aslaner A. ve ark. tarafından böbrek üzerine yapılan çalışmada da soğuk iskemi hasarına karşı melatonin takviyeli UW solüsyonunun koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (142). Zaouali ve ark. tarafından yapılan diğer bir çalışmada prezervasyon solüsyonu içerisinde melatonin ve trimetazidine eklenmiştir ve sonuç olarak Hsp70, Bcl2, eritropoetin, VEGF ve hem-oksijenaz-1 gibi sitoprotektif genlerin aktifleştiği gösterilmiştir (143). Çalışmamızın literatürdeki konuyla ilgili benzer çalışmalardan farkı transplantasyon amaçlı organ prezervasyonunda sıklıkla kullanılan UW solüsyonunda

karaciğerin antioksidan etkilerinden faydalanılması düşünülen melatoninin prezervasyon solüsyonuna katılması yerine hepatektomi öncesinde organizmaya sistemik olarak verilmesidir. Bu şekilde, melatoninin organizmada metabolizmaya katılarak hücrelerdeki görev aldığı yollarda karaciğer iskemisi öncesinde antioksidan kapasiteyi arttırıp, etkin sitoprotektif fonksiyon göstermesini sağlamaktır. Aldhous ve ark. tarafından yapılan çalışmada, oral olarak alınan melatoninin ilk 1 saat içerisinde kanda en yüksek seviyeye ulaştığı ve ilerleyen zamanda da yaklaşık 6-7 saat içerisinde eski seviyesine indiği gösterilmiştir. Nathja Groth tarafından yayınlanan derleme bir makalede farklı dozlarda melatonin uygulaması sonucu kan melatonin değerleri, melatonin yarılanma ömürleri gibi parametreler belirtilmiştir. Makalede geçen tüm yayınlan göz önüne alındığında melatonin uygulanan doza göre değişmekle birlikte kanda en yüksek seviyesine uygulamayı takiben ortalama 50 dk'da en yüksek seviyesine ulaştığı ve yarılanma ömrünün 45 dk olduğu görülmektedir (144). Bu nedenle, çalışmamızda hepatektomiden 45 dk önce melatonin uygulanarak, hepatektomi esnasında melatoninin kan dokuda dolayısıyla da karaciğer dokusunda en üst düzeye ulaşmış olması hedeflenmiştir.

Literatürde, histolojik bulgular içeren konuyla ilgili çalışmalar oldukça az sayıda olup karaciğer transplantasyonunda prezervasyon sürecinde karaciğer dokusuna ait yeterli histolojik, histokimyasal ve immünohistokimyasal veri bulunmamaktadır. Bununla birlikte, Ates ve ark. tarafından yapılan çalışmada soğuk stres sonucu karaciğer dokusunda nekroz, hepatosit dejenerasyon, sinüzoidal dilatasyon, hemoraji, vasküler konjesyon ve dilatasyon gibi histopatolojik değişiklikler ve oksidatif stres parametrelerinde artış saptanmıştır (145). Çalışmamızda da karaciğer dokusunda UW prezervasyon solüsyonunda 12 saatlik sürede karaciğer dokusunda hepatositler ve sinüzoid yapısı histolojik açıdan detaylı bir şekilde değerlendirilerek bulgular ortaya konulmuştur. Öne çıkan bulgular skorlanarak gruplar arası karşılaştırılmaları yapılmıştır.

UW ve UW+Mel gruplarının 0. saatte alınan doku örneklerindeki kesitlerde karaciğer parankiminin genel görünümü ve hepatositlerin histolojik özellikleri kontrol grubu ile benzer olarak normal histolojik yapıda izlendi.

UW ve UW+Mel gruplarının 12. saatte alınan doku örneklerinde ise çeşitli histopatolojik değişiklikler gözlemlendi. UW 12. saat grubunda bazı parankimal alanlardaki hepatositlerde sitoplazmik eozinofili, nükleer heterokromazi artışı dikkati çekti. Karaciğer

parankiminde görülen hidropik değişiklik ve dejenerasyon bulguları diğer tüm gruplardan daha fazlaydı. Bu grupta hem perisantral ven hem de periportal alanlardaki ilk 1-2 sıra hepatositlerde hidropik dejenerasyon bulgularının daha belirgin olduğu görüldü. Bu hepatositlerin sitoplazmik boyanma yoğunluğunun diğer gruplardakine göre azaldığı saptandı.

UW+Mel 12. saatte alınan doku örneklerinde bazı kesitlerde özellikle hepatik lobül merkezindeki sinüzoidlerde UW 12. saat grubuna kıyasla minimal düzeyde sinüzoidal dilatasyon saptandı. UW 12. saat grubunda yaygın bir şekilde perisantral ilk 1-2 sıra hepatositlerde hidropik dejenerasyon gözlenirken, UW+Mel 12. saat grubunda sadece bazı kesitlerde perisantral ven bölgesindeki hepatositlerde hidropik dejenerasyon bulguları tespit edildi. UW 12. saat grubunda bazı parankimal alanlarda izlenen sitoplazmik eozinofili ve nükleer heterokromazi bu grupta izlenmedi.

Yapılan bazı çalışmalarda, melatoninin karaciğer dokusunda CCl₄ toksisitesine karşı glikojen depolanmasını muhafaza ettiği gösterilmiştir (72). Formaldehit karaciğer toksisitesi üzerine yapılan bir çalışmada, toksik grupta portal alanlardaki hepatositler PAS- iken, melatonin uygulanan grupta tüm zonlarda PAS+ boyanma görülmüştür (73). Rat karaciğerinde oksidatif strese karşı melatoninin koruyucu etkisine dair yapılan başka bir çalışmada da yine melatoninin santral venden portal alana doğru hepatositlerde glikojen depolanmasını koruduğu ve yoğun PAS+ boyanma sağlandığı belirtilmiştir (74). Araştırmalar, melatoninin karaciğer dokusunda herhangi bir toksisite veya oksidatif stress durumlarında glikojen depolanmasını devam ettirdiğini göstermektedir.

Bizim çalışmamızda, kontrol grubu PAS boyamada karaciğer parankiminde hepatosit sitoplazmalarında orta düzeyde ve kuvvetli PAS pozitiflik (PAS+) saptandı. UW grubu 0. saat PAS boyama özellikleri kontrol grubu ile aynı izlendi. Bununla birlikte santral ven çevresindeki ilk sıra hepatositlerde zayıf PAS+ boyanma izlendi. UW+Mel grubu 0. saat PAS boyanma özellikleri ise kontrol grubu ile aynı olarak gözlendi.

UW grubu 12. saat PAS boyanmasında karaciğer parankimi orta derecede ve kuvvetli PAS+ boyanma izlendi. Benzer şekilde UW+Mel grubu 12. saat PAS boyamada da genel olarak parankimal alanlarda hepatositlerin orta derecede ve kuvvetli PAS+ boyandığı gözlendi. UW grubu 12. saatte perisantral ven ve periportal alandaki ilk sıra hepatositlerde PAS+ boyanma zayıf düzeyde izlendi. Ancak UW+Mel 12. saatte periportal alan ve santral ven çevresindeki hepatositlerde PAS+ boyanma yönünden parankimal alanlara kıyasla

farklılık gözlenmedi. Gruplar arasında PAS+ boyanma skorları açısından istatistiksel olarak fark görülmemiştir.

