



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**UW (UNIVERSITY OF WISCONSIN) ve HTK (HİSTİDİN-TRİPTOFAN-
KETOGLUTARAT) PREZERVASYON SOLUSYONLARININ
ANTİOKSİDAN ve HEPATOPROTEKTİF ETKİLERİNE WR 2721
(AMİFOSTİN) 'İN KATKISI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ahmet Sami AKBULUT

Ankara/2008



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**UW (UNIVERSITY OF WISCONSIN) ve HTK (HİSTİDİN-TRİPTOFAN-
KETOGLUTARAT) PREZERVASYON SOLUSYONLARININ
ANTİOKSİDAN ve HEPATOPROTEKTİF ETKİLERİNE WR 2721
(AMİFOSTİN) 'İN KATKISI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ahmet Sami AKBULUT

Tez Danışmanları
Yrd. Doç. Dr Şinasi SEVMİŞ
Prof Dr Hamdi KARAKAYALI

Ankara/2008

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini büyük bir özveriyle aktaran ve yol gösteren başta sayın Prof. Dr. Mehmet HABERAL olmak üzere uzmanlık eğitimim süresince emeği geçen tüm hocalarıma saygı ve şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmamın planlama ve yazım aşamasında yaptıkları çok değerli katkıları nedeni ile Genel Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Hamdi KARAKAYALI ve Yrd. Doç. Dr. Şinasi SEVMİŞ, sonuçların değerlendirilmesinde yardımcı olan Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Dr. Nilüfer BAYRAKTAR, Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof.Dr. Atilla DAĞDEVİREN, Patoloji Anabilim Dalı araştırma görevlisi sayın Dr. Müge ÜNLÜKAPTAN, Aile Hekimliği Anabilim Dalı üyesi sayın Doç.Dr. Ergün ÖKSÜZ ve Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Hale TUFAN'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Tüm organ nakli programlarında olduğu gibi karaciğer naklinde de ister canlı, isterse kadavra kaynaklı olsun elde edilen organın korunması, uzun süre saklanması ve bu esnada hepatositlerde iskemi-reperfüzyon hasarını minime indirmek için Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate (HTK) ve University of Wisconsin (UW) gibi birçok koruma solüsyonu tanımlanmıştır.

Amifostin; kemoterapi ve radyoterapinin normal hücrelerde yaptığı hasarı önlemek amacıyla 1969 yılından beri kullanılmaktadır. İlacın selektif sitoprotektif etkisi birçok klinik çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada sitoprotektif bir ajan olan Amifostin'in HTK ve UW solüsyonlarının hücre koruyucu etkisine katkısının analizi amaçlandı.

Çalışmada; her biri 8 rattan oluşan 6 grup kullanıldı. Prezervasyon için 1.gruptaki ratlara Ringer Laktat (RL), 2.gruba RL+ amifostin, 3.gruba HTK, 4. gruba HTK+ amifostin, 5.gruba UW ve 6.gruba UW+ amifostin verildi. Amifostin hepatektomiden 30 dakika önce 200 mg/kg dozunda cilt-altı yolla uygulandı. Perfüzyon sonrası hepatektomi yapılarak doku içinde aynı sıvı bulunan torbalara konularak +4°C de saklandı. Sıfır, altı ve onikinci saatlerde perfüzyon sıvısı ve karaciğerden doku alınarak biyokimyasal olarak alanin aminotransferaz (ALT), alkalin fosfataz (ALP) ve nitrik oksid (NO), immunhistokimyasal yolla İndüklenebilir Nitric Oksit Sentetaz (iNOS) ve terminal dUTP nick end labeling (TUNEL) yöntemi ile apoptozis değerlendirildi. Ek olarak hücrede meydana gelen histopatolojik değişiklikler ışık ve elektron mikroskobu ile değerlendirildi.

Sonuçta; Amifostin verilen gruplarda UW ile perfüze edilen grupta daha fazla olmak üzere 6.saatten başlayarak hepatosit hasarının belirgin olarak azaldığı, elektron mikroskobu ile yapılan incelemede hücre çatısının UW+A grubunda en iyi korunduğu, Amifostin verilmeyen gruplarda ise hücre çatısının nispeten daha çok bozulduğu görüldü.

Bu bulgular ışığında, hepatektomiden 30 dakika önce Amifostin kullanımının, HTK ve UW prezervasyon solüsyonlarının hepatosit koruyucu etkilerini potansiyelize ettiği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Amifostin, İskemi-reperfüzyon hasarı, TUNEL, iNOS

ABSTRACT

In liver transplantation, as in all organ transplantation programs, to reduce ischemia-reperfusion injury during organ preservation, solutions such as Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate (HTK) and University of Wisconsin (UW) were introduced.

Since 1969, amifostin has been used in order to protect the cells from the damaging effect of radiotherapy and chemotherapy. Amifostin's cytoprotective effect has been proved in many clinical trials. In our study we aimed to analyze the additive effect of amifostin to the cytoprotective effect of HTK and UW.

In this study the 48 rats were subclassified into 6 groups. For preservation, we used Ringer's Lactate (RL) in the first group, RL + amifostine in the second group, HTK in the third group, HTK and amifostine in the fourth group, UW in the fifth group and UW + amifostine in the sixth group. Two hundred mg/kg of amifostin was applied subcutaneously 30 minutes before hepatectomy. After perfusion, hepatectomy was applied and the tissue preserved in the same +4°C. At the 0'th, 6'th and the 12'th hours, tissue was obtained from liver and fluid at perfusion fluid respectively. Biochemically Alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and nitric oxide (NO), immunohistochemically Inductible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and via terminal dUTP nick end labeling (TUNEL) method apoptosis were analyzed. Additionally, pathologic changes which have been occurred in the cells were analyzed via light and electron microscope.

As a result, in the groups which amifostine was used hepatocyte damage was dramatically reduced after the sixth hour, especially in the UW perfused group. In the light of electron microscope analyses, the cells architecture was best preserved in UW + amifostine group. The architecture was more impaired in groups which amifostin has not been used.

In the light of these findings, we can say that amifostine is the potent agent when it's used before hepatectomy with preservation solutions.

Keywords: Amifostine, Ischemia-Reperfusion Injury, TUNEL, iNOS

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	III
ÖZET	İV
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	V
İÇİNDEKİLER	VI, VII
TABLolar	VIII
GRAFİKLER	IX
RESİMLER	X
KISALTMALAR	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	
2.1 Karaciğer nakli	2
2.2 İskemiye sekonder gelişen hücre yanıtı	2–4
2.3 İskemi ve Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)	4–5
2.3.1 Nitrik Oksit (NO)	5
2.4 Antioksidan Maddeler	5–6
2.4.1 Amifostin (WR–2721)	6–7
2.5 Organ Prezervasyonu	
2.5.1 Prezervasyon Prensipleri	8
2.5.2 Prezervasyon Hasarı Mekanizması	8
2.5.2.1 Preprezervasyon Hasarı	8
2.5.2.1.1 Karaciğerin Yapısı	8
2.5.2.1.2 Beyin Ölümünün Etkileri	9
2.5.2.1.3 Organ Çıkarılması Sırasında Gelişen Hasar	9
2.5.2.2 Soğuk Prezervasyon Hasarı	9
2.5.2.2.1 Soğukun Etkileri	9–10
2.5.2.2.2 Sinüzoidal Endotelyal Hücre Hasarı	10
2.5.2.3 Sıcak İskemi Hasarı	10–11
2.5.2.4 Reperfüzyon Hasarı	11
2.5.2.4.1 Trombositler	11
2.5.2.4.2 Lökositler	11–12
2.5.2.4.3 Endotelyal Hücre Apoptozisi	12
2.5.2.4.4 Efektör Moleküller	12
2.5.2.4.5 Sitokinler	12
2.5.2.4.6 Proteazlar	12
2.5.3 Günümüzde en sık kullanılan prezervasyon teknikleri	13–14
2.5.3.1 Statik Hipotermik Koruma	13
2.5.3.2 Devamlı Perfüzyon ile Saklama	13
2.5.4 Prezervasyon Solüsyonları	13
2.5.4.1 Histidin-Triptofan-Ketoglutarat (HTK) Solusyonu	14

2.5.4.2 University of Wisconsin (UW) Solusyonu	14
2.5.5. Prezervasyon Solüsyonlarının Kullanımı	14–15
2.5.6. Koruma Süreleri	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM	
3.1 Araştırma Yeri	16
3.2 Araştırma Tipi	17
3.3 Anestezi	17
3.4 Cerrahi Teknik	17
3.5 Deney Tasarımı	17
3.6 Araştırma Grupları	18
3.7 Araştırma Parametreleri	19–21
3.7.1 Patolojik Parametreler	19
3.7.1.1. H&E boyama ile Hepatosit Hasarının Değerlendirilmesi	19
3.7.1.2. İNOS İmmünohistokimyasal Boyama	19–20
3.7.1.3. TUNEL ile Apoptozis Değerlendirme	20
3.7.2. Histolojik Değerlendirme	20–21
3.7.3. Biyokimyasal Parametreler	21
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	21
5. BULGULAR	
5.1 Patoloji Değerlendirme Sonuçları	22–33
5.1.1. TUNEL ile Apoptozisin değerlendirilmesi	22–24
5.1.2. İNOS ile immünohistokimyasal değerlendirme	25–27
5.1.3. Gruplardaki Patolojik Değişiklikler	28–33
5.2 Biyokimyasal İnceleme bulguları	34–43
5.2.1. Nitrik Oksit Düzeyleri	34–36
5.2.2. ALT ve ALP Değerlendirmeleri	37–43
5.3 Histolojik Bulguları değerlendirmesi	43–59
6. TARTIŞMA	60–63
7. YORUM	64
8. KAYNAKLAR	65–73

TABLÖLAR

Tablo–1: DPS yönteminin, SHS yöntemine göre avantajları ve dezavantajları	13
Tablo–2: HTK ve UW solüsyonlarının bazı özelliklerinin karşılaştırılması	15
Tablo–3: HTK ve UW solüsyonlarının içerik olarak karşılaştırılması	16
Tablo–4: TUNEL boyama ile apoptozis saptanan hücrelerin gruplara göre dağılımı	22
Tablo–5: Grupların iNOS grade'lerine göre karşılaştırılması	25
Tablo–6: Tüm gruplarda saatlere göre meydana gelen patolojik değişiklikler	28
Tablo–7: NO ortalamalarına göre gruplar arasındaki dağılım	34
Tablo–8: Tüm grupların saatlere göre ALT ve ALP değerleri	38

GRAFİKLER

Grafik- 1: Geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz hücre hasarının morfolojik etkileri	4
Grafik -2: SOR oluşumu ve antioksidan mekanizmaların çalışma sistemleri	6
Grafik-3: Tüm grupların ortalama apoptotik hücre sayısına göre karşılaştırılması	23
Grafik-4: Amifostin kullanılmayan üç grubun karşılaştırılması	23
Grafik-5: Amifostin kullanılan üç grubun karşılaştırılması.	24
Grafik-6: UW+A ve HTK+A gruplarının iNOS grade'lerinin karşılaştırılması	26
Grafik-7: UW+A ve RL+A gruplarının iNOS grade'lerinin karşılaştırılması	26
Grafik-8: RL+A ve HTK+A gruplarının iNOS grade'lerinin karşılaştırılması	27
Grafik-9: RL ve RL+A gruplarının patolojik değişimlere göre karşılaştırılması	29
Grafik-10: HTK ve HTK+A gruplarının patolojik değişimlere göre karşılaştırılması	29
Grafik-11: UW ve UW+A gruplarının patolojik değişimlere göre karşılaştırılması	30
Grafik-12: HTK+A ve UW+A gruplarının patolojik değişimlere göre karşılaştırılması	30
Grafik-13: RL+A ve UW+A gruplarının patolojik değişimlere göre karşılaştırılması	31
Grafik-14: RL+A ve HTK+A gruplarının patolojik değişimlere göre karşılaştırılması	31
Grafik-15: Gruplar arası NO düzeylerinin karşılaştırılması	35
Grafik-16: UW+A ve RL+A gruplarının kendi içinde grafiksel olarak karşılaştırılması	35
Grafik-17: RL+A ve HTK+A gruplarının karşılaştırılması	36
Grafik-18: HTK+A ve UW+A gruplarının karşılaştırılması	36
Grafik-19: Grupların ALT değerlerine göre karşılaştırılması	39
Grafik-20: HTK+A ve HTK gruplarında zamanla ALT değerlerindeki değişim	39
Grafik-21: UW+A ve UW gruplarında zamanla ALT değerlerindeki değişim	40
Grafik-22: RL+A ve RL gruplarında zamanla ALT değerlerindeki değişim	40
Grafik-23: HTK+A ve UW+A gruplarında zamanla ALT değerlerindeki değişim	41
Grafik-24: Grupların ALP değerlerine göre karşılaştırılması	41
Grafik-25: UW+A ve UW gruplarında zamanla ALP değerlerindeki değişim	42
Grafik-26: HTK+A ve HTK gruplarında zamanla ALP değerlerindeki değişim	42
Grafik-27: RL+A ve RL gruplarında zamanla ALP değerlerindeki değişim	43
Grafik-28: UW+A ve HTK+A gruplarında zamanla ALP değerlerindeki değişim	43

RESİMLER

Resim-1: Sıfırncı saatte TUNEL boyama tekniği ile apoptotik hücre sayımı	24
Resim-2: iNOS ile 6. saatte boyanma görüntüsü. 2x 200 büyütme	27
Resim-3: Balonlaşma	32
Resim-4: Perisantral hidropik değişiklikler	32
Resim-5: Perisantral hidropik değişiklikler Balonlaşma	33
Resim-6: Sinüzoidal dilatasyon	33
Resim-7: Normal sıçan karaciğerinin ince yapısı	44
Resim-8: RL solusyonu grubu elektron mikroskopisi	45
Resim-9: RL grubu elektron mikroskopisi	46
Resim-10: RL+A grubu elektron mikroskopisi	47
Resim-11: RL+A grubu elektron mikroskopisi	48
Resim-12: HTK grubu elektron mikroskopisi	49
Resim-13: HTK grubu elektron mikroskopisi	50
Resim-14: HTK+A grubu elektron mikroskopisi	51
Resim-15: HTK+A grubu elektron mikroskopisi	52
Resim-16: HTK+A grubu elektron mikroskopisi	53
Resim-17: UW grubu elektron mikroskopisi	54
Resim-18: UW grubu elektron mikroskopisi	55
Resim-19: UW grubu elektron mikroskopisi	56
Resim-20: UW+A grubu elektron mikroskopisi	57
Resim-21: UW+A grubu elektron mikroskopisi	58
Resim-22: UW+A grubu elektron mikroskopisi	59

KISALTMALAR

- UW:** Universty of Wisconsin
HTK: Histidin-Triptofan-Ketoglutarat
ATP: Adenozin trifosfat
ADP: Adenosin difosfat
AMP: Adenosin monofosfat
PNF: Primer non-fonksiyon
NAD: Nikotinamid adenin dinükleotit
Na: Sodyum
K: Potasyum
Ca: Kalsiyum
İ/R : İskemi-Reperfüzyon
SOR: Serbest Oksijen Radikalleri
SOD: Süperoksit Dismutaz
NO: Nitrik Oksit
İNOS: İnducible Nitrik Oksit Sentetaz
NADPH: Nikotinamid-adenosin dinükleotid fosfat
KCFT: Karaciğer fonksiyon testi
SEC: Sinüzoidal endotelyal hücre
MMP: Matriks metalloproteinazlar
TNF- α : tümör nekroz faktör- α
TGF: Tümör grovt faktör
ICAM-1: İntrasellüler adezyon molekül
IL: İnterlökin
ALT: Alanin aminotransferaz
ALP: Alkalen Fosfataz
TUNEL: Transferase- mediated d UTP- biotin Nick End Labeling

1.GİRİŞ

Bütün organ nakli programlarında olduğu gibi, karaciğerde de etkili saklama en önemli konudur. Özellikle, nakledilecek organın uzak mesafeler arası transportu esnasında, prezervasyonun en uygun ve olabildiğince uzun süreli yapılabilmesi organ nakli ile uğraşan hekimler için büyük önem taşımaktadır.

Amaç, vericiden alınan organın transplante edilinceye kadar fonksiyonlarının ve hücre bütünlüğünün korunmasını sağlamaktır (1,2). Organ prezervasyonu kadavra kaynaklı organlarda beyin ölümü tanısının konulması, canlı donör kaynaklı organlarda ise donörün ameliyatı esnasında başlar ve alıcıda vasküler anastomozlar tamamlanıp organın fonksiyon görmeye başladığı ana kadar devam eder (3). Organ prezervasyonunda temel amaç;

- 1- Hipoterminin sağlanması,
- 2- Hücresel şişmenin önlenmesi,
- 3- Serbest radikallere bağlı gelişen organ hasarının minimale indirilmesidir.

İskemi ile birlikte mitokondri, nükleus, endoplazmik retikulum, lizozom ve stoplazmik membran gibi organellerde yapısal değişiklikler meydana gelir. Bu değişikliklerin geri dönüşünün olup olmadığının saptanması oldukça güç olmakla birlikte, mitokondri ve hücre zarındaki zedelenmelerin genellikle geri dönüşümsüz olduğu bildirilmektedir.

Transplante karaciğerde primer nonfonksiyon (PNF) gelişimi üzerine en önemli faktör prezervasyon hasarıdır (3,4).

Histidin-triptofan-ketoglutarat (HTK), Wisconsin Üniversitesi solüsyonu (UW) v.b gibi solüsyonlar prezervasyon amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda temel hedef, transplante edilecek organlardaki iskemik hasarı minimale indirmektir. Bu amaçla kullanılan solüsyonların içerisinde iskemik süreci farklı yollardan azaltan değişik antioksidan maddeler bulunur.