Grup içi ve gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar yapıldığında, UW grubunun 0. saat ile 12. saatleri arasında glikojen depolanması ve PAS+'lık açısından istatistiksel olarak bir fark bulunmamaktadır. UW+Mel grubunda ise, 12. saatte 0. saate göre PAS+'lık açısından anlamlı olmasa da bir artış görülmüştür. Ayrıca, 0. ve 12. saatlerde gruplar arası PAS+'lık karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bununla birlikte, 0. saatte UW+Mel grubu istatistiksel açıdan anlamlı fark olmasa da PAS+'lık açısından UW grubuna göre düşüş göstermiştir. Bu durumun deney protokolümüzde hepatektomi öncesi iskemi sürecinin bulunmaması, sıçanların normal ve benzer beslenme koşullarında olması ve tüm gruplara ait karaciğer dokularının hepatektomi sonrası iskemi ve hipotermi koşullarının benzer olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Apoptoz, iskemi reperfüzyon kaynaklı greft hasarının belirgin bir göstergesi olarak tanımlanmaktadır (75-77). Karaciğer allogreftlerinde uzun dönemde hepatosit ve endotel hücrelerde apoptoz yolağı üzerinden hücre ölümü gerçekleştiği bilinmektedir. Thomas H. J. Mueller ve ark. yaptıkları çalışmada, uzun süreli soğuk iskemi sonrası sıçan karaciğeri allogreftlerinde endotelial hücrelerin apoptozunun, spesifik kaspaz inhibisyonu uygulaması ile azaltılabileceğini göstermişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada, Caspase 3 ve 7'nin inhibisyonunun, nakledilen karaciğerlerde mikrovasküler hasarı azalttığını ve hayvanın yaşam süresini uzattığını gösterilmiştir (78). Yapılan benzer bir çalışmada, apoptoz yolağı inhibe edilerek hepatositlerin ve greftin normal fonksiyonunun korunduğu ve hücrelerin apoptozdan tamamen korunduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada in vivo yürütülen deneyde de benzer sonuçlar elde edilmiştir (77). Bu çalışmalar, karaciğer greftinin alıcıda fonksiyonunu sağlıklı bir şekilde devam ettirebilmesinde apoptozun önlenmesinin kritik rol oynadığını göstermektedir. Dolayısıyla, Caspase 3 aktivitesinin yüksek olması nakil başarısı açısından olumsuz bir gösterge iken, düşük olması ise nakil başarısını pozitif yönde etkilemektedir. Bu nedenle, prezervasyon sürecinde oluşacak apoptotik yolların engellenmesi greft rejeksiyonun önüne geçilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Bizim çalışmamızda, apoptoz sürecindeki karaciğer hücrelerini göstermek amacıyla Caspase 3 immünohistokimyasal boyama yapılmıştır. Yapılan immün boyamalarda Caspase 3 için kontrol grubu hepatosit sitoplazmalarında zayıf Caspase 3+ immünreaktivite tespit edildi.

UW grubu 0. saatte karaciğer parankiminde zayıf Caspase 3+ immünreaktivite izlendi. Bununla birlikte, portal alan ve santral ven çevresindeki ilk 1-2 sıra hepatositlerde Caspase 3 immünreaktivite pozitifliğinin diğer parankimal alanlardaki hepatositlere göre artmış olduğu görüldü. UW+Mel grubu 0. saat Caspase 3 boyanma özellikleri ise kontrol grubu ile benzer olarak izlendi.

UW grubu 12. saat Caspase 3 immünreaktivitesi genel parankimal alandaki hepatositlerde orta düzeyde pozitiflik gösterirken, santral ven çevresi ve portal alanlardaki hepatositlerde kuvvetli Caspase 3 immünreaktivite pozitifliği görüldü. UW+Mel grubu 12. saat tüm kesitlerde homojen olarak zayıf Caspase 3+ immünreaktivitesi saptandı.

Caspase 3 immünreaktivitesi grup içi saatler arası ve gruplar arası istatistiksel değerlendirme yapıldığında önemli farklılıklar gözlemlendi. UW+Mel grubu kendi içinde 0. saat ile 12. saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken ($p=0.157$), UW grubu 12. saat immünreaktivitesi UW grubu 0. saate göre anlamlı derecede yüksek olarak hesaplanmıştır ($p=0.025$). Bu sonuç göstermektedir ki, UW grubunda ilerleyen zamana paralel olarak Caspase 3 pozitif immünreaktivitesinde artış olmaktadır. Ayrıca, gruplar arası karşılaştırma yapıldığında, 0. saatte her üç grup karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklılık gözlenmezken ($p=0.154$), UW grubu 12. saat ile UW+Mel 12. saat grubu karşılaştırıldığında UW grubu 12. saat Caspase 3+ immünreaktivitesi anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0.005$). Bu nedenle, UW+Mel grubunda melatoninin etkisiyle Caspase 3 pozitif immünreaktivitesinde azalma olduğu ortaya çıkmaktadır. Yukarıda da belirtildiği üzere, literatür bilgileri nakil yapılan greftlerde başarısızlıkların temel nedenlerinden birisinin de ilerleyen zamanla birlikte artan apoptotik hepatosit sayısı olduğunu göstermektedir (146). Pankreas naklinde kaspaz aktivitesinin engellenmesinin I/R hasarını engelleyici rolünün araştırıldığı bir çalışmada bu uygulamanın nakil başarısı için umut verici olduğu belirtilmiştir (147). Bu nedenle, nakil süreçlerinde greft hücrelerinin apoptoza gitmesinin engellenmesi nakil başarı oranını artırması muhtemeldir. Çalışmamızda da, zamana bağımlı olarak UW grubunda hepatositlerin artmış apoptotik aktivitesi nedeniyle Caspase 3 immünreaktivitesi artmıştır. Bununla birlikte, melatonin uygulanan grupta hepatositlerin apoptoza gitmesinin engellenmesiyle Caspase 3 immünreaktivitesi azalmıştır. Bu noktada, nakledilecek organ canlıdan alınmadan önce uygulanan melatoninin karaciğer hücrelerine ulaştıktan sonra hücre içerisinde normal hücrelere kıyasla daha çok miktarda bulunması, prezervasyon sürecinde

oluşan hücresel hasara karşı melatoninin sitoprotektif etkinliği sayesinde, hücrede apoptoz yolğını baskılayarak hücreyi etkin bir şekilde koruduğu düşünülmektedir.

Karaciğer nakillerinde greftin normal fonksiyonunu devam ettirmesinde hücre içi biyokimyasal parametrelerin de normal seyretmesi oldukça önemlidir. Karaciğer transplantasyonu sonrası serum KCFT yüksekliği, safra üretiminin azalması ve ciddi koagülopati görülmesi PNF için tanımlayıcı kabul edilir ve retransplantasyon yapılmayan olguların tamamında ölüm kaçınılmazdır (148-150). Aliosmanoğlu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada prezervasyon sürecinde nakil öncesi antioksidan takviyesinin koruyucu özelliği araştırılmıştır. Verilen bulgulara göre, bu çalışmada prostaglandin E-1 (PGE-1) verilen gruplarda KCFT değerlerinin daha düşük seyrettiği görülmektedir. Çalışmamız da benzer şekilde, melatonin uygulanan grupta 12. saat KCFT değerleri UW grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu. AST değeri UW+Mel grubunda 79.79 ng/mL iken UW grubunda 96.10 ng/mL olarak ölçüldü ($p<0.001$). ALT değeri, UW+Mel grubunda 96.33 ng/mL iken UW grubunda 115.33 ng/mL olarak ölçüldü ($p<0.001$). ALP değeri ise UW+Mel grubunda 8.71 ng/mL iken UW grubunda 11.82 ng/mL olarak ölçüldü ($p<0.001$). Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, nakil öncesi intraperitoneal melatonin uygulamasının hücresel hasarı azalttığı ve AST, ALT, ALP değerlerinin korunmasını sağladığı düşünülmektedir.

Karaciğer nakillerinde başarı oranını etkileyen hücresel etmenlerden birisi de oksidatif stres parametreleridir. Serbest oksijen radikallerinin, savunma sisteminin koruyucu etkisini aşacak şekilde fazla oluşmaları sonucu, metabolizmada zararlı etkiler meydana gelmektedir. SOR'den en fazla etkilenen hücresel bileşikler lipidler olduğu için hücre membranı ve organel membran sistemleri serbest oksijen radikallerinin primer hedefleridir. Membranlarda bulunan fosfolipidlerdeki doymamış bağlar ve kolesterol, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek, peroksidasyon ürünlerini meydana getirir. Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü de malondialdehittir (MDA) (151-154). Oluşan MDA; hücre membranlarından iyon alışverişine etki edip, membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açarak, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA, DNA'nın nitrojen bazları ile de reaksiyona girebilir. Bu nedenle MDA hücreler için genotoksik ve karsinogenik bir ajandır (103,104).

Leonardo L. ve ark. tarafından yapılan bir araştırmada, nakil öncesi serum MDA seviyeleri ile nakil sonrası 1. yılda hayatta kalma arasındaki ilişki araştırılmıştır. Buna göre, nakil öncesi MDA seviyesi düştükçe hayatta kalma oranının arttığı gözlenmiştir. Hassan P. ve ark. ise yaptıkları bir çalışmada, nakil sonrası nakledilen karaciğerde oksidatif stres parametrelerinin değişimine bakmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre, sağlam vericiden alınan dokuda 1063.81 ± 420.00 olan MDA düzeyi, nakil sonrası ilk saatlerde ortalama olarak artmış ve 12. saatte 6188.06 ± 560.00 seviyesine ulaşmıştır. 24 saatten sonra ise her geçen gün MDA seviyesi azalmış ve 17. Günde 2942.3 ± 287.0 seviyesine inmiştir. Bu durum göstermektedir ki, nakledilen greft adaptasyon sürecini tamamladıkça, hasar parametrelerinden birisi olan MDA seviyesi düşmektedir. Yapılan her iki çalışmada da nakil başarı oranıyla MDA seviyesinin ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Bizim çalışmamızda da dokuda MDA seviyesi açısından grup içi saatler arası ve gruplar arası istatistiksel değerlendirme yapıldığında önemli farklılıklar gözlemlendi. 0. saat MDA düzeylerine baktığımızda gruplar içinde, SF grubu (760.84 nmol/g) ile UW grubu (764.43 nmol/g) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken, UW+Mel grubunda (647.93 nmol/g) anlamlı derecede düşük olarak hesaplandı. 12. saat MDA düzeyleri ise grup içi karşılaştırıldığında birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu, UW grubunda 635.51 nmol/g , UW+Mel grubunda ise 564.46 nmol/g olarak ölçüldü. UW grubunun 0. saat ile 12. saat MDA düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklılık bulundu ($p < 0.001$). Aynı şekilde UW+Mel grubunun 0. saat ile 12. saat MDA düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklılık bulundu ($p < 0.001$). Elde edilen tüm veriler değerlendirildiğinde, nakil öncesi melatonin uygulamasının prezervasyon sürecinde dokuda oksidatif stresi engelleyerek MDA seviyesini düşürdüğü görülmektedir.

GSH hücre içi antioksidan sisteminin bir üyesi olup, hücre redoks dengesinin sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Peroksitleri, daha az zararlı olan yağ asitlerine, su ve GSH disülfidlerine dönüştürür. Antioksidan işlevinin yanı sıra sinyal iletilişinin modülasyonu, hücre proliferasyonu ve immün cevapta da işlevleri tanımlanmıştır (89-93). GSH'nın çeşitli moleküllerle konjugasyonu, hücre GSH derişiminin düşmesi nedenleri arasında yer almaktadır. GSH'nın küçük moleküllerle oluşturduğu bu konjugatlar hücreden atılır. Konjugasyon veya atılım nedeni ile olan GSH miktarındaki azalma, hepatositlerde biyosentez ile ya da eksojen GSH alınımı ile karşılanır. Hücre içi GSH'nın düşmesi erken dönemde

hücrede adaptif yanıt oluşturarak GSH biyosentezini arttırmaktadır (91, 92, 96). Yüksek GSH konsantrasyonu hücre fonksiyon ve canlılığının bir göstergesi olarak kabul edilir (98). Bunun aksine GSH düzeyinin düşmesi hücre içi savunma sisteminin zayıflamasının ve mitokondriyal hasarın belirteçlerinden olarak kabul edilir (99). Mitokondriyal ve sitoplazmik glutatyonun tüketilmesi, apoptotik hücre ölümünün erken sinyali oluşturur. GSH'daki azalma mitokondri transmembran potansiyelini değiştirmekte, bu da mitokondrinin hızlı bir şekilde fonksiyonunu kaybederek, sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımına sebep olmaktadır. Böylece apoptozise giden yol tetiklenmektedir (94).

Tomaz J. ve ark. tarafından yapılan çalışmada, prezervasyon sürecinde ve nakil sonrası 2. saatte doku örneklerinde GSH seviyeleri ölçülmüştür. Verilen bulgulara göre soğuk prezervasyon sonunda GSH seviyesi ortalama 0.323 ± 0.062 imol/g iken; nakil sonrası 2. saatte bu değer 0.095 ± 0.01 imol/g olarak ölçülmüş ve anlamlı derecede düşüş kaydedilmiştir (155). Esther A. ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada da, laparotomi esnasında, soğuk prezervasyon sonunda ve reperfüzyondan 10 dk sonra alınan doku örneklerinde GSH düzeylerine bakılmıştır. Hafif hasarlı greft grubunda sonuçlar arasında anlamlı bir fark gözlenmezken, ileri düzey hasarlı greft grubunda reperfüzyon sonrası 10. dk grubunda diğer gruplara kıyasla GSH düzeyinde anlamlı olmasa da bir azalma eğilimi saptanmıştır (156).