Amifostin; serbest oksijen radikallerini ve DNA hasarına yol açan reaktif nükleofilleri toplayarak yok etme özelliğine sahip, antioksidan ve hücre koruyucu bir maddedir. Amifostin ile yapılan çalışmaların çoğunda, kemo-radyoterapi öncesi kullanıldığında hücre koruyucu olduğu, deneysel çalışmalarda ise hepatoprotektif etkisi olduğu saptanmıştır (5–8). Literatür taraması yapıldığında, amifostinin solid organ transplantasyonunda veya prezervasyon solüsyonları ile birlikte kullanıldığına dair bir çalışmaya rastlamadık.

Bu çalışmada; UW ve HTK'nın prezervasyon etkisine, sitoprotektif bir ajan olan Amifostin'in katkısı analiz edildi.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer transplantasyonu

Karaciğer transplantasyonu ile ilgili ilk çalışmalar Welch tarafından köpekler üzerinde yapılmış ve ardından, 1963 yılında T.Starzl tarafından insanda ilk karaciğer nakli gerçekleştirilmiştir. Fakat başarılı sonuçların alınabilmesi ancak cyclosporin gibi immünsupresif ajanların kullanıma girmesiyle sağlanabilmiştir. Ülkemizde ilk kadavradan ortotopik karaciğer transplantasyonu 1988 yılında, Prof.Dr. M.Haberal tarafından yapılmıştır (1). Günümüzde kronik karaciğer hastalığı başta olmak üzere, akut karaciğer yetmezliği, karaciğer tümörleri, metabolik karaciğer hastalıkları ve bazı parazitik hastalıkların tedavisinde karaciğer transplantasyonu etkin bir tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır. Transplantasyon endikasyonları belirlenirken çeşitli prognostik sistemlerden yararlanılır (9,10).

2.2. İskemiye sekonder gelişen hücre yanıtı

İskemi, organı veya dokuyu perfüze eden kan akımındaki yetersizliğe bağlı olarak, geriye dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre zedelenmesine neden olmaktadır. İskemi sonrasında hücrelerde pek çok metabolik ve yapısal değişiklikler oluşmaktadır. Bunlardan biri, iskeminin hücrede oksidatif fosforilasyonu bozarak, hücre içi adenosin trifosfat (ATP) sentezinde azalmaya yol açmasıdır. Bu durum ise, hücre membranının ATP'ye bağımlı iyonik pompa fonksiyonunu bozarak hücreye daha fazla kalsiyum, sodyum ve su girmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu değişimin sonuçları:

1. Hücrenin iyon dengesini koruyan Na-K ATP'az ve Ca-Mg ATP'az enzimlerinin çok yavaşlamasına neden olur. Sodyum, Ca^{++} , H_2O ve Cl^- hücre içine girerken, K^+ ve Mg^{++} hücre dışına çıkar. Sonuçta hücre şişmeye başlar ve membrano-litik bir enzim olan fosfolipaz A enzimi aktive olur.
2. Anaerobik glikolizin artışına bağlı olarak hücre içi laktat düzeyi artar ve hücre içi pH düzeyi düşer. Bu durumda, lizozomal membranların dayanıklılığı azalır ve litik enzimler sitoplazmaya boşalarak yıkıma neden olur. Bu enzimler, taşıyıcı protein

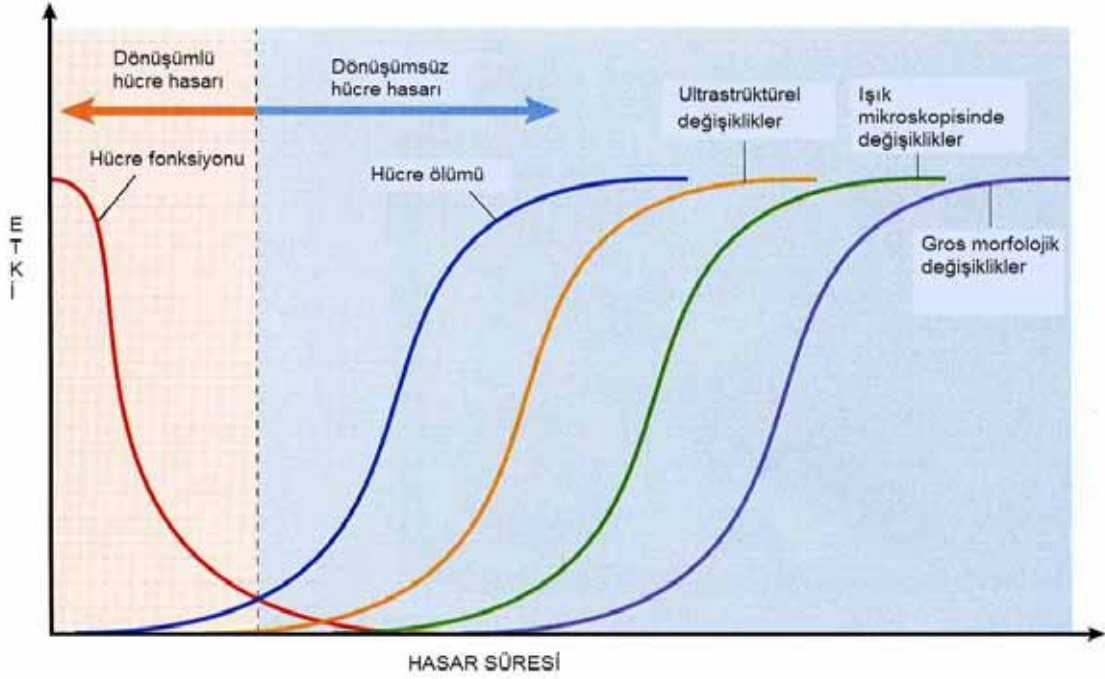
olan transferin ve ferritinin bakır ve demirden ayrışmasına sebep olur. Demir ise, reperfüzyon sonrasında serbest radikallere bağlı hasarda rol alır.



İskemi döneminde, ATP'nin fazla oranda katabolize olması sonucu hücrede hipoksantin miktarı artmaktadır. Normalde ksantin oksidoredüktaz enzimi, hipoksantin, ksantine ve daha sonra ürik aside dönüşümünü katalizler. Ksantin oksidoredüktaz, normal şartlarda dehidrogenaz formundadır ve enzimatik aktivitesinde, kofaktör olarak okside nikotinamid adenin dinükleotit (NAD⁺) yer alır. Hipoksik koşullarda, enzimin dehidrogenaz formu oksidaz formuna dönüşmektedir. Enzimin oksidaz formu, aktivitesi sırasında elektron alıcısı olarak NAD⁺ yerine moleküler oksijeni kullanmakta, bunun sonucu olarak da süperoksit anyon radikali ve hidrojen peroksit üretimine yol açmaktadır (11–13). Bu enzimatik değişim, “serbest oksijen radikallerine (SOR) bağlı reperfüzyon hasarı” hipotezinin temelidir. Bu safhada oluşan SOR'leri hücre membran lipidlerinde peroksidasyonlara yol açarak, başta malondialdehit olmak üzere birçok sitotoksik ürün oluşumuna neden olur.

İskemi/Reperfüzyon hasarının, hipotermik koşullarda (+4°C) normotermik koşullara göre daha az olduğu bilinmektedir. Hipotermi, transplantasyonda organ saklanması için gerekli olmakla birlikte, reperfüzyon sırasında ortaya çıkan ve organ için zararlı olan oksidatif stres, sodyum pompası inaktivasyonu, hücre içi kalsiyum birikmesi ve ortama demir iyonu salınması gibi olayları yeterince engelleyememektedir. Bu nedenlerle, yeni koruma solusyonları geliştirme arzusu gün geçtikçe artmaktadır.

Hücrede gelişen hasar, patolojik olarak elektron mikroskopunda ışık mikroskopuna göre daha erken saptanabilir. Örneğin, miyokard hücresinin öldüğü, elektron mikroskobu ile 2–3 saatte belli olurken, ışık mikroskobu ile ancak 6–12 saatte görülebilir (Grafik–1).



Grafik-1: Geridönüşümlü ve geridönüşümsüz hücre hasarının morfolojik etkileri. Ultrastrüktürel değişimlerin (elektron mikroskopik) ışık mikroskopisine göre daha erken başladığı görülmektedir (Robbins Basic pathology 7'th edition'dan alınmıştır).

2.3. İskemi ve Serbest Oksijen Radikalleri

Moleküler oksijenin, hücre içinde oksidatif enzimler tarafından indirgenmesi ile SOR'leri oluşur. SOR'leri, yörüngelerinde çift olmayan elektronları bulunduran kararsız moleküllerdir. Kimyasal olarak unstabildirler ve hızla reaksiyona girerler. Nükleik asit ve membran lipidlerinin yıkılmasına sebep olurlar. Yine serbest radikalle reaksiyona giren hücre içi moleküller de, kararsız bileşik haline dönüp zedelenmeye sebep olurlar. En önemli serbest oksijen radikalleri, süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil iyonlar(OH) ve nitrik oksit (NO)'tir. Süperoksit radikali, normal hücre metabolizmasında, mitokondrial, endoplazmik retikülüm ve nükleer membran elektron transport işlemleri sırasında oluşan bir ara üründür. İskemik koşullarda ise, hipoksantin ve ksantin katabolizması sırasında ksantin oksidaz enziminin katalize ettiği bir reaksiyonla oluşur (11,14). Süperoksit radikalinden, süperoksit dismutaz (SOD) enziminin katalizlediği reaksiyonla H_2O_2 oluşur. Hidrojen peroksit, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin katalize ettiği reaksiyon ile, H_2O ve CO_2 'e dönüştürerek inaktive edilir. SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz, serbest oksijen radikallerine karşı organizmanın en önemli savunma elemanlarıdır. SOR aracılığıyla oluşan lipid peroksidasyonu, stoplazmik membranda hasar

ve geçirgenlik artışına yol açarak hücre içinde aşırı kalsiyum birikmesine yol açar. Oluşan hücre membran disfonksiyonu da, hücre şişmesi ve hücre ölümü ile sonuçlanır (15,16).

2.3.1 Nitrik Oksit (NO)

Yarılma ömrü kısa olan ve salındığı hücrenin çevresinde etki gösteren bir gazdır. Esas olarak, enfeksiyonlar ve tümöral oluşumlara karşı vücudun kullandığı bir savunma elemanıdır. NO, genel olarak vazodilatasyon, trombosit adezyon ve agregasyonuna neden olur ve makrofajlar tarafından salınarak mikroorganizmaların elimine edilmesinde rol alır.

NO, nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin katalizlediği enzimatik bir süreç sonucu L-argininden oluşur. Hızla yıkılır ve spontan bir reaksiyonla nitrit ve nitrate dönüşür. Kofaktörleri; kalmadulin, kalsiyum ve NADPH'tır. NOS'ın üç formu var.

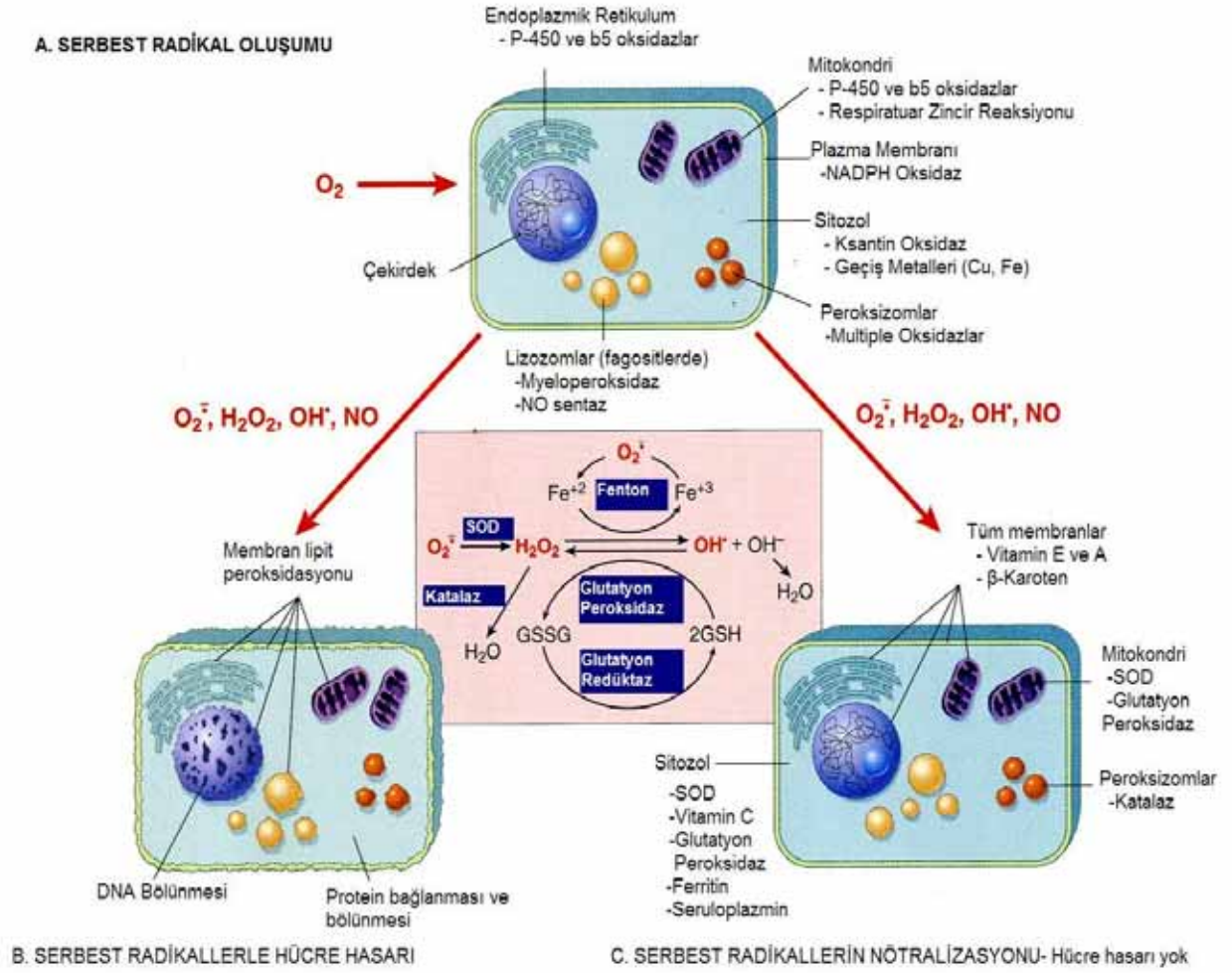
Tip I (ncNOS) : Nöral dokuda bulunur. Aktivitesi Ca^{++} bağımlıdır.

Tip II (iNOS) : Hepatosit, kardiyak miyosit gibi pek çok hücrede bulunan tiptir. Aktivitesi Ca^{++} bağımlı değildir. Pekçok inflamatuvar olayda, travmada ve iskemide iNOS indüklenmektedir. Bu durumda NO, radikallerle etkileşime girerek peroksinitrit oluşumuna sebep olur. Bu aşamadan sonra hücreye yapısal hasarlar vermeye başlar. Bu durum patolojik olarak iNOS antikoru ile yapılan immunhistokimya boyama ile gösterilebilir.

Tip III (eNOS) : Primer olarak endotelden salgılanan tiptir. Aktivitesi Ca^{++} bağımlıdır. Bu formu, kanda düşük konsantrasyonlarda seyrederek ve mikrosirkülasyonun devamı için gereklidir (17,18).

2.4. Antioksidan Maddeler

Hücreyi serbest radikallere karşı koruyan ve onları nötralize eden maddelerdir. Prezervasyon hasarı sürecinde gelişen hücre içi serbest radikalleri, bu maddeler ile ortadan kaldırılabilir. Bunların çoğu endojen kaynaklı iken, bir kısmı ekzojen kaynaklıdır. En sık üzerinde çalışılan antioksidanlar: triptofan, histidin, glisin, transferin, ferritin, laktoferrin, seruloplazmin, askorbik asit, E vitamini, A vitamini, çinko, selenyum, manganez asetilsistein-karbosistein, alfa glutatyon-s-transferaz, allopurinol, glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutazdır (19,20) (Grafik-2).



Grafik-2: SOR oluşumu ve antioksidan mekanizmaların çalışma sistemleri (Robbins Basic Pathology 7'th edition'dan alınmıştır).

2.4.1 Amifostin (WR-2721)

Amifostin (Ethyol®, Medimmune Pharma B.V.Netherland) 214 kdalton ağırlığında bir inorganik tiofosfat bileşiğidir. WR-2721 bir pro ilaçtır. Dokuda, hücre membranına bağlı alkalen fosfataz enzimi ile defosforile olarak, hücre membranından hücre içine alınır. Bu sırada aktif metaboliti olan, WR-1065'e (etantiol) dönüşür. WR-1065 ise hücre içinde disülfid molekülü olan WR-33278'e okside olur (21,22).

WR-1065 serbest thioldür. Hücre içinde organelin membran stabilizasyonunu sağlar ve sitotoksik ajanlara karşı hücreyi korur. Esas olarak, iyonize radyasyon, antasiklinler ve bleomisin gibi ajanların oluşturduğu serbest oksijen radikallerini temizler. Yani antioksidan ve sitoprotektif özelliklere sahiptir (21).

Amifostin subkütan verildikten 1 dakika sonra plazmada maksimum düzeye ulaşır. Uygulamadan 6 dakika sonra plazmada < %5'i bulunur. Aynı anda yapılan idrar incelemelerinde çok az bir kısmı idrarla atılır. Bu da, ilacın % 90'dan fazlasının hücre içine geçtiğini göstermektedir (21–23).

Aktif serbest thiol olan WR-1065'in, hücre içerisindeki sitoprotektif etki mekanizması, önce iskemi reperfüzyon hasarı sonrası oluşan serbest oksijen radikallerini ve DNA hasarına yol açan reaktif nükleofilleri toplayıp, sonra hasarlı hedef moleküllere H⁺ iyonu vermek suretiyle onları yok etmek şeklindedir.

Sağlıklı hücre membranında ve normal kapiller endotelinde, alkalen fosfataz aktivitesi oldukça yüksek iken, kanser hücrelerinde ve yeni oluşmuş damar endotelinde alkalen fosfataz aktivitesi düşüktür. Bu nedenle, amifostin selektif olarak normal hücreleri korurken, kanser hücrelerine etki etmez. Yapılan birçok prelinik çalışmalarda, amifostinin seçici olarak normal dokuyu koruduğu gösterilmiştir. Bu nedenle ilaç, klinikte radyoterapi ve kemoterapinin zararlı etkilerine karşı, normal hücreleri korumak amacıyla kullanılmaktadır (5,23–25).

Diğer birçok antioksidan ajanda olduğu gibi, bu ajanında thiol olması antioksidan etkinliğinin temelini oluşturur. Hücre içi serbest tioller oksidatif stresi azaltırlar, bu şekilde apoptozis oluşumunu ve DNA hasarını minimize ederler. Bu özelliği, TUNEL (Transferase- mediated UTP- biotin Nick End Labeling) testi ile gösterilebilir (26–28).

Amifostin ile yapılan klinik çalışmalarda, ilaç radyoterapiden 30 dakika önce intravenöz olarak verilmektedir. Hayvan deneylerinde, ratlar için önerilen doz, 200 mg/kg subkütandır. İntravenöz ve subkütan verildiğinde ortaya çıkan etkinlik aynıdır (29).

Subkütan uygulamada, sitoprotektif etkisi 8 saatten daha fazla sürerken, aynı doz i.v. verildiğinde ise en fazla 4 saat sürer. Kolay uygulanabilir olması, hipotansiyon gibi yan etkisinin olmaması ve koruyucu etki süresinin uzun olması nedenleri ile subkütan uygulama daha çok tercih edilir.

Amifostinin en belirgin yan etkisi hipotansiyondur. Bu nedenle, subkütan uygulama daha iyi tolere edilmektedir. Bulantı, kusma, sıcaklık hissi, baş dönmesi ve somnolens diğer yan etkileridir. Hıçkırık, hipokalsemi ve allerjik reaksiyon, çok nadir de olsa rapor edilmiştir (22,29).

2.5. Organ Prezervasyonu

2.5.1. Prezervasyon Prensipleri

Organ prezervasyonu; kalp, karaciğer, böbrek, kornea, pankreas ve ince barsak transplantasyonunun tamamında en önemli basamağı oluşturmaktadır. Prezervasyon ile ilgili gelişmelerin temeli, 1950–1960 yılları arasında atılmıştır. Dolaşım olmadan 0–4 °C arasındaki sıcaklıklarda, hücrelerin işlevlerini normal vucut ısısına göre 10 kat daha fazla koruyabildiği görüşü, bu olayın ana temasını oluşturmuştur. Bu konuda ilk çalışmalar 1968 yılında Bezler (1) ve 1969 yılında Collins (1,2) tarafından başlatılmıştır.

Organ kanlanmasının kesilmesi yoluyla gelişen iskemik süreçte eğer metabolizma yavaşlatılabilirse, gelişecek olan hücre hasarı da doğru orantılı olarak yavaşlayacaktır. Hücre metabolizmasının yavaşlatılmasında temel faktör hipotermidir. Organ ısısındaki her 10°C'lik düşüş ile metabolizmanın 1,5–2,5 kat düştüğü ve dolayısıyla 37°C' den 0°C'ye kadar yaklaşık on kat kadar yavaşladığı gösterilmiştir (30). Bu yararlı etkilerinin yanında, ATP pompa aktivitesinin bozulmasına da neden olmaktadır. Bunun sonucunda, Na⁺ hücre içine geçerken, K⁺ hücre dışına çıkar ve hücre içinde onkotik basınç artar, hücre içine su çekilir, hücre şişer ve hücre ölümü meydana gelir (23, 30).

2.5.2. Prezervasyon Hasarı Mekanizması

2.5.2.1. Preprezervasyon Hasarı

Preprezervasyon hasarı, organda daha önce mevcut olan hasar, yani prezervasyon solüsyon infüzyonu yapılmadan önce gelişmiş olan hasarlardır. Bu hasarın üç adet potansiyel kaynağı vardır.

2.5.2.1.1. Karaciğerin Yapısı

En çok görülen nedenleri, obesiteye bağlı steatoz, alkol veya ilaç kullanımına bağlı hepatitin yol açtığı hasarlardır. Steatoz, hepatositlerde ve sinüzoidal hücrelerde soğuk prezervasyon hasarını artırır. İlaç veya çok miktarda alkol kullanımı ölüm nedeni olabilir. Bu nedenlerle potansiyel toksik karaciğer hasarı göz önünde bulundurulmalıdır. Potansiyel donörleri değerlendirirken, hikâye, fizik muayene, ilaç toksisite testleri, karaciğer fonksiyon testleri (KCFT) ve karaciğer biyopsisi, daha önceden var olabilecek, olası bir karaciğer hasarını elimine etmek için kullanılır (31,32).

2.5.2.1.2. Beyin Ölümünün Etkileri

Beyin ölümüne neden olan travma, genellikle hipotansiyon ve hipoksiye neden olur. Özellikle, uzun süre yoğun bakım ünitelerinde yatmış olan potansiyel donörler, hepatik glukojenasyon ve diğer negatif nutrisyonel etkilere maruz kalmış olabilirler. Glikojen depoları tükenen karaciğer dokusunun ise sıcak iskemiye olan toleransı azalır (33).

2.5.2.1.3. Organ Çıkarılması Sırasında Gelişen Hasar

Ameliyat süresince gelişen hasarın en önemli nedeni hipotansiyondur. Organları kabul edilen donörlerin üçte birinde, organ çıkarılması sırasında alınan karaciğer biyopsilerinde sinüzoidal endotelial hücrelere yapışmış trombositlerin neden olduğu preprezervasyon hasarı görülür. Bu tip hasarın derecesiyle, implantasyon sonrası gelişen organ disfonksiyonu arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (33,34).

2.5.2.2. Soğuk Prezervasyon Hasarı

Soğuk prezervasyon, organ korunması için standart metoddur. Karaciğerde metabolik aktiviteyi azaltabilmek için solüsyonun ısısı 0–4°C arasında tutulur, böylece organın enerji ihtiyacı azalmış olur. Sıcaklıktaki her 10°C'lik azalma ile metabolik aktivite 1,5- 2,5 kat azalır. Sıcaklığın enzimatik aktiviteye etkisi ise değişkendir. Örneğin, Na-K ATP-az ve Ca-ATP-az enzimleri 20 °C'nin altında tamamen inhibe olurlarken, bazı proteazlar 1°C'de bile fonksiyonlarını sürdürebilirler (35).

2.5.2.2.1. Soğukun Etkileri

Metabolik ihtiyacı azaltmak için organ soğutulur. Metabolizma yavaşlar, ancak durdurulamaz ve ATP yıkılmaya devam eder. Anaerobik glikolizde ATP üretimi olsa da, ATP kullanımı, üretimini aşar ve sonuçta ATP tükenir. Normalde ATP, ADP ve AMP'den oluşur ama bunu yapabilecek yeterli enerji olmadığı için, ADP ve AMP hücreyi terk ederek adenezine yıkılır. Bu yıkılma evrelerinde ksantin ve hipoksantin üretilir. Ksantin oksidaz enzimi, hipoksik soğuk prezervasyonda aktive olur. Ksantin ve hipoksantin, ksantin oksidaz varlığında oksijenle birleşir ve SOR'nin oluşmasına neden olurlar, bu radikaller ise hücre membranına toksiktir (36).

20°C'nin altındaki sıcaklık, Na-K ATP-az pompasının fonksiyon kaybına neden olur. Bu enzimin aktivitesinin bozulması ile hücre içinde düşük, ekstrasellüler sıvıda ise yüksek K⁺ konsantrasyonu oluşur. Na⁺ için ise tersi bir durum söz konusudur. Pompa

elektrokimyasal bir gradient oluşturur ve hücre içi, hücre dışına göre negatif hale geçer. Pompanın kaybıyla, hücre membranı boyunca Na-K dengesi bozulur ve gradient kaybolur. Prezervasyon solüsyonlarının içeriği, bu istenmeyen etkileri engellemek üzere düzenlenmeye çalışılmıştır (1, 36,37).

2.5.2.2.2. Sinüzoidal Endotelyal Hücre Hasarı

Birbirinden bağımsız yapılan laboratuvar çalışmalarında, karaciğerin hepatosit dışında kalan hücrelerinin, prezervasyon ve perfüzyon hasarına duyarlı olduğu gösterilmiştir (37). Yapılan bir çalışmada, spesifik olarak sinüzoidal endotelyal hücreler incelenmiş ve prezervasyon sonrası karaciğer hasarının, temelde sinüzoidal endotelyal hücre hasarına bağlı olduğuna dair ikna edici kanıtlar elde edilmiştir (37). Yapılan çalışmalarda, sinüzoidal endotelyal hücrelerde gelişen hasarın önemli nedenlerinden birinin proteazlar olduğu da gösterilmiştir. Bu etkiyi gösteren proteazlar arasında, kalsiyum bağımlı intrasellüler bir enzim olan calpain ve matriks metalloproteinazları (MMP-2 ve MMP-9) sayılabilir (38,39). Soğuk, Ca-ATP az'ı da inhibe ederek intrasellüler kalsiyum seviyesini ve buna bağlı calpain aktivitesini artırır. Bu da sonuçta, aktin stres fiberlerinin parçalanmasına neden olur. Aktin stres fiberlerinin parçalanması ise, sinüzoidal endotelyal hücrelerden MMP salgılanması ile sonlanır. MMP sekresyonu ve aktin parçalanması, hücre yüzeyini aktive ederler ve bunun kanıtı da, artmış Von Willebrand faktör (vWF) ekspresyonu ve SEC hücre yüzeylerine trombosit adezyonunun artmasıdır (37,40). Soğuğun neden olduğu sinüzoidal endotelyal hücre hasarı, zaman içinde dolaşımdaki normal trombosit ve lökositler için reseptör eksprese eden ve koagülasyonu başlatabilen hücrelerin oluşmasına neden olur. MMP sekresyonunun, sinüzoidal endotelyal hücre aktivasyon mekanizmasında ve soğuk prezervasyon hasarında ana rol üstlendiği görülmüştür (41-43). Bu nedenlerle, prezervasyon için kullanılan UW ve HTK solüsyonlarında laktobiyonat ve histidin gibi güçlü birer MMP inhibitörü kullanılmıştır.

2.5.2.3. Sıcak  skemi Hasarı

Donör karaciğerinin ameliyat sahasına getirilmesi ile başlar ve anastomozlar tamamlanana kadar devam eder. Bu dönemde karaciğer tedrici olarak ısınır ve yeterince perfüze olamaz, yaklaşık 40 dakika sonra karaciğerinin merkez sıcaklığı 2 C'den 20 C'ye kadar çıkar. Beraberinde enzim aktivitesi ve metabolik hız artar, geriye kalan glikojen depoları da hızlı bir şekilde t kutilir. Bu sıcaklıklar SEC'ten daha çok hepatositlere

zararlıdır. Sıcak iskeminin çok uzun sürmesi, tek başına organ yetmezliğine neden olabilir (44).

2.5.2.4. Reperfüzyon Hasarı

Herhangi bir tip iskemi sonrası reperfüzyon, karaciğer hasarına neden olur. Hasar, normalde inaktif halde olan lökosit ve trombositlerin aktive olarak endotelyuma yapışmasına ve enflamatuar mediatörlerin yayılımına bağlıdır. Metabolik olayların yavaş ilerlediği soğuk depolama periyodunun tersine, reperfüzyon periyodundaki olaylar saniyeler ve dakikalar içinde gelişir. Soğuk prezervasyonun uzadığı durumlarda, yaygın trombosit ve beyaz küre adezyonu ve intravasküler tromboz meydana gelir (45).

Alıcıya bağlı faktörlerde, reperfüzyon periyodunun sonucunu etkiler. Örneğin alıcı hipotansif ise, greft reperfüzyonu sırasında diğer organların yanı sıra greftte de sıkıntı yaşanma riski artar. Sistemik inflammatuar yanıt sendromuna bağlı olarak alıcı kanında aktive trombosit, lökosit ve artmış enflamatuar mediatörlerin varlığı da hasarı artıran faktörlerdir. Deneysel çalışmalarda, portal venin uzun süre klemplenmesine bağlı olarak barsaklardan endotoksin salınımı olduğu, bunun sonucunda kupffer hücrelerinin aktive olarak tümör nekroz faktör- α (TNF- α) salgıladığı ve sistemik şok benzeri bir tablo olduğu gösterilmiştir (43).

2.5.2.4.1. Trombositler

Endotelial duvarın aktivasyonu, trombosit adezyon ve aktivasyonuna neden olur. Mekanizma büyük ihtimalle sinüzoidal hücrelerde artmış vWF ekspresyonuna bağlıdır. Aktive olmayan trombositler vWF'e yapışarak endotel hücrelere fikse olur ve aktive hale geçerler (46). Trombositler, TGF, kalpainler ve diğer toksik metabolitlerin kaynağıdır. Trombositlerce nitrik oksit üretimi, SOR ve reoksijene olmuş iskemik karaciğerde peroksinitrit oluşmasına neden olur. Bu da endotel hücrelerinin apoptozisini başlatır (47–49).

2.5.2.4.2. Lökositler

Reperfüzyon sonrası lökositler hızlı bir şekilde sinüzoidlere yapışır ve hasara neden olur. Adezyon, artmış ICAM-1'e bağlı olarak gelişir. Lökositler hücre membranında, NADPH bağımlı oksidaz sistemi ile reaktif oksijen radikali salgılar. Reperfüzyon başladığında ise, aktive olan kupffer hücrelerinden TNF- α ve IL-1 salınır, buna bağlı olarak lökositlerde CD11-b ekspresyonunu artırır ve sinüzoidlerde lökositlerin toplanması

sağlanır. Yapılan çalışmalarda, lökositlerin ve trombositlerin sinerjistik olarak SEC apoptozisini indüklediği ve SEC hasarını artırdığı gösterilmiştir (50–52).

2.5.2.4.3. Endotelial Hücre Apoptozisi

Sinüzoidal endotelial hücre ölümünün mekanizmasının nekroz mu, yoksa apoptozis mi olduğu hala tartışmalıdır. Geçmişte reperfüzyon sonrası endotel hücre ölümünün koagülasyon nekrozuna bağlı geliştiği kabul edilirken, günümüzde apoptozis aracılıklı hücre ölümü daha yaygın olarak kabul edilmektedir. Hepatik prezervasyon ve perfüzyon hasarında apoptozisin önemi, prezervasyon solüsyonuna antiapoptotik ajanların eklenmesi ile sağlanan protektif etkiler ile anlaşılmıştır (49,53).

2.5.2.4.4. Efektör Moleküller

Reperfüzyon hasarında SOR oluşumunun ana kaynağı kupffer hücreleridir. Deneysel çalışmalar, SOR'un soğukta prezerve edilmiş fare karaciğerinin reperfüzyonundan sonra endotelial hücrelerden TNF- α ve IL-10 sekresyonunu artırdığını göstermiştir. Bu sitokinler hasarın önemli mediatörleridir (54).

2.5.2.4.5. Sitokinler

Sitokinler, karaciğer hücreleri tarafından, en çok kupffer ve SEC'lerden üretilir. En önemlileri TNF- α , IL-1 ve IL-6'dır. Colletti ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, uzamış iskemik dönemlerin sitokinlerin aşırı salınımına neden olduğu gösterilmiş ve TNF- α 'nın hepatosit ve SEC apoptozisini başlattığı görülmüştür. Kupffer hücrelerinden TNF- α salınımının engellenmesi ile soğuk ve sıcak iskemik modellerinde reperfüzyon hasarının azaldığı gösterilmiştir (55).

2.5.2.4.6. Proteazlar

Kalpein ve kaspas gibi birçok sistin proteazlarının, prezervasyon ve perfüzyon hasarına mediatörlük yaptığı gösterilmiştir. Kalpeinler, sitoplazmik non-lizozomal kalsiyum bağımlı sistin proteazlarıdır. Kalpein aktivitesi soğuk iskemide ve reperfüzyon sonrası belirgin bir şekilde hızla artar. Soğuk ve sıcak iskemik hasarda kalpein inhibisyonunun koruyucu etkisi gösterilmiştir. Kalpein inhibisyonu, hem endotel hücrelerde, hem de hepatositlerde doku hasarını azaltır ve sonunda greft fonksiyonu belirgin olarak korunur. Birçok soğuk ve sıcak iskemik modelinde, hepatik iskemik ve reperfüzyon sırasında kaspas inhibisyonunun koruyucu etkisi gösterilmiştir (56).

2.5.3 Günümüzde En Sık Kullanılan Prezervasyon Teknikleri

2.5.3.1. Statik Hipotermik Koruma

Organ çıkarıldıktan sonra soğuk prezervasyon solüsyonu ile perfüze edilir. Perfüzat solüsyonu ile birlikte steril bir torbaya konulup 0–4°C arasında saklanır (57,58).

2.5.3.2. Devamlı Perfüzyon ile Saklama

Belzer ve arkadaşları tarafından özellikle böbrek prezervasyonunda kullanılmıştır. Özel bir cihazla organa oksijen ve besin maddeleri verilir ve oluşan artıklar uzaklaştırılır (57,59).

ÖZELLİKLER	SHS	DPS
Besleyici Faktörler (O ₂ , vs)	(+)	(+)
Metabolitlerin Uzaklaştırılması	(-)	(+)
Kanın Uzaklaştırılması	Yetersiz	Yeterli
Hücre Hasarının Saptanabilmesi	Mümkün Değil	Mümkün
Greft Disfonksiyonu	Fazla	Az
Prezervasyon Süresi	Az	Fazla
Diğer Merkezlere Nakil	Kolay	Zor
Deneyimli Personel	Gerektirmez	Gerektirir
Cihaz Arızası Olasılığı	(-)	(+)
Maliyet	Ucuz	Pahalı

Tablo–1: Devamlı prezervasyon ile saklama (DPS) yönteminin, Statik hipotermik saklama (SHS) yöntemine göre avantaj ve dezavantajları

2.5.4. Prezervasyon Solüsyonları

Son çeyrek asırda, özellikle A.B.D’de olmak üzere 160–170 değişik 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 çalışmalar yapılan sıvılar, HTK ve UW solüsyonlarıdır (1, 2, 60).