Çalışmamızda GSH değerleri için grup içi saatler arası ve gruplar arası istatistiksel değerlendirme yapıldığında önemli farklılıklar gözlemlendi. 0. saat GSH düzeylerine baktığımızda, SF grubu (950.77 nmol/g), UW grubu (952.24 nmol/g) ve UW+Mel grubu (950.15 nmol/g) olarak ölçüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. 12. saat GSH düzeyleri karşılaştırıldığında, UW grubu (945.95 nmol/g) istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olmadığı, UW+Mel grubunun (1137.12 nmol/g) ise istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı. UW grubunun 0. saat ile 12. saat GSH düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklılık gözlenmedi ($p=0.528$). UW+Mel grubunun 0. saat ile 12. saat GSH düzeyleri karşılaştırıldığında ise anlamlı derecede farklılık bulundu ($p=0.001$).

Biyokimyasal olarak doku hasarının göstergelerinden birisi de TAS ve TOS değerlerinin düzeyidir. I/R gibi durumlarda, SOR değerleri artarken TAS değerleri düşmektedir. Vaishali N ve ark. tarafından yapılan çalışmada, organ transplantasyonu yapılan hastalarda, SOR'nin artışı sonucu TAS'ın azaldığı belirtilmiştir. Bu nedenle nakil öncesi

hastalara antioksidan takviyesinin, reperfüzyon hasarını azaltmada önemli rol oynayabileceği belirtilmiştir (157). Uçar M. ve ark. tarafından yapılan karaciğer nakli vericilerinde propofol ile izofluranın antioksidan etkinliğinin karşılaştırılması yapılarak preoperatif, intraoperatif, postoperatif plazma TAS düzeyleri ölçülmüştür. Her iki grupta da intraoperatif TAS düzeyinin preoperatife göre azaldığı saptanmıştır. Propofol grubunda postoperatif TAS düzeyinin preoperatife göre azalırken, izofluran grubunda artış olduğu gösterilmiştir ve değişim miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$) (158). Leonardo L. ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada 142 tane hepatoselüler karsinomlu hasta için karaciğer nakli öncesi serum total antioksidan kapasitesinin, karaciğer nakli sonrası 1 yıllık sağkalımı ile ilişkisine bakılmıştır. Nakil sonrası 1 yıldan uzun yaşayan 127 hastanın serum TAS seviyeleri ≥ 2.98 nmol/ml olduğu saptanmıştır. Karaciğer nakli sonrası 1 yıl içerisinde ölen 15 hastanın ise serum TAS seviyeleri <2.98 nmol / ml olduğu görülmüştür (159). Christoph S. ve ark. tarafından yapılan çalışmada karaciğer rezeksiyonu sırasında inflamatuvar yanıt ve oksidatif stres parametrelerine bakılmıştır. Serum TAS düzeyi perioperatif olarak sabit gözükürken, cerrahiden sonra oksidatif stresten korumak için serum TAS düzeyinde önemli bir azalma olduğu saptanmıştır ($p < 0.001$) (160).

Çalışmamızda grup içi ve gruplar arası istatistiksel değerlendirme yapıldığında TAS düzeyleri açısından önemli farklılıklar gözlemlendi. 0. saat TAS düzeylerine baktığımızda, SF grubu (3.53 mmol/L), UW grubu (3.66 mmol/L) ve UW+Mel grubu (3.48 mmol/L) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. 12. saat TAS düzeyleri karşılaştırıldığında, UW grubu (3.65 mmol/L) istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olmadığı, UW+Mel grubunun (7.01 mmol/L) ise istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı. UW grubunun 0. saat ile 12. saat TAS düzeyleri karşılaştırıldığında da anlamlı derecede farklılık gözlenmedi ($p=0.945$). UW+Mel grubunun 0. saat ile 12. saat TAS düzeyleri karşılaştırıldığında ise anlamlı derecede farklılık bulundu (<0.001).

Uçar M. ve ark. tarafından yapılan karaciğer nakli vericilerinde propofol ile izofluranın antioksidan etkinliği karşılaştırılarak preoperatif, intraoperatif, postoperatif plazma TOS düzeyleri ölçülmüştür. Bu çalışmada preoperatif değerlere göre plazma TOS düzeyi intraoperatif dönemde her iki grupta da artmıştır. Fakat postoperatif dönemde preoperatif değerlere göre plazma TOS düzeyi propofol grubunda azalırken, izofluran grubunda hemen hemen aynı kaldığı saptanmıştır. Her iki grupta da intraoperatif plazmaya göre postoperatif

TOS düzeyinde azalma görülmüştür (158). Christoph S. ve ark. tarafından yapılan çalışmada karaciğer rezeksiyonu sırasında inflamatuvar yanıt ve oksidatif stres parametrelerine bakılmıştır. Karaciğer rezeksiyonu sırasında ve hemen sonrasında serum TOS düzeyinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür (160).

Çalışmamızda grup içi saatler arası ve gruplar arası istatistiksel değerlendirme yapıldığında TOS değerleri arasında önemli farklılıklar gözlemlendi. 0. saat TOS düzeylerine baktığımızda, SF grubu (47.75 $\mu\text{mol/L}$) ile UW grubu (47.64 $\mu\text{mol/L}$) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermezken, UW+Mel grubu (39.78 $\mu\text{mol/L}$) istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktü. 12. saat TOS düzeyleri karşılaştırıldığında, UW grubu (40.54 $\mu\text{mol/L}$) ve UW+Mel grubu (32.99 $\mu\text{mol/L}$) istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık gösterdi. UW grubunun 0. saat ile 12. saat TOS düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi ($p<0.001$). UW+Mel grubunun 0. saat ile 12. saat TOS düzeyleri karşılaştırıldığında da anlamlı derecede farklılık saptandı ($p=0.007$).