2.5.4.1 HTK Solüsyonu

HTK solusyonu (CUSTODİOL®, Odyssey Pharmaceutical Hanover-Germany); 1980’li yıllarda kardiopleji için geliştirilmiştir. Bu sıvıda, mannitol ve histidin hem antioksidan hem de osmotik etki yaratırlar. Ketoglutarat ve triptofan ise membranoprotektif etkili olup, ketoglutarat aynı zamanda oksijensiz kalan hücrede kreps döngüsünün substratı olarak işlev görür.

K^+ ve Na^{++} değerlerinin düşük olması nedeniyle, ilk olarak kalp transplantasyonunda kullanımı yaygınlaşmıştır. Daha hızlı soğutma yapar, 3 kat daha yüksek akım hızına sahiptir. Vizkozitesi düşük (2,0 cp) olduğu için yüksek hacimde ve düşük akım hızında kullanılır (10–12 lt ve 100–175 ml/kg civarında). UW ile kıyaslandığında, maliyeti daha düşük olup flushing tarzı kullanımda hiperpotasemi riski yoktur (61,62). Karaciğer prezervasyonunda UW kadar etkin olduğu, yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (63–65).

HTK solüsyonu genel olarak, lökosit adhezyonunu düşürür, kapiller permeabiliteyi azaltır, doku oksijenizasyonunu artırır, ATP tüketimini azaltır ve LDH düzeyini arttırır.

2.5.4.2. UW Solüsyonu

UW solusyonu (ViaSpan Belzer ® , DuPont Pharmaceutical-İrland); Belzer ve arkadaşlarının Wisconsin Üniversitesinde geliştirdiği bir solusyondur. Serbest radikal önleyici ve ksantin oksidaz inhibitörü olarak, glutatyon ve allopurinol eklenmiştir (66,67) Laktobiyonatin ve glutatyonun güçlü birer MMP inhibitörü olduğu da gösterilmiştir (68, 69). İçinde ATP gereksinimi için adenosin, interstisyel ödemi önleyici Hidroksi-etil-starch ve pH stabilizasyonu için fosfat iyonu bulunur. Hücre içi ile aynı oranda elektrolit taşıdığı için kardiotoksiktir ve flushing tarzında kullanımı hiperkalemi riski taşır (70).

UW, HTK ile kıyaslandığında, vizkozitesi yüksektir, endotel koruyucu özelliği fazla olmakla beraber, iskemik biliyer komplikasyon oranının da daha fazla olduğu saptanmıştır. Ek olarak, UW hepatik arter rezistansını ve alyuvar agregasyonunu arttırır.

2.5.5. Prezervasyon Solüsyonlarının Kullanımı

Organ prezervasyon tekniklerinin temelinde organı kansız hale getirme ve hipotermi sağlama ön plandadır. Kadavradan kaynaklı organlarda ameliyat sırasında, canlı donör organlarda organın çıkarılması ile bu işlemler başlar. Karaciğer, primer olarak UW solüsyonu ile korunur, UW ile 24 saate kadar güvenli prezervasyon sağlanır. Son

zamanlarda, HTK’ında UW kadar etkin olduğu gösterilmiştir. Prezervasyonda sağlanan gelişmelere rağmen greft disfonksiyon oranı hala %5 ile %20 arasında değişir (71).

PNF’nin 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.

2.5.6. Koruma Süreleri:

Organların organizmadan çıkarılması ile birlikte gelişen hücre hasarı ve sonucunda hücre ölümünü önlemek için organların organizmadaki ortamına benzer yapay bir ortam hazırlamak ideal korumanın temelidir. Fakat bu ortamın aynısını oluşturmak için yeni bir organizma yaratmak gerekir ki, bu da mümkün değildir. Bu nedenle, şu ana kadar yaratılan benzer ortamlarda hücre hasarı ve belli bir süre sonra da hücre ölümü gerçekleşmesi önlenememektedir (72). Hücre hasarı ve ölümünün maksimum süreleri her organ için 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.

Tablo-2: HTK ve UW solüsyonlarının bazı özelliklerinin karşılaştırılması		
	HTK (CUSTODIOL)	UW (VIASPAN)
İçerik	K ⁺ düzeyi düşük	K ⁺ düzeyi yüksek
Vizkozite	2.0 cp -düşük-	6.2 cp-yüksek-
Hacim	10–12 lt --100–175 ml/kg	6–8 lt- 50–80 ml/kg
Akışkanlık	3 kat daha yüksek	Düşük
Soğutma	Hızlı	Yavaş
Yan etki	Yok	Kardiyak arrest
Maliyet	1500–1800 dolar	1900–2600 dolar
Flushing	Yok	Var

Tablo-3: HTK ve UW solüsyonlarının içerik olarak karşılaştırılması			
İÇERİKLER	UW	HTK	FONKSİYONLARI
Osmolarite (mosm/L)	320	310	
Sodyum (mmol/L)	40	15	
Potasyum (mmol/L)	120	10	
Magnezyum (mmol/L)	5	4	Membran stabilizatörü
Kalsiyum (mmol/L)	-	0.015	
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	-	Ksantin oksidaz inhibitörü, radikal temizleyici
Histidin (mmol/L)	-	198	Antioksidan
Triptofan (mmol/L)	-	2	Membranoprotektif etki
Ketoglutarat (mmol/L)	-	1	Membranoprotektif etki
Starch(g/L)	50	-	İnterisyel ödemi azaltır+kolloid
Mannitol (mmol/L)		30	Antiödem, antioksidan
pH	7,2-7,4	7.2	

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Yeri ve Ortamı

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Araştırma Ünitesinde yapılmıştır. Çalışmada, ortalama ağırlıkları 300–350 gr olan 48 adet Sprague Dawley ırkı, erişkin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar, Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Üretim Ünitesi'nden sağlandı. Hayvanlar, optimum laboratuvar koşullarında, (20±2°C oda sıcaklığı, %50±10 nemli ortam, 12 saatlik aydınlık / karanlık periyodu) polikarbon kafeslerde (Ehret, Almanya ve Techniplast, İtalya) tutulup, standart kuru peletler halindeki sıçan yemi (Purina®) ile beslendi.

3.2 Araştırma Tipi

Deney protokolü, Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı sonrasında Araştırma Kurulu tarafından DA 07/45 proje numarası ile desteklendi. Deneysel alışmalar, Başkent 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.

3.3 Anestezi

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

3.4. Cerrahi Teknik

Anestezi alan ratların, 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 (Resim 1).

3.5. Deney Tasarımı

Portal ven kanülide edilip portal pedikül distali bağlandıktan sonra +4°C'deki RL, UW, HTK solüsyonları ile hepatik venden berrak sıvı gelene kadar karaciğer perfüze edildi ve ardından hepatektomi yapıldı. Hepatektomi sonrası ratlar yüksek doz anesteziklerle sakrifiye edildi. Amifostin kullanılan 2, 4 ve 6. gruplardaki ratlara hepatektomi yapılmadan 30 dakika önce 200 mg/kg subkütan amifostin verildi. İlaç uygulamasından sonra sadece bir hayvanda hipotansiyon belirtileri görüldü ve 4 cc serum fizyolojik periton içine verilerek tedavi edildi. Hepatektomi yapıldıktan sonra karaciğer, içinde RL, UW ve HTK bulunan torbalara konuldu, torbalar içi buz dolu saklama kaplarına yerleştirildi.

3.6. Araştırma Grupları

Deneyisel alışma, her biri randomize seçilmiş 8 rattan oluşan 6 grup üzerinden yapıldı. Herbir hayvan yer alacağı gruba göre işaretlendi.

Grup 1: RL grubu

Grup 2: RL + Amifostin grubu (RL+A)

Grup 3: HTK grubu

Grup 4: HTK + Amifostin grubu (HTK+A)

Grup 5: UW grubu

Grup 6: UW + Amifostin grubu (UW+A)

3.7. Araştırma Parametreleri

Perfüze edilen karaciğerden histolojik değerlendirme için 6.saatte, patolojik inceleme için 0, 6 ve 12. saatlerde karaciğer biyopsileri ve biyokimyasal inceleme için 0, 6 ve 12. saatlerde karaciğer spesmeninin içinde saklandığı solüsyonlardan biyokimya tüpüne sıvı örnekleri alındı.

3.7.1. Patolojik Parametreler

Karaciğerlerden alınan doku örnekleri, incelemenin yapılacağı güne kadar %10'luk formol içinde ve her bir rat için ayrı saklama kaplarında bekletildi. İnceleme yapılacağı zaman, doku örnekleri doku takip kasetlerine alınarak parafin blok haline getirildi. Her parafin bloktan  mikron kalınlığında kesitler alındı, kesitler etüvde 56°C'de bir gece bekletilerek deparafinize edildi.

3.7.1.1 H&E boyama ile Hepatosit Hasarının Değerlendirilmesi

Her bloktan 3–4 mikronluk çok sayıda kesit alınıp, hematoxilen-eozin boya ile boyandı. Hepatosit hasarı 4 bağımsız parametre ile değerlendirildi. Bunlar:

- Balonlaşma: 0-yok, 1-hafıf, 2-orta ve 3-şiddetli olarak değerlendirildi.
- Yağlanma: semikantitatif olarak değerlendirildi (yok, %1–30, %31–60, %61–100).

- Perisantral hidropik değişiklik: yok, fokal ya da diffüz
- Sinüzoidal dilatasyon: yok, fokal ya da diffüz olarak değerlendirildi.

3.7.1.2. iNOS immünohistokimyasal boyama

İmmünohistokimyasal boyama için, parafin bloklardan kesilen 3 mikron kalınlıktaki kesitler deparafinize edildikten sonra Tris HCl (10 mikrometre) ile 15 dakika kaynatıldı ve oda ısısında 20 dakika bekletildi. Daha sonra çeşme suyunda yıkanan kesitler hidrojen peroksitte 15 dakika tutulup PBS (fosfat tamponlu salin) ile yıkandı. Kesitlere 1,5 saat boyunca iNOS antikoru damlatılarak bekletildi ve daha sonra PBS ile yıkanarak 15'er dakika biotinlenmiş sığır anti-polyvalentte ve streptavidin peroksidazda tutulan kesitler arada PBS ile yıkandı. Daha sonra PBS ile tekrar yıkanan ve DAB kromojen damlatılan kesitler, distile su ile yıkanıp 10 saniye hematoksilende tutulduktan sonra çeşme suyunda tekrar yıkanarak vision mount kapama jeliyle lameller ile kapatıldı.

iNOS immünohistokimyasal boyamasında ise semikantitatif olarak her örnekte boyanan hepatositlerin tüm hepatositlere oranı dikkate alındı:

- Grade 0: Hepatositlerin < %10'unda boyanma,
- Grade 1: Hepatositlerin %10-25'inde boyanma,
- Grade 2: Hepatositlerin < %25-50'sinde boyanma,
- Grade 3: Hepatositlerin > %50'sinde boyanma olmak üzere 4 kademeli olarak tek patolog tarafından, gruplar bilinmeden (kör olarak) değerlendirildi (73,74).

3.7.1.3. In situ Cell Death Detection Kit immünohistokimyasal boyaması (TUNEL Metodu - Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated Deoxyuridine Triphosphate Nick End Labeling)

3 µm kalınlıkta kesilen örnekler deparafinize edildi. Daha sonra 15 dakika alkolde bekletilip, 2 dakika boyunca çeşme suyunda yıkandı. 20 dakika sitrat tamponda tutulan kesitler 20 dakika boyunca oda ısısında kurutuldu ve 2 dakika boyunca çeşme suyunda yıkandı. Kesitler daha sonra 2 dakika TBS (Tris buffer salin)'de bekletilip, kullanımdan önce -20°C'de tutulan Vial 1 (enzim solüsyonu) ve Vial 2 (işaretleme/label solüsyonu) ile karıştırıldı ve sonra 1,5 saat boyunca oda ısısında bekletildi. 2 kez 5'er dakika TBS ile yıkanan kesitlere, kullanımdan önce +4 derecede tutulan Vial 3 (converter-POD), 30

dakika boyunca uygulandı. Tekrar 2 kez 5'er dakika TBS ile yıkanan kesitler, 12 dakika boyunca AEC'de bekletildi. 2 dakika boyunca çeşme suyunda yıkanan kesitlere 10 saniye metil yeşili uygulandı ve AEC kapama jeli kullanılarak lamel ile kapandı.

TUNEL metodunda, her örnekte, x 400 büyütmede 10 ayrı saha tarandı ve en az 1000 hepatositte, boyanmış olan hepatosit nükleusları sayıldı (75,76).

3.7.2. Histolojik Parametreler

Her gruptan randomize olarak 4'er tane rat seçildi. Bu ratlardan 6. saatte elde edilen tüm dokular fosfat tamponlu %2,5 gluteraldehit içerisinde 2-3 saat fikse edildi, %1'lik osmium tetraoksit ile defiksasyonu takiben, derecelendirilmiş alkol banyosunda dehidrate edildi. Örnekler propilen oksit içerisinde geçirildi, araldit CY 212, 2-dodesenil süksinik anhidrat, bezildimetil amin ve dibutilpitalat içine gömüldü. Yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile renklendirildi ve ışık mikroskobu altında sahalara seçildi. Ardından ince kesitler alınarak uranil asetat ve kurşun sitrat ile kaplanarak LEO 906E transmisyon elektron mikroskopisinde incelendi.

EM'da; nükleer değişim, endotelyal hücre değişimi, plazma membran değişimi, mitokondriyal değişim, endoplazmik retikulumdaki değişimler incelendi.

3.7.3. Biyokimyasal Parametreler

Karaciğer spesmeninin içinde saklandığı koruma solüsyonundan 0, 6 ve 12. saatlerde alınan örnekler laboratuvar koşullarında -22 °C'de saklandı.

- ALT, standardize bir metoda uyarlanan UV testi ile, ALP ise kolorimetrik yöntem ile analiz edildi. Değerler ünite/ litre (U/L) olarak ifade edildi.
- NO konsantrasyonu, nitrat/nitrit kolorimetrik test kiti (cayman chemical, USA) kullanılarak, absorbansı 550 nm olan spektrofotometri ile ölçüldü. Bu test, nitratın nitrite, nitrat reduktaz ile çevrilmesini baz almaktadır. Nitrit, griess diazotizasyon reaksiyonu sonucu oluşan renkli bileşke ile tespit edilmektedir. NO standartları kullanılarak standart bir eğri elde edildi. Elde edilen NO değerleri bu standarta göre hesaplandı. Serum ile yapılan çalışmalarda, anlamlılık sınırı 2,5 $\mu\text{m/ml}$ olarak saptandığı halde, koruma solüsyonları için daha önceden yapılan böyle bir çalışma olmadığından, çalışmamızda gruplar arasındaki farklılıklara göre yorum yapıldı (77).

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Veriler SPSS 11,5 paket programına girilerek analizler yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarında student's t-testi ki-kare testi ve Anova çoklu karşılaştırmalı analizi kullanıldı. İstatistiksel analiz sonucunda, $p < 0,05$ olarak hesaplanan testler anlamlı kabul edilmiştir.



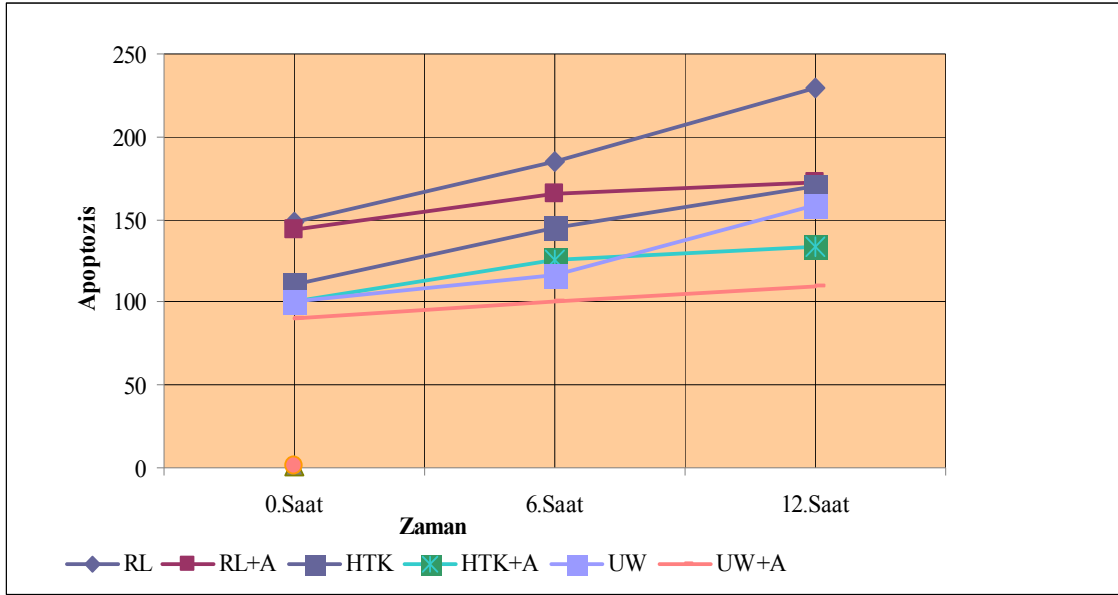
5. BULGULAR

5.1. Patoloji Değerlendirme Sonuçları

5.1.1. TUNEL ile Apoptozisin Değerlendirilmesi

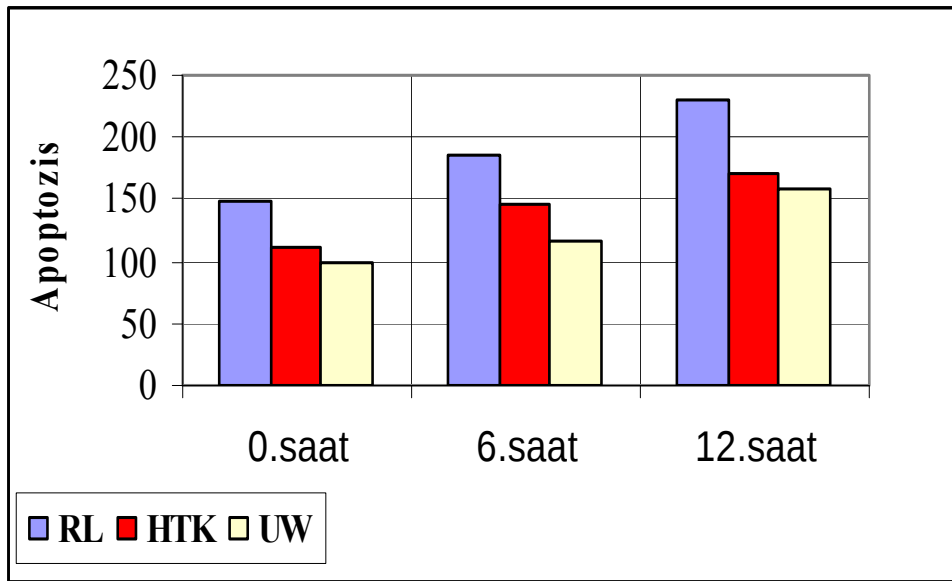
TUNEL yöntemi ile yapılan apoptozis değerlendirmesinde elde edilen veriler, tablo 4 ve grafik 3'te özetlenmiştir. Onikinci saatte elde edilen sonuçlara göre, amifostin verilen gruplarda (grup 2, 4, 6), verilmeyen gruplara (grup 1, 3, 5) göre apoptozisin daha az olduğu görüldü ($p<0.01$, $p<0.04$ ve $p<0.05$). İlk 6 saatte elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı.