Karaciğer transplantasyonlarında rutin olarak kullanılan UW solüsyonunda karaciğerde zamana bağlı olarak gelişen hücresel hasarlar tam olarak engellenememektedir. Günümüzde organ prezervasyon solüsyonlarının doku ve hücre koruyucu özelliklerinin artırılarak optimize edilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir. Çalışmamızda hepatektomi öncesi donöre intraperitoneal melatonin uygulamasının karaciğer prezervasyon sürecinde sitoprotektif etkileri araştırılmıştır. Elde ettiğimiz histolojik ve biyokimyasal bulgular hepatektomi öncesinde sistemik olarak donöre melatonin uygulanmasının karaciğerin prezervasyon sıvısında korunmasına önemli katkıları olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, hepatektomi öncesi donöre intraperitoneal melatonin uygulamasının karaciğer nakil süreçlerinde rutin kullanım potansiyeli olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte konuyla ilgili multidisipliner ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç olduğu görülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, ratlarda hepatektomi öncesi intraperitoneal melatonin uygulamasının, organ nakli amaçlı prezervasyon sürecinde UW solüsyonunda karaciğerin dokusal ve hücrel özelliklerinin korunması açısından koruyucu etkilerinin olup olmadığı araştırılmıştır. Elde edilen histolojik bulgulara göre, karaciğer parankiminde nekroz, hidropik dejenerasyon, sinüzoidal dilatasyon açısından melatonin uygulanan grupta total skor değerlendirmesinde UW grubuna göre anlamlı derecede fark gözlenmedi. Caspase 3 immünreaktivite açısından değerlendirildiğinde, UW grubunda özellikle periportal ve perisantral alanlarda kuvvetli Caspase 3+’lık gözlenirken, aynı alanlarda UW+Mel grubunda ise anlamlı düzeyde azalma saptandı. PAS boyanma açısından ise, gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. Yapılan biyokimyasal analizlerde, UW grubunda artan MDA, TOS düzeylerinin UW+Mel grubunda anlamlı derecede azaldığı tespit edildi. Ayrıca, UW grubunda azalış gösteren GSH ve TAS düzeyleri ise UW+Mel grubunda artış gösterdi. Karaciğer enzimlerinden olan AST, ALT, ALP değerlerinin, UW+Mel grubunda kontrol ve UW grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi.

Çalışmamızda elde edilen tüm bulgular değerlendirildiğinde, organ transplantasyonu öncesi intraperitoneal melatonin uygulamasının, prezervasyon solüsyonunda karaciğer dokusunun hücrel ve biyokimyasal korunmasında önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte konuyla ilgili multidisipliner ileri çalışmalar yapılarak, transplantasyon öncesi donöre intraperitoneal uygulanan melatoninin nakledilecek organdaki koruyucu özelliklerinin tüm yönleri ile aydınlatılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Guibert EE, Petrenko AY, Balaban CL, Somov AY, Rodriguez JV, Fuller BJ. Organ preservation: current concepts and new strategies for the next decade. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2011;38(2):125-42.
2. Haberal M, Emiroğlu R. Karaciğer Transplantasyonu, Temel ve Sistemik Cerrahi. 1 ed. İzmir: Güven Kitapevi; 2005
3. Pries J, Staples A, Hanson R. The effect of hepatic blood flow on taurocholate extraction by the isolated perfused rat liver. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1981;97(3):412-7.
4. Akbulut AS. UW (University of Wisconsin) ve HTK (Histidin-triptofan-ketoglutarat) prezervasyon solusyonlarının antioksidan ve hepatoprotektif etkilerine WR 2721 (Amifostin)'in katkısı2008.
5. Meine M, Zanotelli M, Neumann J, Kiss G, de Jesus Grezzana T, Leipnitz I, et al., editors. Randomized clinical assay for hepatic grafts preservation with University of Wisconsin or histidine-tryptophan-ketoglutarate solutions in liver transplantation. *Transplantation proceedings*; 2006: Elsevier.
6. Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien P-A. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology*. 2003;125(3):917-36.
7. Brzezinski A. Melatonin in humans. *New England journal of medicine*. 1997;336(3):186-95.
8. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1. *Journal of the American Chemical Society*. 1958;80(10):2587-.
9. Reiter R. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 1993;26(11):1141-55.
10. Reiter RJ, Tan D-x, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Cell biochemistry and biophysics*. 2001;34(2):237-56.
11. Reiter RJ, Tan D-x, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *Journal of biomedical science*. 2000;7(6):444-58.

12. Hamilton D. A history of organ transplantation: ancient legends to modern practice: University of Pittsburgh Pre; 2012.
13. Demirhan E. Organ aktarmaları. Tıbbi Deontoloji ve Genel Tıp Tarihi Bursa, Güneş ve Nobel Yayınları. 1996:109-20.
14. Elçioğlu Ö. Doku ve organ aktarımlarında onam konusu. Sendrom. 1996;8(10):95-100.
15. Savlania A. Alexis Carrel: Father of Vascular Anastomosis and Organ Transplantation. Indian Journal of Vascular and Endovascular Surgery. 2017;4(3):115.
16. Acarlı K. Genel Cerrahi, Organ Transplantasyonları, Değerli Ü. 1998.
17. Özdağ N. Organ nakli ve bağışına toplumun bakışı. CÜ Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi. 2001;5(2):46-55.
18. Welch C. A note on transplantation of the whole liver in dogs. Transplant Bull. 1955;2:54-5.
19. Starzl T, Marchioro T, von Kaulla K, Hermann G, Brittain R, Waddell W. homotransplantation of the liver in humans. surg. gynecol. obstet. 117: 659. PubMed| CAS| Web of Science® Times Cited. 1963;522.
20. Strong RW, Lynch SV, Ong TH, Matsunami H, Koido Y, Balderson GA. Successful liver transplantation from a living donor to her son. New England Journal of Medicine. 1990;322(21):1505-7.
21. Millis JM, Cronin DC, Brady LM, Newell KA, Woodle ES, Bruce DS, et al. Primary living-donor liver transplantation at the University of Chicago: technical aspects of the first 104 recipients. Annals of surgery. 2000;232(1):104.
22. Kasapoğlu B, Yalçın K, Türkay C. Canlı donörden karaciğer transplantasyonu. Güncel Gastroenteroloji. 2010;14(2):96-102.
23. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. New England Journal of Medicine. 1996;334(11):693-700.
24. Mızrak D, İdilman R. Karaciğer Nakli: Hasta Seçimi, Gelişen Endikasyonlar. Türkiye Klinikleri Journal of General Surgery Special Topics. 2009;2(1):10-3.
25. Duffy JP, Kao K, Ko CY, Farmer DG, McDiarmid SV, Hong JC, et al. Long-term patient outcome and quality of life after liver transplantation: analysis of 20-year survivors. Annals of surgery. 2010;252(4):652-61.

26. F D. Anatomi. 3 ed. Adana1994. 633-55 p.
27. Lett  ron P, Fromenty B, Benoît T, Degott C, Pessayre D. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. Journal of hepatology. 1996;24(2):200-8.
28. Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1997;94(6):2557-62.
29. Arıncı K EA. Anatomi. 1 ed. Ankara: G  ne   Kitabevi; 2006.
30. Starr S, Hand H. Nursing care of chronic and acute liver failure. Nursing standard. 2002;16(40):47-54; quiz 5-6.
31. Kuran O. Sistematik anatomi: Filiz Kitabevi; 1983.
32. JL C. Anatomy2001.
33. Couinaud C. The Liver. Anatomical and surgical investigations. Paris: Masson; 1957.
34. Roncati L, Manenti A, Simonini E. Image-Guided Proper Liver Segmentectomy. World journal of surgery. 2017:1-3.
35. Aslan S. Karaci  er nakli vericilerinde kontroll   hipotansiyon [Uzmanlık Tezi]. Malatya:   n  n     niversitesi; 2010.
36. S S. Gray's Anatomy – International Edition 40 ed: Elsevier Publishing; 2008.
37. A   . Temel Ve Klinik Bilimler Ders Kitapları: Gastroenterohepatoloji.   stanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2001.
38. Perek S SK. Karaci  er hastalıkları. Cerrahi Gastroenteroloji. 7 ed. De  erli    EY, editor.   stanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2005.
39. Northover JM, Terblanche J. A new look at the arterial supply of the bile duct in man and its surgical implications. The British journal of surgery. 1979;66(6):379-84.
40. Terblanche J, Allison HF, Northover JM. An ischemic basis for biliary strictures. Surgery. 1983;94(1):52-7.
41. Ross MH, Pawlina W. Histoloji / Konu Anlatımı ve Atlas,   li  kili Hücre Biyolojisi ve Molek  ler Biyoloji ile. 6 ed. Ankara: Palme Yayıncılık; 2014.
42. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic histology: text & atlas: McGraw-Hill New York; 2003.

43. Korkmaz M, Guvenc BH, Bilir A, Karal-Yilmaz O, Kumbasar A, Caferler J, et al. Isolation and culture of adult and fetal rabbit bladder smooth muscle cells and their interaction with biopolymers. *J Pediatr Surg*. 2003;38(1):21-4.
44. Korkmaz M, Yakut T, Narci A, Guvenc BH, Gulten T, Yagmurca M, et al. Esophageal muscle cell interaction with biopolymers. *Med Sci Monitor*. 2007;13(2):Br46-Br9.
45. Histology image: 88_09a at the University of Oklahoma Health Sciences Center 2018 [cited 2018 07.07.2018]. Histology image: 88_09a at the University of Oklahoma Health Sciences Center]. Available from:
http://www.ouhsc.edu/histology/Glass%20slides/88_09a.jpg.
46. Histology image: 88_09b at the University of Oklahoma Health Sciences Center Oklahoma Health Sciences Center 2018 [cited 2018 07.07.18]. Histology image: 88_09b at the University of Oklahoma Health Sciences Center]. Available from:
http://www.ouhsc.edu/histology/Glass%20slides/88_09b.jpg.
47. Zones of liver lobes. : Utah University; 2018 [cited 2018 07.07.18]. Available from:
<https://library.med.utah.edu/WebPath/LIVEHTML/LIVER003.html>.
48. Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC. Schiff's Diseases of the Liver: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
49. Gebhardt R. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacology & therapeutics*. 1992;53(3):275-354.
50. Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mechanisms of development*. 2003;120(1):117-30.
51. Li Z, Ji L, Su S, Zhu X, Cheng F, Jia X, et al. Leptin up-regulates microRNA-27a/b-3p level in hepatic stellate cells. *Experimental cell research*. 2018;366(1):63-70.
52. IJzer J, Roskams T, Molenbeek RF, Ultee T, Penning LC, Rothuizen J, et al. Morphological characterisation of portal myofibroblasts and hepatic stellate cells in the normal dog liver. *Comparative hepatology*. 2006;5(1):7.
53. Ohtani O, Ohtani Y. Lymph circulation in the liver. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. 2008;291(6):643-52.
54. Standring S. Head and neck. *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice*. 2008:395-704.

55. Bancroft JD, Floyd AD, Suvana SK. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 2013.
56. Hiatt JL, Gartner LP. Color Atlas and Text of Histology. Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
57. Khomutovskii O, Mironova V, Degtiareva I. Structure and function of hepatocyte lysosomes and peroxisomes of rachitic rats. *Ukrains'kyi biokhimichnyi zhurnal*. 1976;48(4):437-40.
58. Blaauboer B, Van Holsteijn C, Bleumink R, Mennes W, Van Pelt F, Yap SH, et al. The effect of beclobric acid and clofibrilic acid on peroxisomal β -oxidation and peroxisome proliferation in primary cultures of rat, monkey and human hepatocytes. *Biochem Pharmacol*. 1990;40(3):521-8.
59. Boll M, Lutz W, Becker E, Stampfl A. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2001;56(7-8):649-59.
60. Blouin A, Bolender RP, Weibel ER. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *The Journal of cell biology*. 1977;72(2):441-55.
61. Mukaddes E. Özel Histoloji. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevleri; 2016.
62. Abdel-Misih SR, Bloomston M. Liver anatomy. *Surgical Clinics*. 2010;90(4):643-53.
63. Akarca US. Karaciğer Fonksiyon Testi Yüksekliğine Tanısal Yaklaşım. 9. İç Hastalıkları Kongresi. 2007.
64. Tamaru CS, Cole B, Bailey R, Brown C, Ako H. A manual for commercial production of the swordtail, *Xiphophorus helleri*: Center for Tropical and Subtropical Aquaculture; 2001.
65. Takashima F, Hibiya T. An atlas of fish histology: normal and pathological features. 1995.
66. Weisman J, Miller D. Lipoid liver disease and steatitis in a captive sapphire damselfish, *Pomacentrus pavo*. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*. 2006;2(36):99-104.
67. Guyton A. Textbook of Medical Physiology. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2001.
68. Guyton A, Hall J. Bir organ olarak karaciğer. *Tıbbi Fizyoloji* 10 ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2001.
69. RS S. Klinik Anatomi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004.

70. Raddatz D, Ramadori G. Carbohydrate metabolism and the liver: actual aspects from physiology and disease. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 2007;45(01):51-62.
71. Rao MS, Reddy JK, editors. Peroxisomal β -oxidation and steatohepatitis. *Seminars in liver disease*; 2001: Copyright© 2001 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662.
72. Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A, editors. Mitochondria in steatohepatitis. *Seminars in liver disease*; 2001: Copyright© 2001 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662.
73. Sambasiva Rao M, Reddy JK. PPAR α in the pathogenesis of fatty liver disease. *Hepatology*. 2004;40(4):783-6.
74. Reddy JK, Sambasiva Rao M. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2006;290(5):G852-G8.
75. Moore KL, Persaud T, Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H. Klinik yönleri ile insan embriyolojisi: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002.
76. Moore K, TVN P. Embriyoloji ve doğum defektlerinin temelleri. S Müftüoğlu, P Atilla, F Kaymaz, Çev. 2009;7.
77. Larsen WJ, Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. *Larsen's Human Embryology*: Churchill Livingstone; 2009.
78. Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science*. 1999;284(5422):1998-2003.
79. Zorn A. Liver development (October 31, 2008), *StemBook*, ed. The Stem Cell Research Community, *StemBook*, doi/103824/stembook. 2008;1(1).
80. Sadler T. *Langman's Medical Embryology*. 2006. Baltimore, Williams&Wilkins.10.
81. Carlson BM. *Human Embryology and Developmental Biology E-Book: with STUDENT CONSULT Online Access*: Elsevier Health Sciences; 2012.
82. Şeftalioğlu AG, *Embriyolojisi Öİ*. 3. baskı, Ankara: Tıp & Teknik Yayıncılık Ltd. Şti; 1998.
83. Kayalı H ŞG, Taşyürekli M. . *İnsan Embriyolojisi*. 7 ed. İstanbul: Alfa Basım Yayım Dağıtım; 1992.