Tablo-4: TUNEL boyama ile apoptozis saptanan hücrelerin gruplara göre ortalama dağılımı				
GRUP	RAT SAYISI	0.SAAT	6.SAAT	12.SAAT
RL	8	148± 26	185± 22	229± 41
RL+A	8	144± 25	166± 24	172± 24
<i>P</i>		0.40	0.36	<u>0.05</u>
HTK	8	111± 30	144± 46	169± 42
HTK+A	8	101± 19	126± 16	133± 14
<i>P</i>		0.45	0.45	<u>0.04</u>
UW	8	100± 23.	115± 25	158± 24
UW+A	8	90± 16	100± 21	116± 18
<i>P</i>		0.42	0.44	<u>0.01</u>



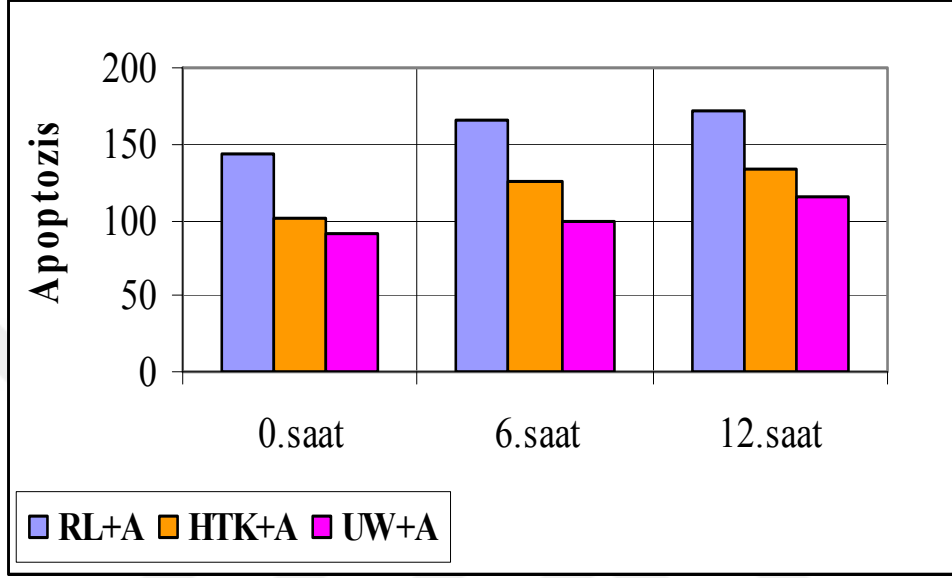
Grafik-3: Tüm grupların ortalama apoptotik hücre sayısına göre karşılaştırılması.

Gruplar arasında apoptozis için karşılaştırma yapıldığında, RL grubunda UW ve HTK grubuna göre tüm zaman birimlerinde apoptozisin daha fazla olduğu görüldü ($p<0.04$). UW grubunda, apoptozis inceleme süresince daha az görülmesine karşılık HTK grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p<0.25$). Bulgular grafik 4'te özetlendi.

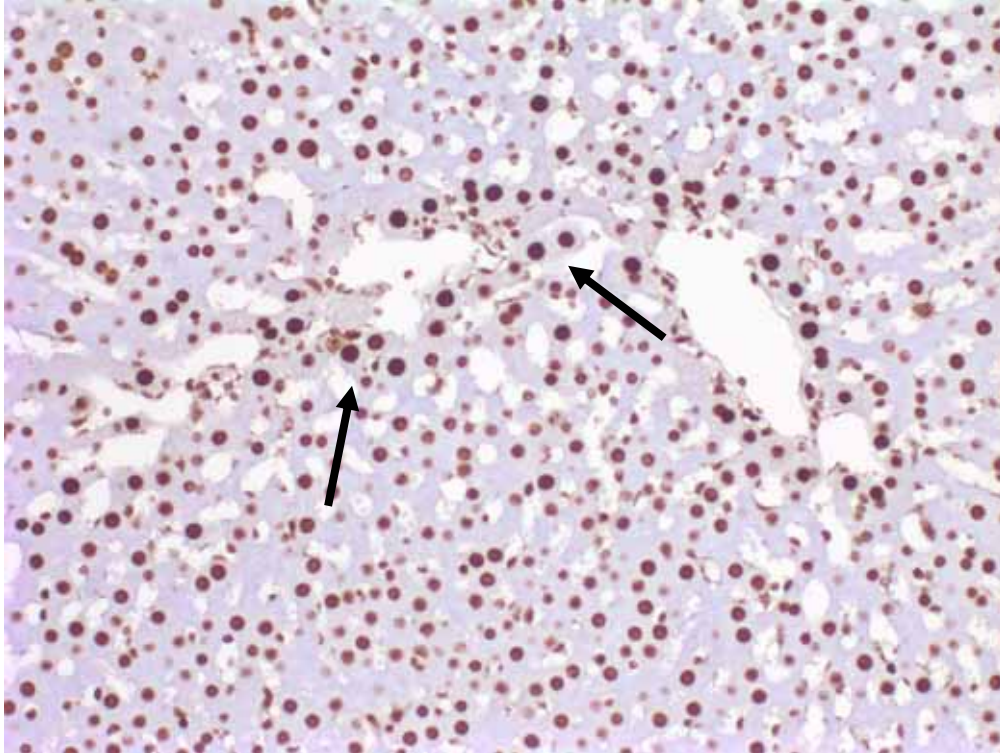


Grafik-4: Amifostin kullanılmayan üç grubun karşılaştırılması.

Amifostin verilen gruplar (grup 2, 4, 6) arasında yapılan karşılaştırmada, apoptozisin en çok RL grubunda olduğu, diğer iki grup arasında ise anlamlı fark olmadığı görüldü. Bulgular grafik 5’te özetlenmiştir.



Grafik-5: Amifostin kullanılan üç grubun karşılaştırılması.



Resim-1: 0. saatte TUNEL boyama tekniği ile apoptotik hücre sayımı. 8x 200

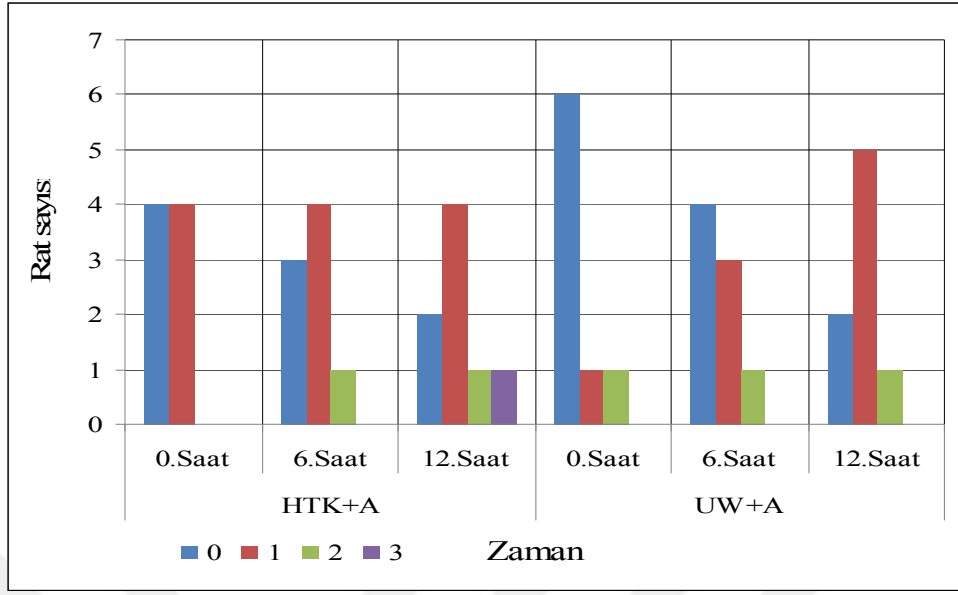
5.1.2. iNOS ile İmmunhistokimyasal Değerlendirme

iNOS boyama metodunda, semikantitatif olarak her örnekte boyanan hepatositlerin tüm hepatositlere oranı dikkate alındı ve Grade 0, 1, 2 ve 3 olarak derecelendirildi.

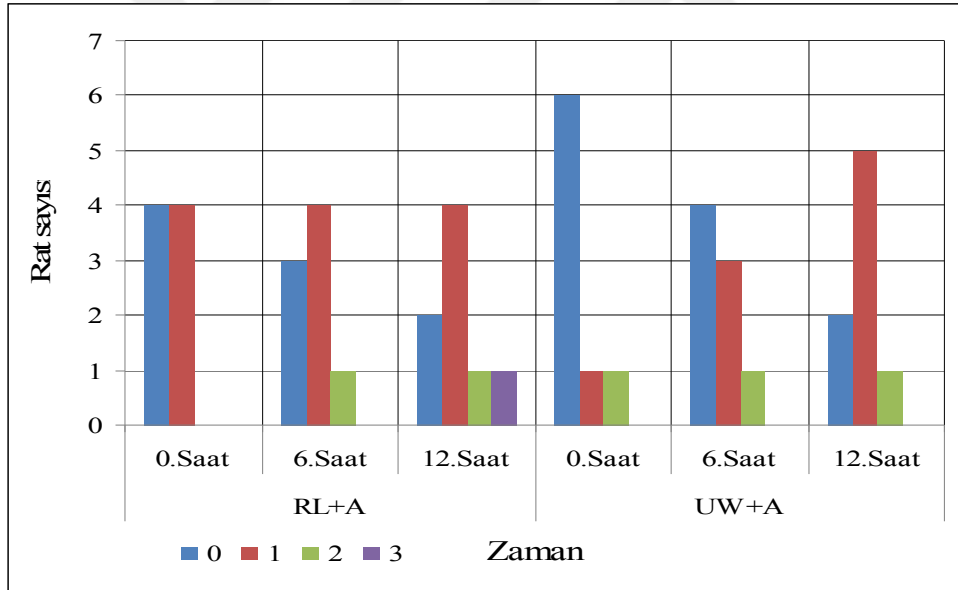
Gruplar arasında yapılan incelemede, en az boyanma HTK+Amifostin grubunda elde edildi. En fazla boyanma ise RL grubunda görüldü. Amifostin verilen gruplarda (grup 2, 4, 6) 12. saatte iNOS ile elde olunan boyanma diğer gruplara göre daha düşüktü. Bulgular tablo 5'te özetlemiştir.

Tablo-5: Grupların iNOS grade'lerine göre karşılaştırılması																
	İg	RL		RL+A		P	HTK		HTK+A		P	UW		UW+A		P
		N	%	R	%		N	%	R	%		N	%	N	%	
0. Saat	0	0	0	3	37.5	0.597	4	50	4	50	0.264	7	87.5	6	75	0.248
	1	3	37.5	2	25		2	25	4	50		0	0	1	12.5	
	2	3	37.5	2	25		2	25	0	0		1	12.5	1	12.5	
	3	2	25	1	12.5		0	0	0	0		0	0	0	0	
6. Saat	0	0	0	1	12.5	0.055?	1	12.5	3	37.5	0.021	1	12.5	4	50	0.513
	1	4	50	0	0		5	62.5	4	50		6	75	3	37.5	
	2	4	50	6	75		2	25	1	12.5		1	12.5	1	12.5	
	3	0	0	1	12.5		0	0	0	0		0	0	0	0	
12. Saat	0	1	12.5	1	12.5	0.037	0	0	2	25	0.05	0		2	25	0.046
	1	0	0	2	25		1	12.5	4	50		3	37.5	5	62.5	
	2	1	12.5	4	50		5	62.5	1	12.5		3	37.5	1	12.5	
	3	6	75	2	25		2	25	1	12.5		2	25	0	0	
Kısaltmalar: İg: iNOS grade değerleri, N: Rat sayısı,																

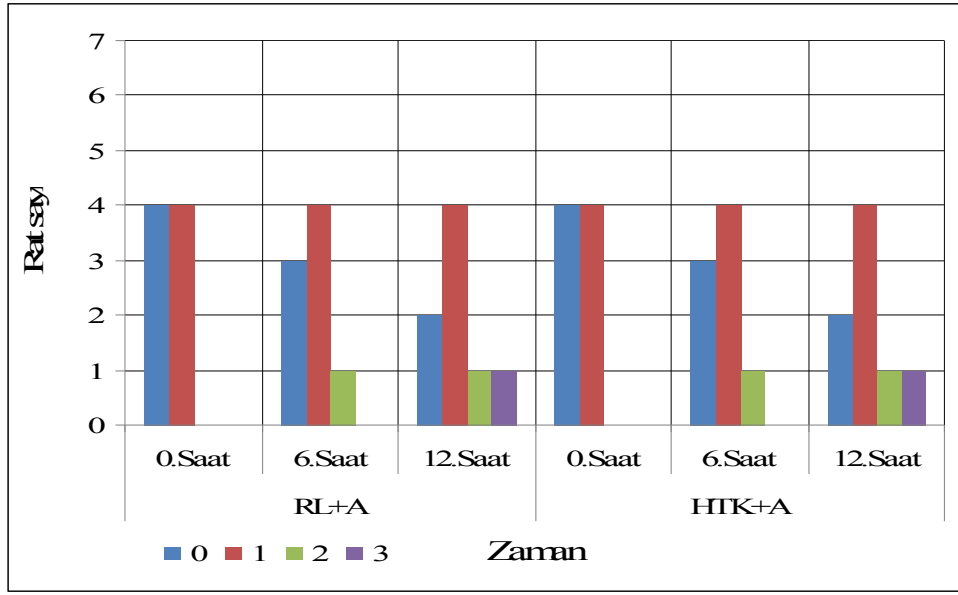
Gruplar arasında yapılan karşılaştırmada, HTK+Amifostin ve UW+Amifotin gruplarında elde edilen sonuçlar benzerdi. RL+Amifostin grubu ile amifostin verilen diğer iki grup karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar daha kötü idi. Bulgular grafik 6, 7 ve 8'de özetlenmiştir.