84. Larsen W, Embriology H. Sherman, LS, Potter, SS, Scott, WJ, eds. Human Embryology. 2001.
85. Petorak İ. Medikal Embriyoloji. Beta Basım Yayım Dağıtım AŞ, İstanbul.; s. 1984;149:212-9.
86. Çay M. Ratlarda subkronik formaldehit zehirlenmelerinin karaciğerde neden olduğu hasara karşı chrysinin etkileri: İnönü Üniversitesi; 2012.
87. Bayramiçli M. Deneysel mikrocerrahi: Temel araştırma, doku ve organ nakli modelleri: Argos; 2005.
88. Kogure K, Ishizaki M, Nemoto M, Kuwano H, Makuuchi M. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery. 1999;6(2):171-5.
89. Hicks M, Hing A, Gao L, Ryan J, MacDonald PS. Organ preservation. Transplantation Immunology: Springer; 2006. p. 331-73.
90. Pegg D. Organ preservation. The Surgical clinics of North America. 1986;66(3):617-32.
91. Starzl TE. History of clinical transplantation. World journal of surgery. 2000;24(7):759-82.
92. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. Transplantation. 1988;45(4):673-6.
93. Wahlberg JA, Southard JH, Belzer FO. Development of a cold storage solution for pancreas preservation. Cryobiology. 1986;23(6):477-82.
94. Mangus RS, Tector AJ, Agarwal A, Vianna R, Murdock P, Fridell JA. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution (HTK) and University of Wisconsin solution (UW) in adult liver transplantation. Liver transplantation. 2006;12(2):226-30.
95. Avolio AW, Agnes S, Nure E, Maria G, Barbarino R, Pepe G, et al., editors. Comparative evaluation of two perfusion solutions for liver preservation and transplantation. Transplantation proceedings; 2006: Elsevier.
96. Jeevanandam V, Auteri J, Sanchez J, Hsu D, Marboe C, Smith C, et al. Cardiac transplantation after prolonged graft preservation with the University of Wisconsin solution. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. 1992;104(2):224-8.

97. Hu S, Yin S, Jiang X, Huang D, Shen G. Melatonin protects against alcoholic liver injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 2009;616(1-3):287-92.
98. Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin: exceeding expectations. *Physiology.* 2014;29(5):325-33.
99. Acuna Castroviejo D, C Lopez L, Escames G, López A, A Garcia J, J Reiter R. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Current topics in medicinal chemistry.* 2011;11(2):221-40.
100. Galley HF. Bench-to-bedside review: targeting antioxidants to mitochondria in sepsis. *Critical care.* 2010;14(4):230.
101. Lowes D, Webster N, Murphy M, Galley H. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *British journal of anaesthesia.* 2013;110(3):472-80.
102. Tan D-X, Manchester LC, Qin L, Reiter RJ. Melatonin: a mitochondrial targeting molecule involving mitochondrial protection and dynamics. *International journal of molecular sciences.* 2016;17(12):2124.
103. Yalın A, Keskinöz EN, Kızaran A. Organ Korunması. 2011.
104. Pienaar B, Lindell S, Van TG, Southard J, Belzer F. Seventy-two-hour preservation of the canine liver by machine perfusion. *Transplantation.* 1990;49(2):258-60.
105. Belzer F, editor Evaluation of preservation of the intra-abdominal organs. *Transplantation proceedings;* 1993.
106. Capizzi RL. Clinical status and optimal use of amifostine. *Oncology-Huntington.* 1999;13(1):47-62.
107. Aliosmanoğlu İ. Prostaglandin E-1 kullanımının Wisconsin Üniversitesi solüsyonu ve histidin-triptofan-ketoglutarat prezervasyon solusyonları ile perfüze karaciğerde prezervasyon hasarı üzerine etkisi. 2008.
108. Upadhy GA, Topp SA, Hotchkiss RS, Anagli J, Strasberg SM. Effect of cold preservation on intracellular calcium concentration and calpain activity in rat sinusoidal endothelial cells. *Hepatology.* 2003;37(2):313-23.

109. Kiuchi T, Oldhafer KJ, Schlitt HJ, Nashan B, Deiwick A, Wonigeit K, et al. BACKGROUND AND PROGNOSTIC IMPLICATIONS OF PERIREPERFUSION TISSUE INJURIES IN HUMAN LIVER TRANSPLANTS: A Panel Histochemical Study1. Transplantation. 1998;66(6):737-47.
110. Urata K, Brault A, Rocheleau B, Huet PM. Role of Kupffer cells in the survival after rat liver transplantation with long portal vein clamping times. Transplant international. 2000;13(6):420-7.
111. Urata K, Brault A, Huet P-M. Effects of portal vein clamping time on rat liver microcirculation following extended cold preservation and transplantation. Transplant international. 1999;12(6):408-14.
112. Eren E, Kirali K, Güler M, Yakut C. Donor heart preservation in heart transplantation. Turkish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2004;12(2):145-50.
113. Demmy TL, Biddle JS, Bennett LE, Walls JT, Schmaltz RA, Curtis JJ. Organ Preservation Solutions In Heart Transplantation-patterns Of Usage And Related Survival1. Transplantation. 1997;63(2):262-9.
114. Keck B, White R, Breen T, Daily O, Hosenpud J. Thoracic organ transplants in the United States: a report from the UNOS/ISHLT Scientific Registry for Organ Transplants. United Network for Organ Sharing. International Society for Heart and Lung Transplantation. Clinical transplants. 1994:37-46.
115. Follette D, Fey K, Buckberg G, Helly JJ, Steed D, Foglia R, et al. Reducing postischemic damage by temporary modification of reperfusate calcium, potassium, pH, and osmolarity. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. 1981;82(2):221-38.
116. Mankad P, Severs N, Lachno D, Rothery S, Yacoub M. Superior qualities of University of Wisconsin solution for ex vivo preservation of the pig heart. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. 1992;104(2):229-40.
117. Clavien P-A, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. Annals of surgery. 2000;232(2):155.
118. Sindram D, Rüdiger HA, Upadhya AG, Strasberg SM, Clavien P-A. Ischemic preconditioning protects against cold ischemic injury through an oxidative stress dependent mechanism. Journal of hepatology. 2002;36(1):78-84.

119. Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology*. 1999;30(6):1481-9.
120. Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology*. 1999;30(5):1223-31.
121. Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology*. 1998;27(6):1652-60.
122. Bessems M, Doorschodt B, Dinant S, de Graaf W, van Gulik T, editors. Machine perfusion preservation of the pig liver using a new preservation solution, polysol. *Transplantation proceedings*; 2006: Elsevier.
123. Pedotti P, Cardillo M, Rigotti P, Gerunda G, Merenda R, Cillo U, et al. A comparative prospective study of two available solutions for kidney and liver preservation. *Transplantation*. 2004;77(10):1540-5.
124. Lauschke H, Olschewski P, Tolba R, Schulz S, Minor T. Oxygenated machine perfusion mitigates surface antigen expression and improves preservation of predamaged donor livers. *Cryobiology*. 2003;46(1):53-60.
125. Lee CY, Mangino MJ. Preservation methods for kidney and liver. *Organogenesis*. 2009;5(3):105-12.
126. Mees N, Southard JH, Belzer F. Inhibition of ischemic induced cellular swelling in kidney cortex tissue by lactobionate anions. *The Journal of trauma*. 1982;22(2):118-20.
127. Belzer F, Ashby BS, Dunphy JE. 24-hour and 72-hour preservation of canine kidneys. *The Lancet*. 1967;290(7515):536-9.
128. Friend P IC, Lopez I. . Normotermic perfusion of the isolated liver. . *Transplant Proc* 2001;33(7):3436-8.
129. Butler AJ, Rees MA, Wight DG, Casey ND, Alexander G, White DJ, et al. Successful extracorporeal porcine liver perfusion for 72 hr1. *Transplantation*. 2002;73(8):1212-8.
130. St Peter S, Imber C, Lopez I, Hughes D, Friend P. Extended preservation of non-heart-beating donor livers with normothermic machine perfusion. *Brit J Surg*. 2002;89(5):609-16.

131. Neuhaus P, Blumhardt G. Extracorporeal liver perfusion: applications of an improved model for experimental studies of the liver. *The International journal of artificial organs*. 1993;16(10):729-39.
132. Starkes HF, Tewari A, Flokas K, Kosek JC, Brown D, Van-Kessel AL, et al. Effectiveness of a purified human hemoglobin as a blood substitute in the perfused rat liver. *Gastroenterology*. 1991;101(5):1345-53.
133. Motoyama S, Minamiya Y, Saito S, Saito R, Matsuzaki I, Abo S, et al. Hydrogen peroxide derived from hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell apoptosis in perfused hypoxic rat liver. *Gastroenterology*. 1998;114(1):153-63.
134. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1959;82(1):70-7.
135. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry*. 1978;86(1):271-8.
136. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*. 2005;38(12):1103-11.
137. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*. 2004;37(4):277-85.
138. Pietri S, Culcasi M, Albat B, Alberici G, Menasché P. Direct assessment of the antioxidant effects of a new heart preservation solution, Celsior. A hemodynamic and electron spin resonance study. *Transplantation*. 1994;58(6):739-42.
139. Yagi S, Doorschodt BM, Afify M, Klinge U, Kobayashi E, Uemoto S, et al. Improved preservation and microcirculation with POLYSOL after partial liver transplantation in rats. *Journal of Surgical Research*. 2011;167(2):e375-e83.
140. Shi S, Xue F. Current antioxidant treatments in organ transplantation. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;2016.
141. Günel Ö, Coşkun A, Aslaner A, Yildirim Ü. Does melatonin alleviate cold preservation injury of the liver? *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2010;40(3):465-70.
142. Aslaner A, Gunal O, Turgut HT, Celik E, Yildirim U, Demirci RK, et al. Effect of melatonin on kidney cold ischemic preservation injury. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2013;6(9):794.

143. Zaouali MA, Bardag-Gorce F, Carbonell T, Oliva J, Pantazi E, Bejaoui M, et al. Proteasome inhibitors protect the steatotic and non-steatotic liver graft against cold ischemia reperfusion injury. *Experimental and molecular pathology*. 2013;94(2):352-9.
144. Harpsøe NG, Andersen LPH, Gögenur I, Rosenberg J. Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review. *European journal of clinical pharmacology*. 2015;71(8):901-9.
145. Ates B, Ilker Dogru M, Gul M, Erdogan A, Dogru AK, Yilmaz I, et al. Protective role of caffeic acid phenethyl ester in the liver of rats exposed to cold stress. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2006;20(3):283-9.
146. Kabelitz D. Apoptosis, graft rejection, and transplantation tolerance. *Transplantation*. 1998;65(7):869-75.
147. Drognitz O, Obermaier R, Liu X, Neeff H, Dobschuetz Ev, Hopt UT, et al. Effects of organ preservation, ischemia time and caspase inhibition on apoptosis and microcirculation in rat pancreas transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2004;4(7):1042-50.
148. McKeown C, Edwards V, Phillips MJ, Harvey P, Petrunka C, Strasberg S. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation*. 1988;46(2):178-91.
149. Flowers M, Sherker A, Sinclair SB, Greig PD, Cameron R, Phillips MJ, et al. Prostaglandin E in the treatment of recurrent hepatitis B infection after orthotopic liver transplantation. *Transplantation*. 1994;58(2):183-92.
150. Quiroga J, Prieto J. Liver cytoprotection by prostaglandins. *Pharmacology & therapeutics*. 1993;58(1):67-92.
151. Caraceni P, Rosenblum ER, Van Thiel DH, Borle AB. Reoxygenation injury in isolated rat hepatocytes: relation to oxygen free radicals and lipid peroxidation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1994;266(5):G799-G806.
152. Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury. *Critical care medicine*. 1988;16(10):947-53.
153. Foschi D, Castoldi L, Lesma A, Musazzi M, Benevento A, Trabucchi E. Effects of ischaemia and reperfusion on liver regeneration in rats. *The European journal of surgery= Acta chirurgica*. 1993;159(8):393-8.

154. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)*. 2004;57(9-10):453-5.
155. Grezzana Filho TdJM, Corso CO, Zanutelli ML, Marroni CA, Brandão ABM, Schlindwein E, et al. Liver glutathione depletion after preservation and reperfusion in human liver transplantation. *Acta chirurgica brasileira*. 2006;21(4):223-9.
156. Ardite E, Ramos C, Rimola A, Grande L, Fernández-Checa JC. Hepatocellular oxidative stress and initial graft injury in human liver transplantation. *Journal of hepatology*. 1999;31(5):921-7.
157. Thorat VN, Suryakar AN, Naik P, Tiwale BM. Total antioxidant capacity and lipid peroxidation in liver transplantation. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2009;24(1):102-4.
158. Muharrem U. Sağ hepatektomi cerrahisi uygulanan karaciğer nakli vericilerinde propofol ile izofluranın antioksidan etkinliğinin karşılaştırılması Malatya: İnönü Üniversitesi; 2012.
159. Lorente L, Rodriguez ST, Sanz P, Pérez-Cejas A, Abreu-González P, Padilla J, et al. Serum total antioxidant capacity prior to liver transplantation for hepatocellular carcinoma is associated with 1-year liver transplantation survival. *Journal of International Medical Research*. 2018:0300060518768150.
160. Schwarz C, Fitschek F, Bar-Or D, Klaus DA, Tudor B, Fleischmann E, et al. Inflammatory response and oxidative stress during liver resection. *Plos One*. 2017;12(10):e0185685.

EKLER

EK 1: ÖZGEÇMİŞ

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Mehmet Mustafa ERDOĞAN
Doğum tarihi ve yeri : 03/03/1979 – MALATYA
Uyruğu : T.C.
İletişim adresleri : drmustafaerdogan@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Turgut Özal Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı)
Lisans : Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, 1999-2006, İzmir.
Yabancı Dil : İngilizce