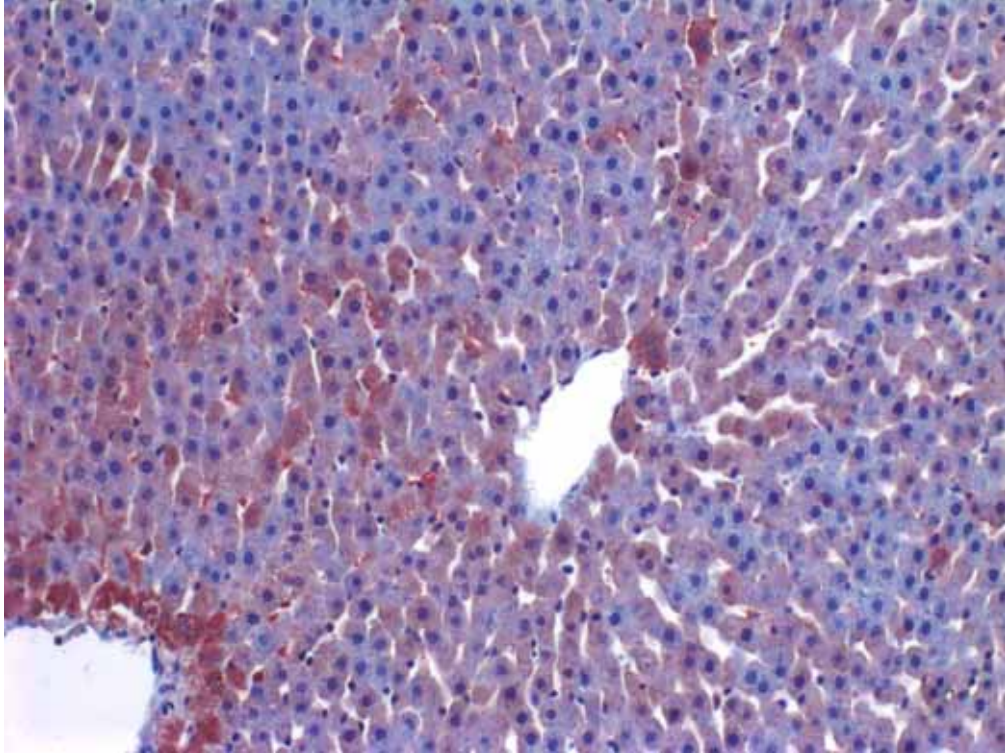
Grafik-6: UW+A ve HTK+A gruplarının iNOS grade'lerinin karşılaştırılması



Grafik-7: UW+A ve RL+A gruplarının iNOS grade'lerinin karşılaştırılması



Grafik-8: RL+A ve HTK+A gruplarının iNOS grade'lerinin karşılaştırılması

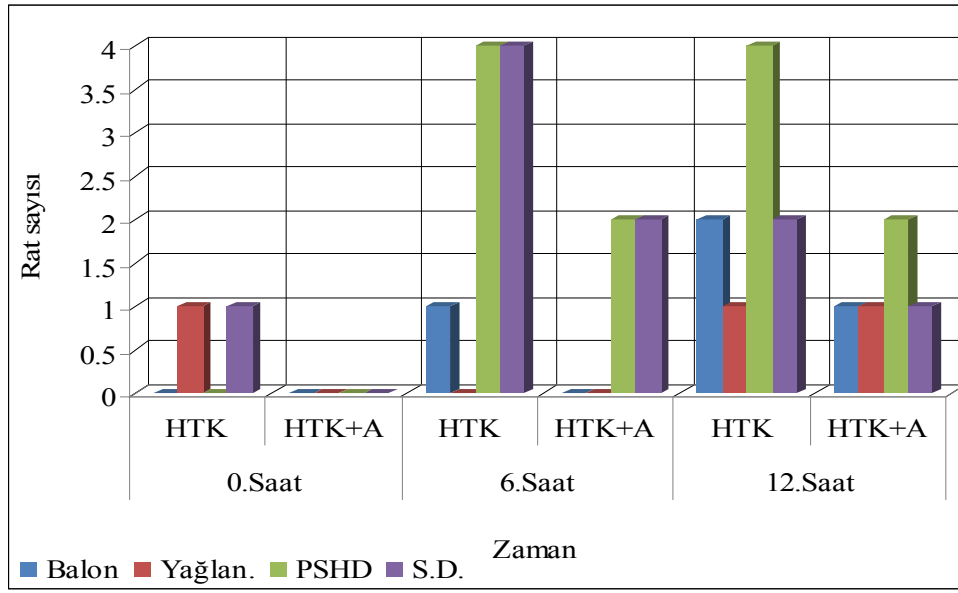


Resim-2: iNOS ile 6. saatte boyanma görüntüsü. 2x 200 büyütme

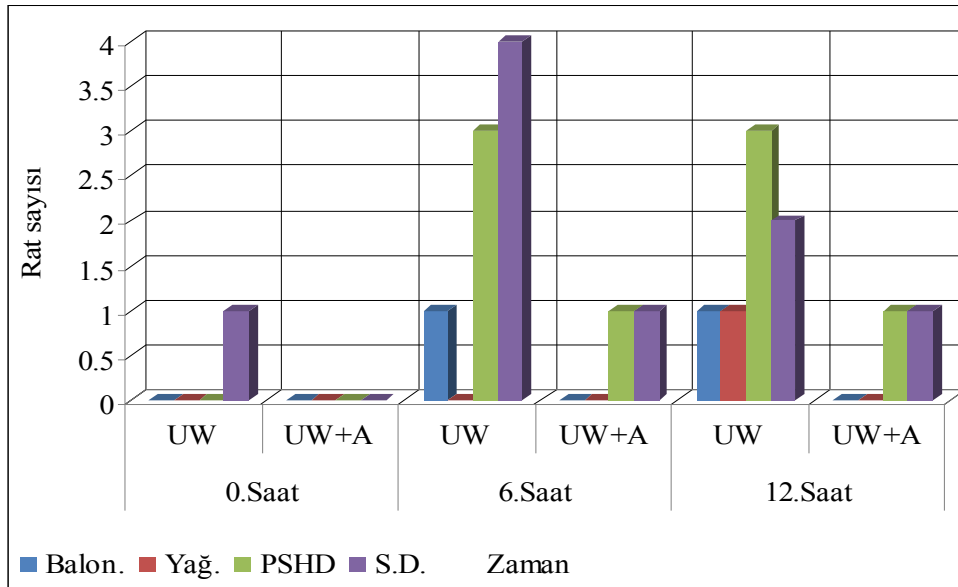
5.1.3. Gruplardaki Patolojik Değişiklikler

Patolojik değerlendirmede; hiçbir grupta yağlanma açısından fark bulunmadı. Gruplar arası karşılaştırmalarda RL - RL+A grubunda 6 ve 12. saatlerde PSHD açısından anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0.05$). HTK – HTK+A ve UW – UW+A gruplarında ise 6. ve 12. saatlerde PSHD ve SD açısından anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (sırasıyla; $p<0.04$, $p=0.05$, $p<0.05$ ve $p<0.05$). Sonuçlar tablo 6, grafik 9, 10 ve 11’de özetlenmiştir.

GRUP										SÜ RE	R A T	SD	PSH D	BL.	Yglm	P
			(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	6.ve 12. saatler de PSHD açısın dan anlam lı fark var. $P<0.05$			
RL	0.saat	8	1	7	2	6	1	7	0	8						
	6.saat	8	2	6	4	4	2	6	0	8						
	12.saat	8	5	3	7	1	4	4	1	7						
RL+A	0.saat	8	2	6	2	6	0	8	0	8						
	6.saat	8	1	7	0	8	2	6	0	8						
	12.saat	8	3	5	4	4	2	6	0	8						
HTK	0.saat	8	1	7	0	8	0	8	1	7						
	6.saat	8	4	4	4	4	1	7	0	8						
	12.saat	8	3	5	4	4	2	6	1	7						
HTK+A	0.saat	8	0	8	0	8	0	8	0	8						
	6.saat	8	2	6	1	7	0	8	0	8						
	12.saat	8	1	7	2	6	1	7	1	7						
UW	0.saat	8	1	7	0	8	0	8	0	8						
	6.saat	8	4	4	4	4	0	8	1	7						



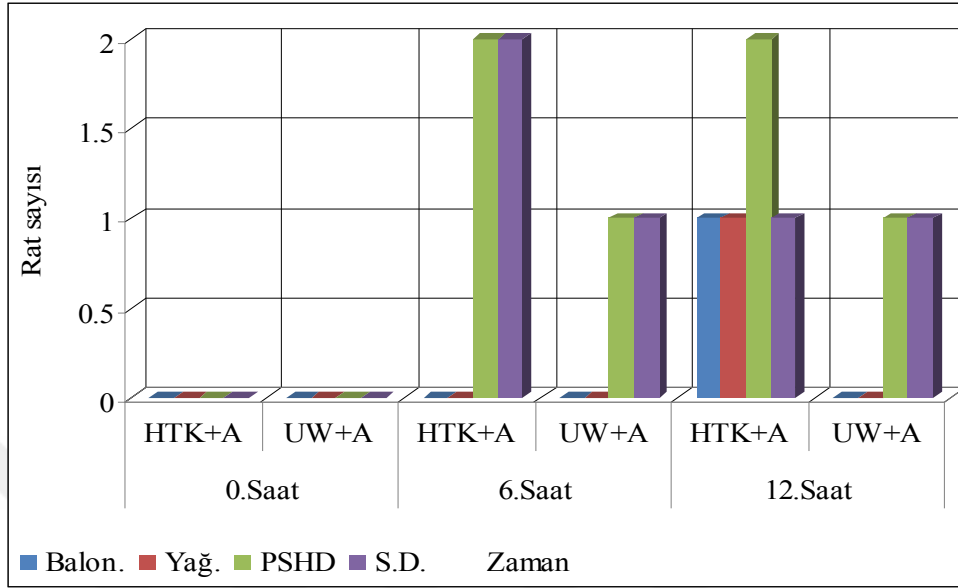
Grafik-10: HTK ve HTK+A gruplarının patolojik değişimlere göre karşılaştırılması



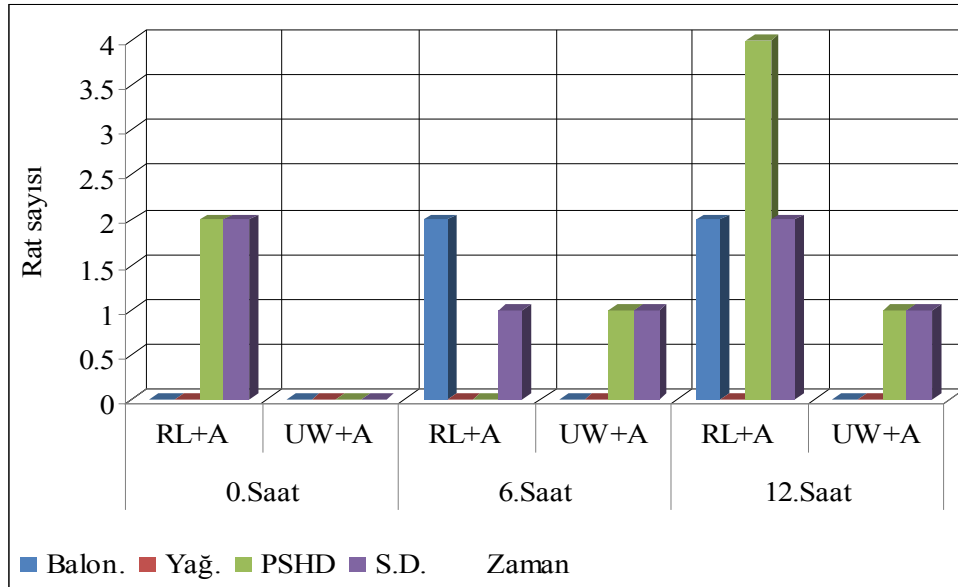
Grafik-11: UW ve UW+A gruplarının patolojik değişimlere göre karşılaştırılması

Amifostinli grupların kendi aralarındaki karşılaştırmalarında ise UW+A ve HTK+A grupları arasında belirgin farklılık saptanmazken, RL+A ile karşılaştırıldıklarında ise her

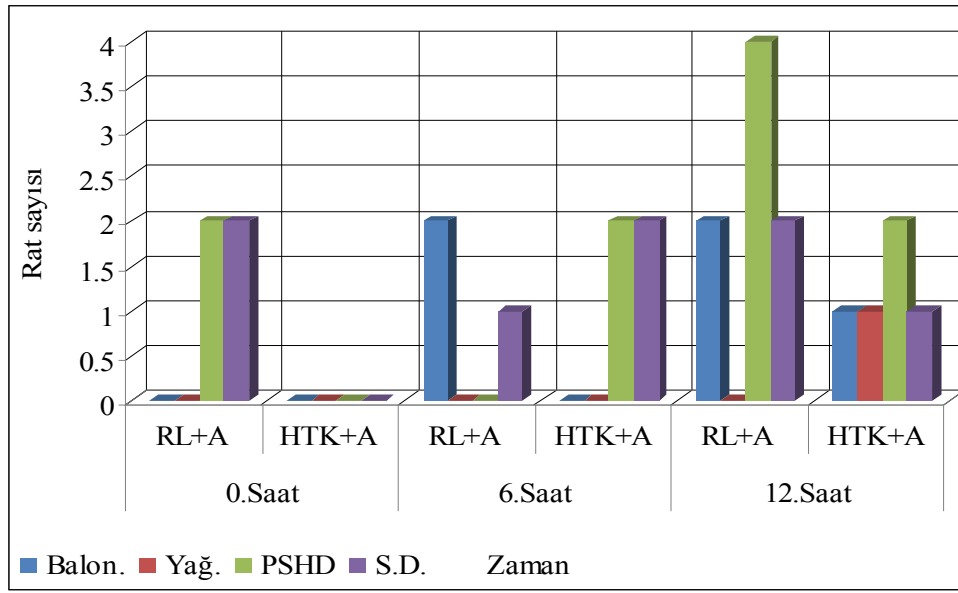
iki grubunda SD ve PSHD açısından anlamlı olarak farklı oldukları görüldü. Bulgular grafik 12, 13 ve 14’te özetlenmiştir.



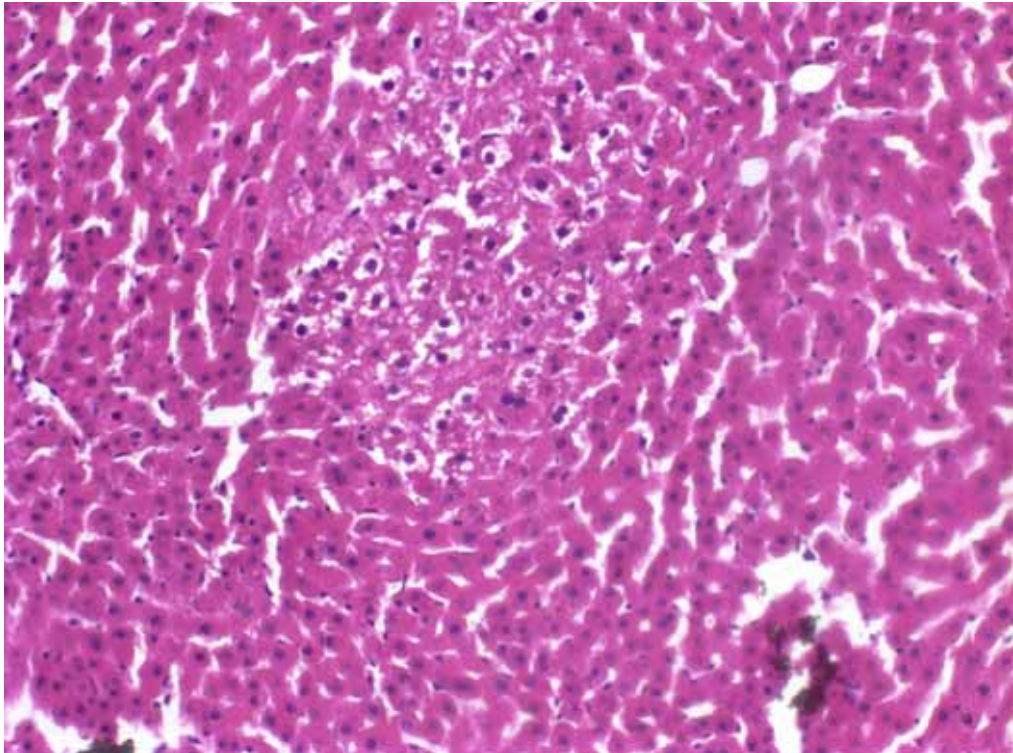
Grafik-12: HTK+A ve UW+A gruplarının patolojik değişimlere göre karşılaştırılması



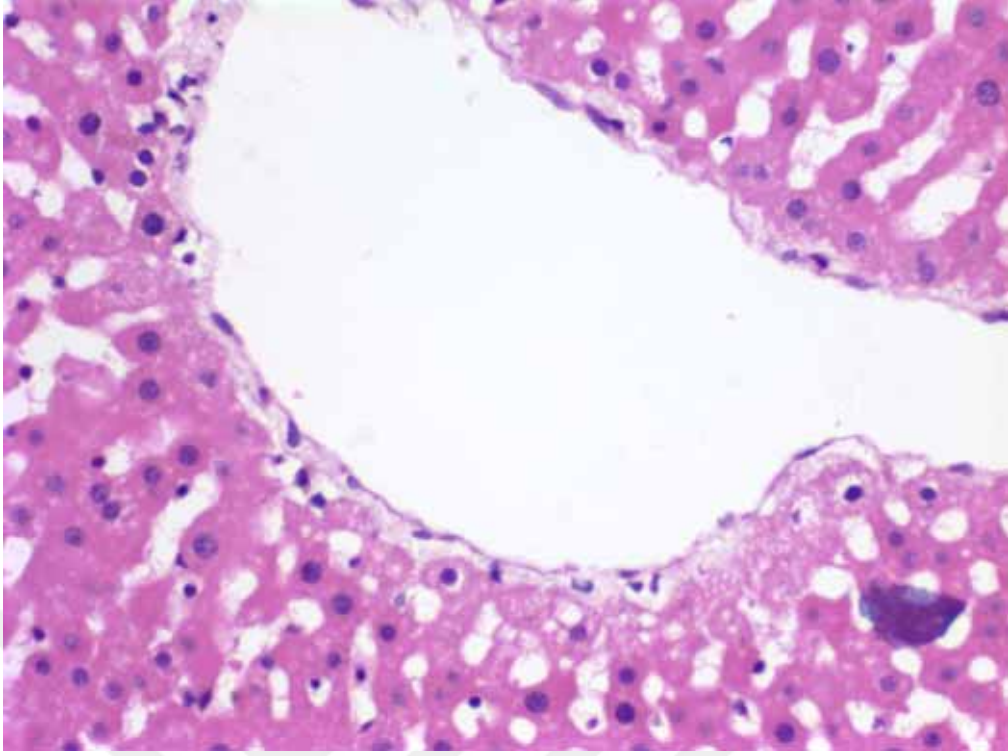
Grafik-13: RL+A ve UW+A gruplarının patolojik değişimlere göre karşılaştırılması



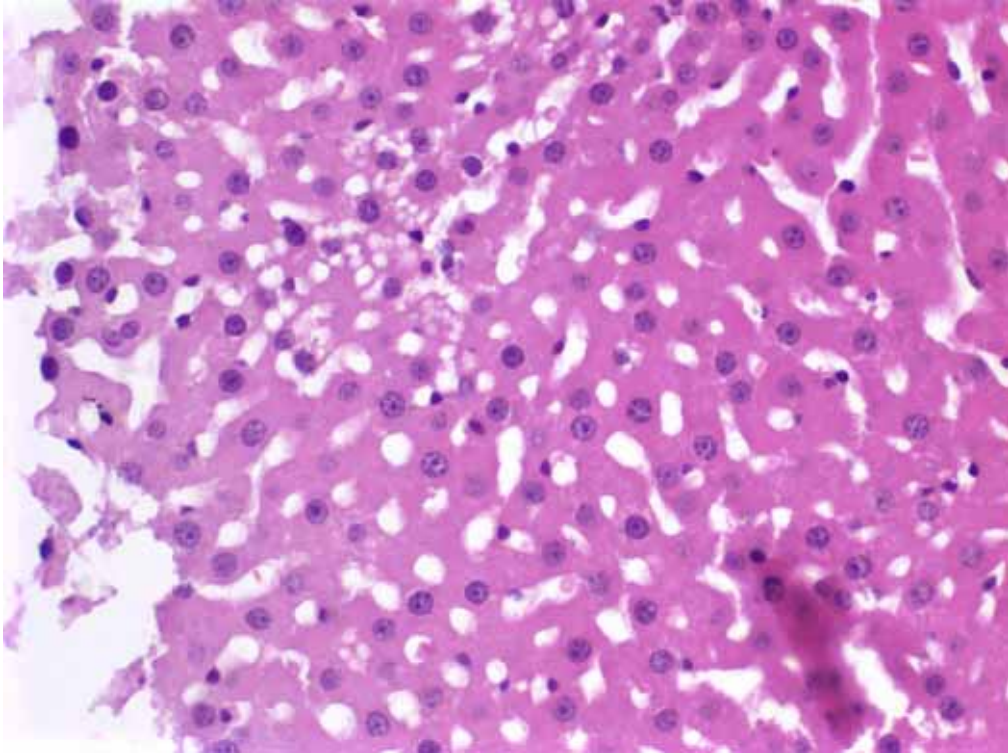
Grafik-14: RL+A ve HTK+A gruplarının patolojik değişimlere göre karşılaştırılması



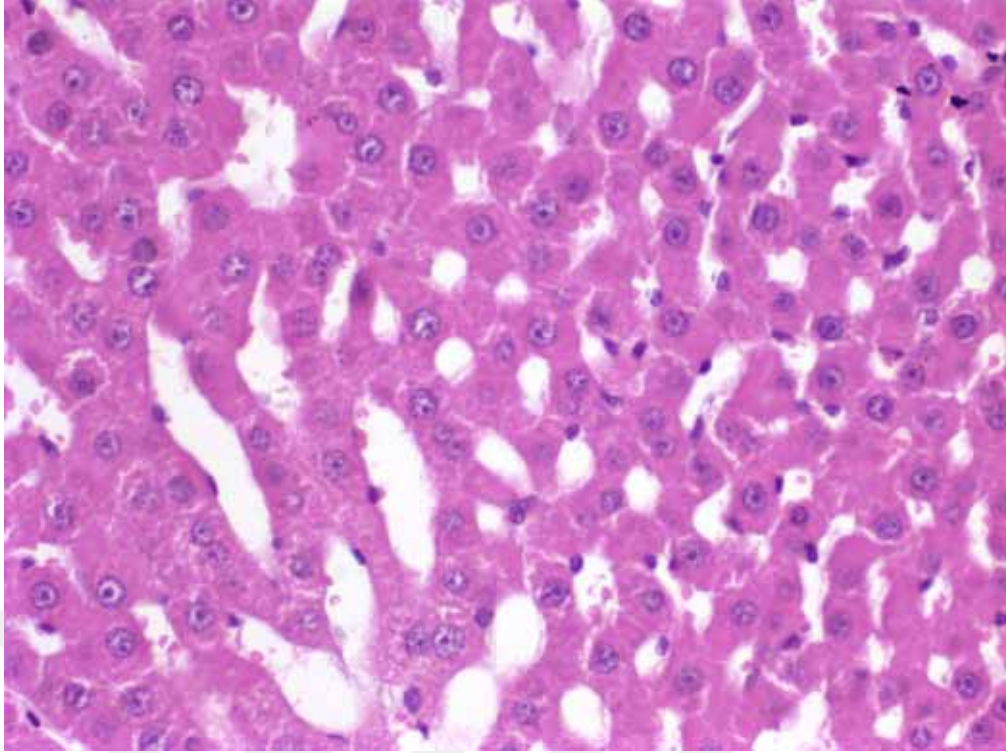
Resim-3: Balonlaşma x 200



Resim-4: Perisantral hidropik değişiklikler x 400 büyütme



Resim-5: Mikroveziküler yağlı değişiklik x 400 büyütme



Resim-6: Sinüzoidal dilatasyon x 400 büyütme

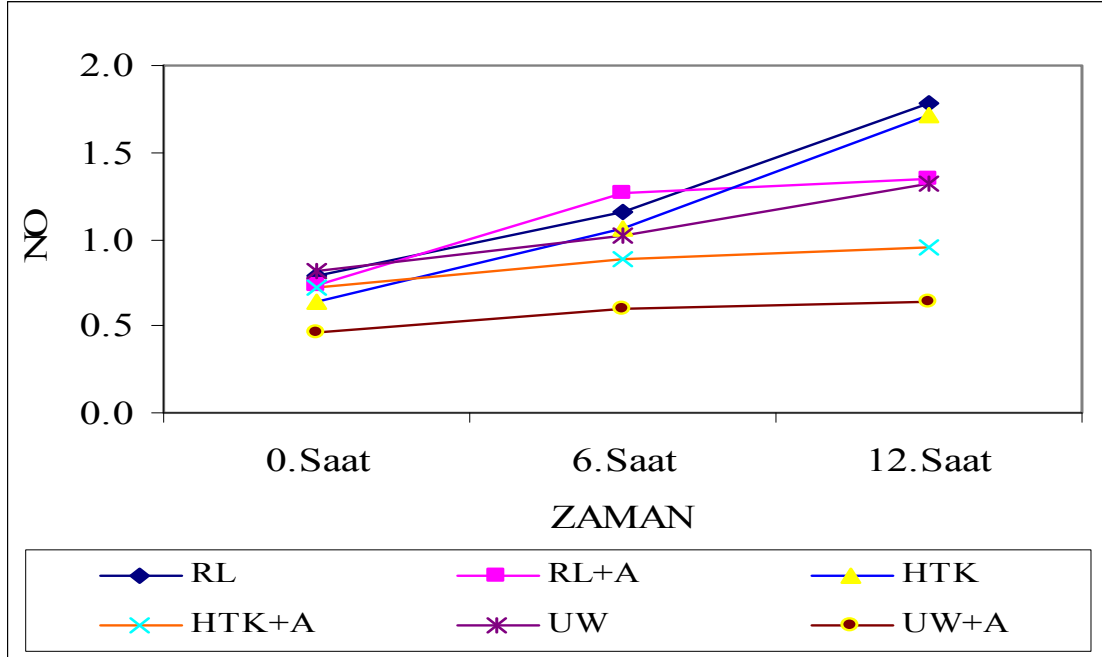
5.2. Biyokimyasal Parametreler

5.2.1. Nitrik Oksit Düzeyleri

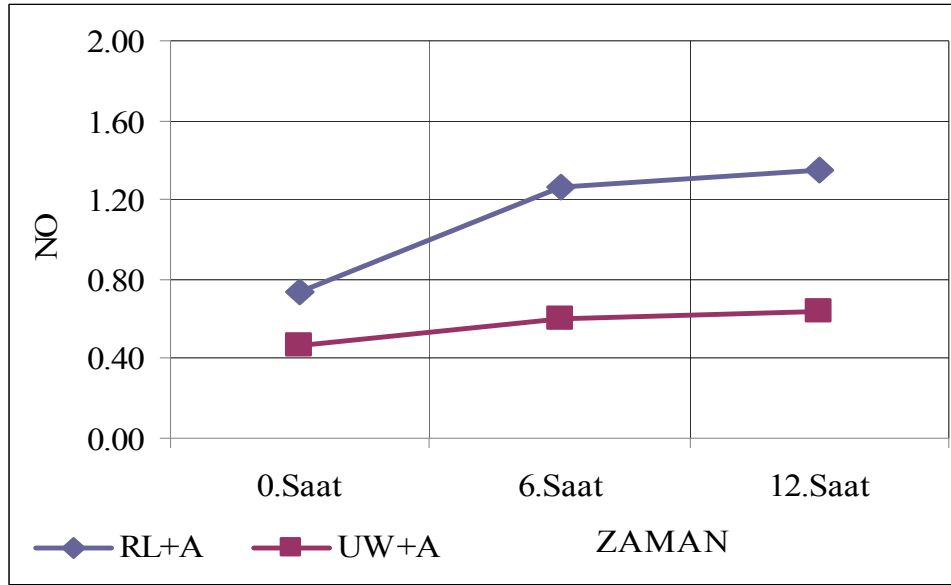
Biyokimyasal olarak perfüzyon sıvılarında NO düzeyleri 0, 6 ve 12. saatlerde ölçüldü. Gruplar arasında yapılan incelemede, UW+A grubunda tüm zaman dilimlerinde en düşük, RL grubunda ise en yüksek NO düzeyleri elde edildi. Genel olarak amifostin verilen gruplarda (grup 2, 4, 6) elde edilen NO düzeyleri diğer gruplara (grup 1, 3, 5) göre daha düşüktü. Bulgular, tablo 7 ve grafik 15-18’de özetlenmiştir.

Tablo 7: NO ortalamalarına göre gruplar arasındaki dağılım				
GRUP	RAT SAYISI	0.SAAT	6.SAAT	12.SAAT
RL	8	0.79±0.22	1.15±0.24	1.78±0.26
RL+A	8	0.73±0.18	1.26±0.18	1.34±0.23
P		0.69	0.61	<u>0.022</u>
HTK	8	0.64±0.19	1.09±0.19	1.71±0.15

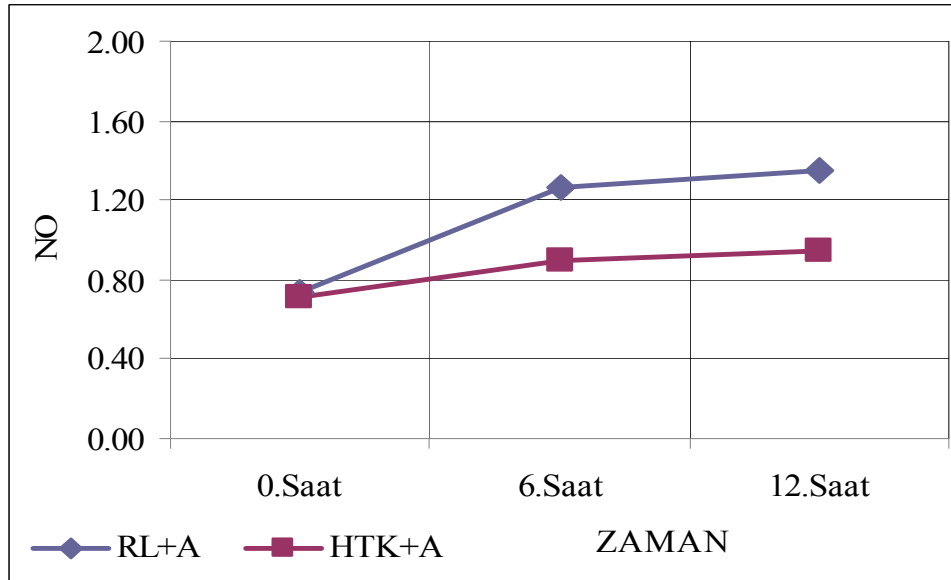
HTK+A	8	0.71±0.19	0.80±0.10	1.04±0.13
<i>P</i>		0.59	0.06	<u>0.016</u>
UW	8	0.81±0.18	1.02±0.34	1.31±0.98
UW+A	8	0.46±0.21	0.60±0.14	0.69±0.13
<i>P</i>		<u>0.033</u>	<u>0.01</u>	<u>0.02</u>



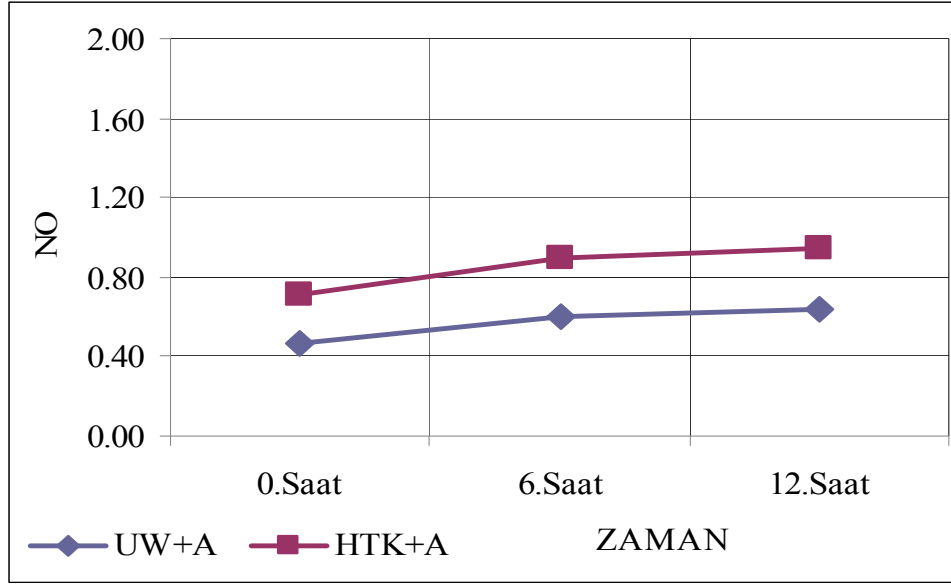
Grafik-15: Gruplar arası NO düzeylerinin karşılaştırılması



Grafik-16: UW+A ve RL+A gruplarının kendi içinde grafiksel olarak karşılaştırılması



Grafik-17: RL+A ve HTK+A gruplarının karşılaştırılması



Grafik-18: HTK+A ve UW+A gruplarının karşılaştırılması

5.2.2. ALT ve ALP Değerlendirmeleri

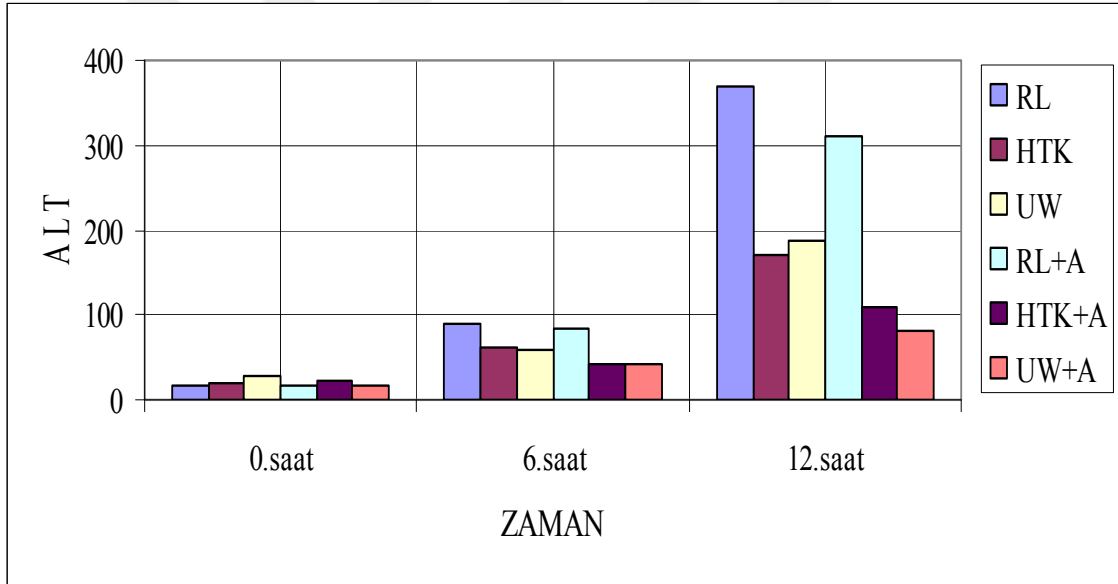
Biyokimyasal olarak prezervasyon sıvısından 0, 6 ve 12. saatlerde ALT ve ALP seviyeleri analiz edildi. Genel olarak sıvı ALT düzeyleri UW+Amifostin grubunda en düşük, RL grubunda ise en yüksek olarak saptandı. Gruplar arası karşılaştırmada RL grubunda farklılık yokken, UW-UW+A, HTK-HTK+A, UW+A-HTK+A grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılıklar saptandı (sırasıyla $p<0.02$, $p<0.045$, $p<0.05$). Bulgular tablo 8, diğer ayrıntılar grafik 20-24'te özetlenmiştir.



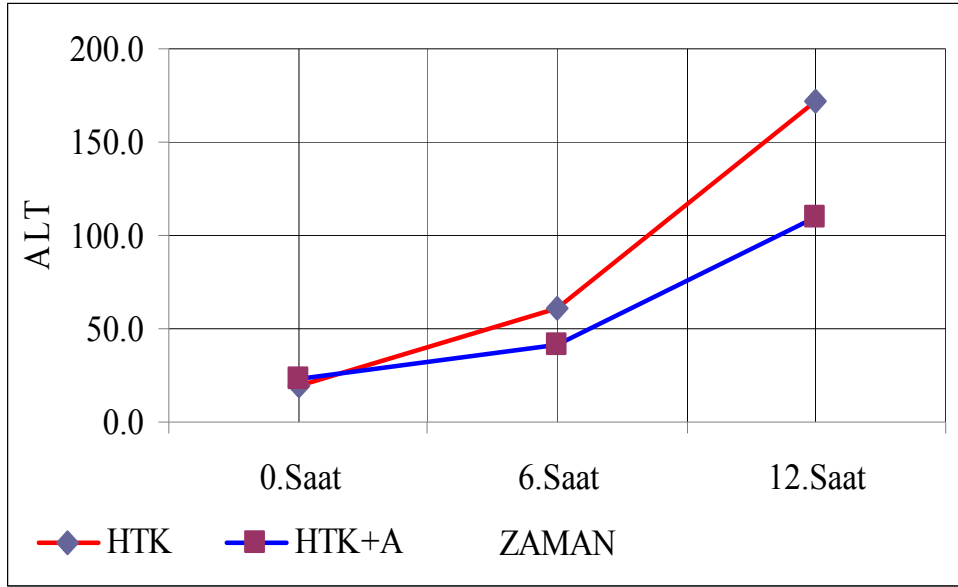
Tablo-8: Tüm grupların saatlere göre ALT ve ALP değerleri

Süre	Rat	RL		RL +A		HTK		HTK+A		UW		UW+A	
		ALP	ALT	ALP	ALT	ALP	ALT	ALP	ALT	ALP	ALT	ALP	ALT
0.SAAT	1	2	38	2	27	1	18	3	30	1	29	1	11
	2	1	7	1	7	1	10	1	31	2	40	2	10
	3	6	14	3	14	2	19	5	38	1	39	1	17
	4	1	12	1	13	1	12	1	17	1	26	8	11
	5	5	29	1	29	1	30	1	14	1	17	1	24
	6	1	13	3	10	1	18	1	12	1	23	2	17
	7	4	11	3	14	1	28	2	22	2	22	1	23
	8	1	17	1	12	1	20	1	23	1	26	1	20
ORTALAMA		2.6	17.6	1.9	15.8	1.1	19.4	1.9	23.4	1.3	27.8	2.1	16.6
6.SAAT	1	45	66	24	66	29	53	28	42	28	45	20	30
	2	49	70	25	70	30	59	26	41	27	59	21	45
	3	52	114	23	114	31	63	24	43	31	60	23	46
	4	59	84	25	84	34	49	24	38	35	65	19	50

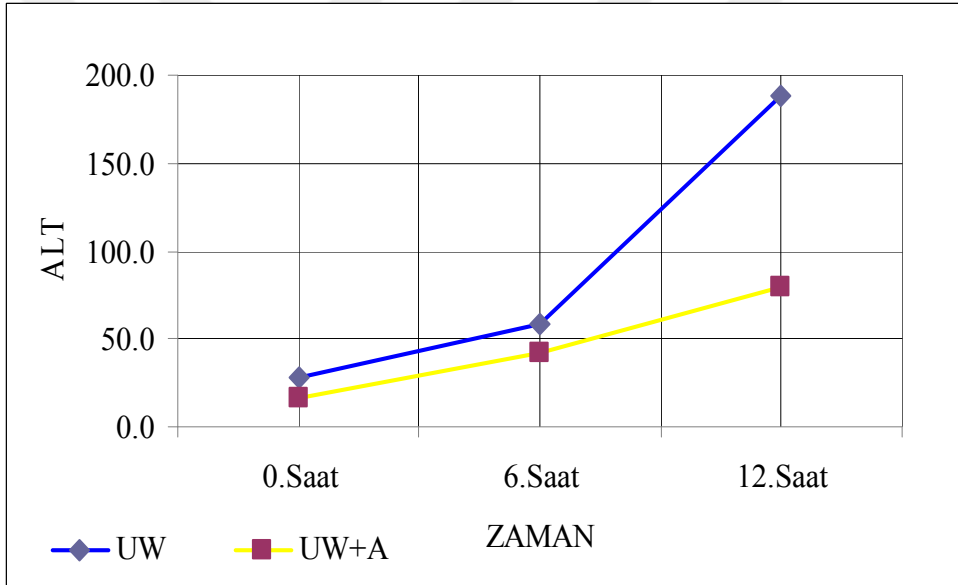
	5	48	91	18	91	26	62	18	42	28	60	31	48
	6	64	88	27	87	30	75	26	44	29	57	13	39
	7	60	100	28	89	38	62	31	45	38	64	26	42
	8	67	110	30	74	47	62	26	36	40	63	28	33
ORTALAMA		55.5	90.4	25.0	84.4	33.1	60.6	25.4	41.4	32.0	59.1	22.6	41.6
12.SAAT	1	78	499	45	362	48	142	40	96	48	256	26	77
	2	81	335	43	235	49	130	36	96	45	105	25	71
	3	94	261	48	255	62	176	42	122	59	297	27	72
	4	76	317	41	304	48	199	34	115	52	162	26	80
	5	90	367	30	367	50	189	32	107	42	140	39	90
	6	68	456	50	356	39	174	28	111	38	105	20	93
	7	82	405	49	297	49	186	37	121	42	145	28	82
	8	88	321	46	300	58	185	33	119	49	296	35	75
ORTALAMA		82.1	370.1	44.0	309.5	50.4	172.6	35.3	110.9	46.9	188.3	28.3	80.0



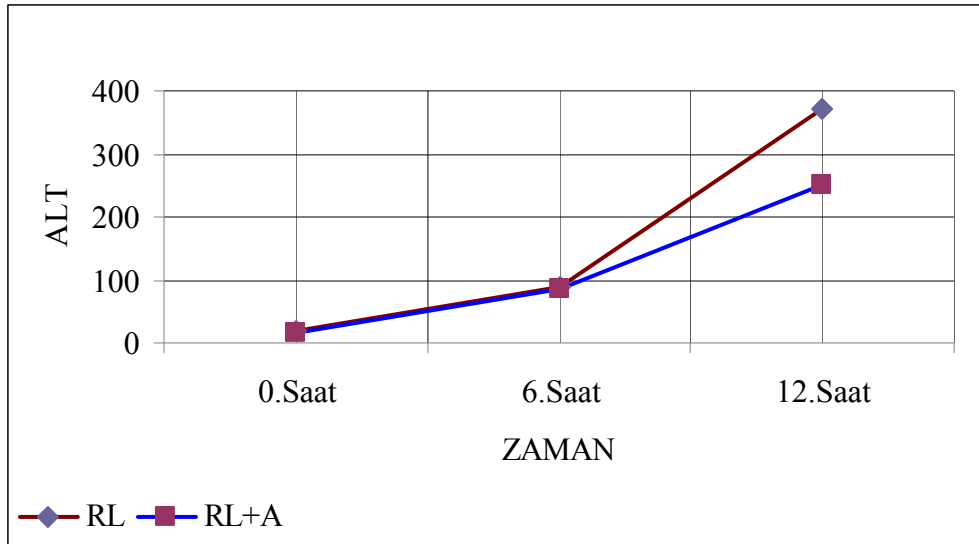
Grafik-19: Grupların ALT değerlerine göre karşılaştırılması



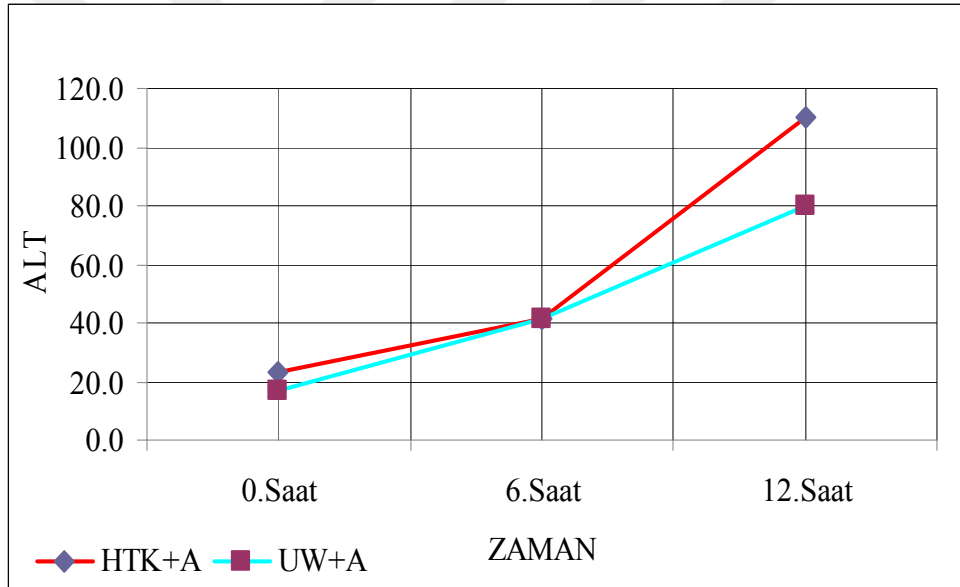
Grafik-20: HTK+A ve HTK gruplarında zamanla ALT değerlerindeki değişim



Grafik-21: UW+A ve UW gruplarında zamanla ALT değerlerindeki değişim

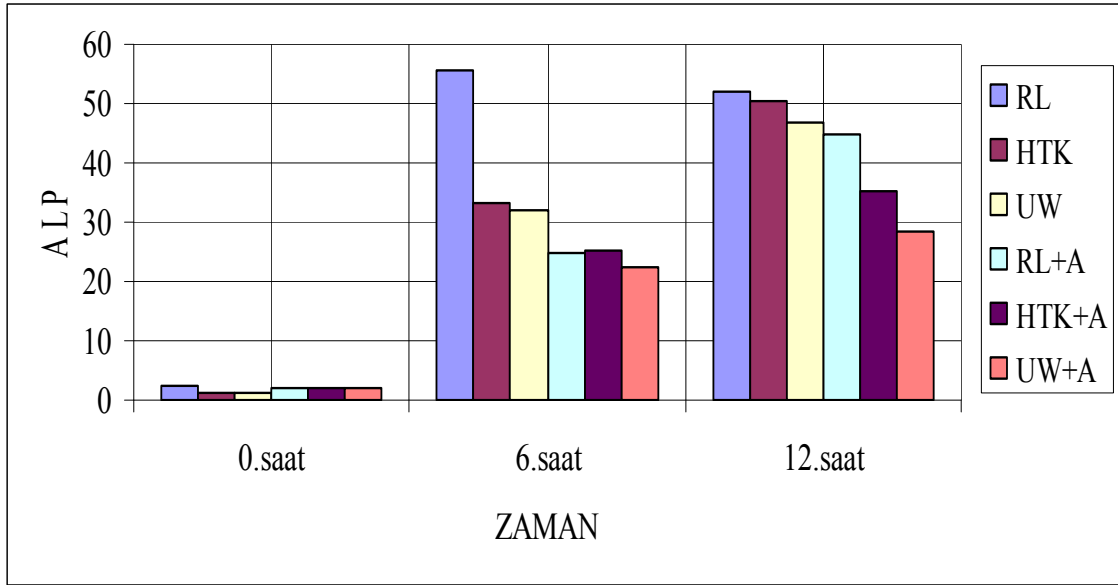


Grafik-22: RL+A ve RL gruplarında zamanla ALT değerlerindeki değişim

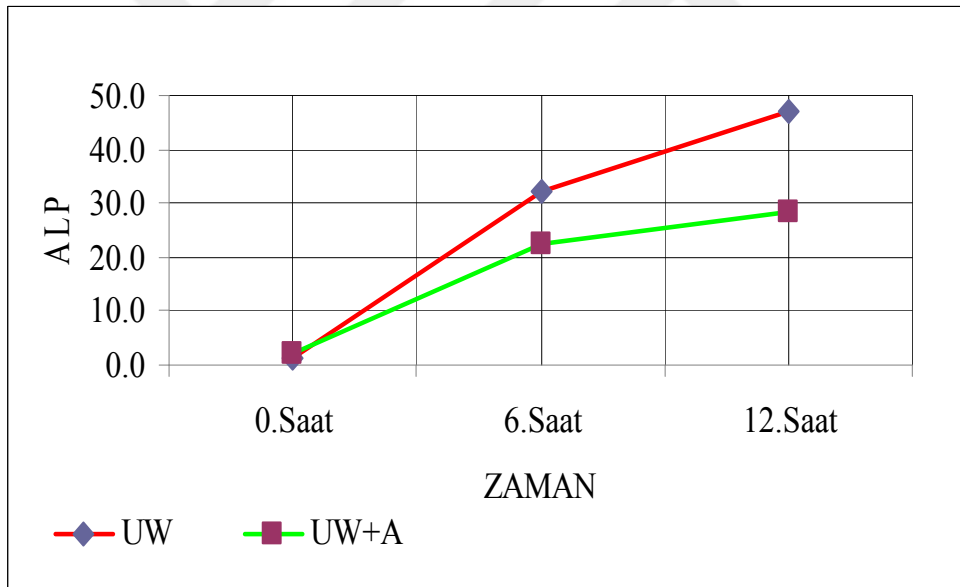


Grafik-23: HTK+A ve UW+A gruplarında zamanla ALT değerlerindeki değişim

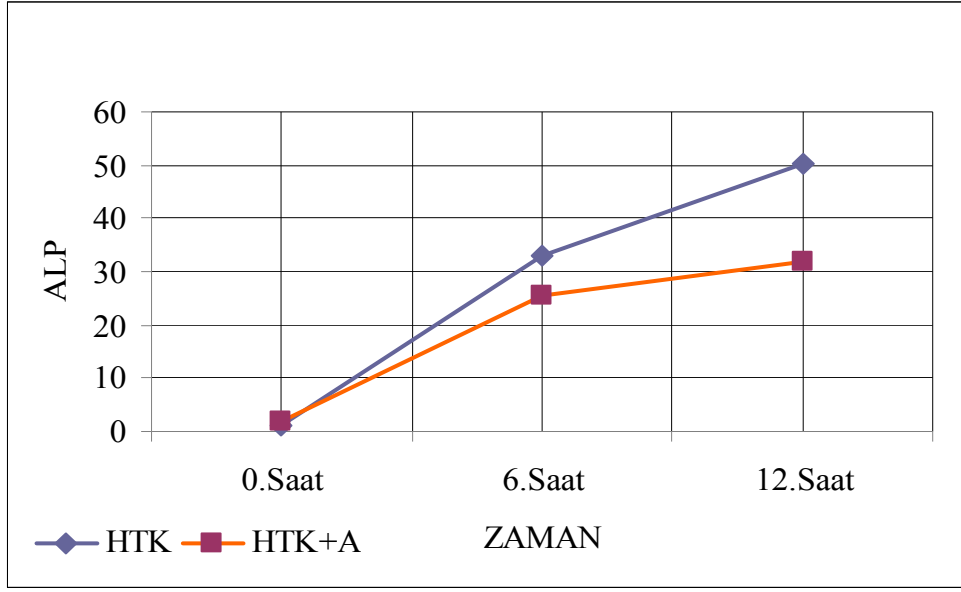
ALP için gruplar arası yapılan analizde amifostin verilen gruplarda (grup 2, 4, 6) 6 saatten sonra daha düşük değerler elde edildi. İlk 6 saatte, gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmadı. RL grubunda 6. saatten sonra elde edilen ALP düzeyi en yüksek iken, UW+A grubunda en düşük değerler elde edildi. HTK+A ve UW+A arasında yapılan analizde herhangi bir fark saptanmadı. Bulgular grafik 25-29'da özetlenmiştir.



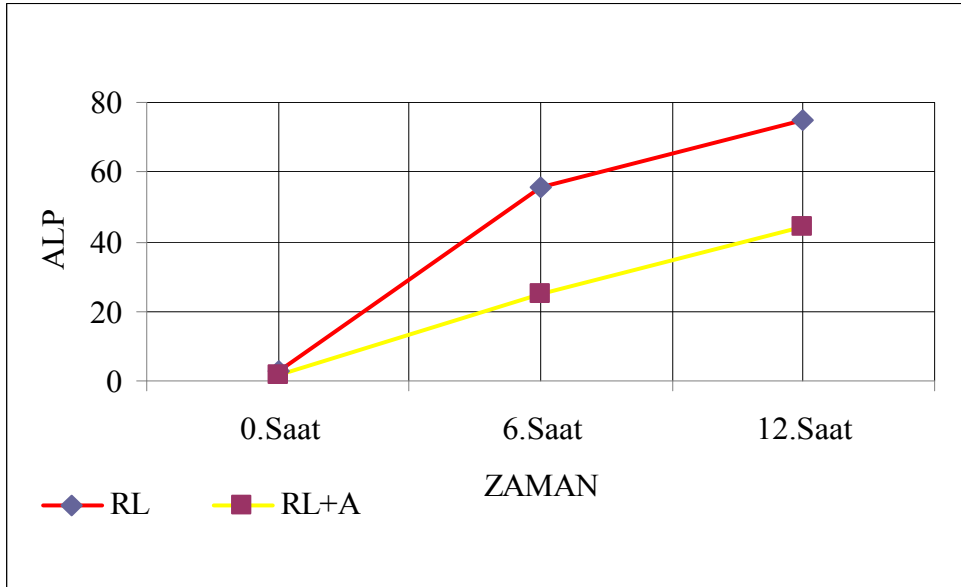
Grafik-24: Grupların ALP değerlerine göre karşılaştırılması



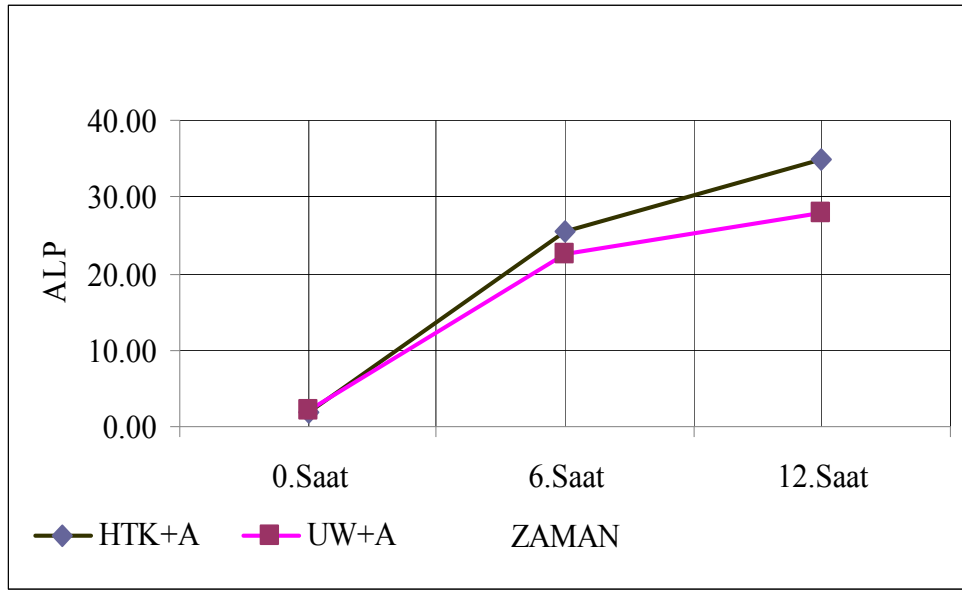
Grafik-25: UW+A ve UW gruplarında zamanla ALP değerlerindeki değişim



Grafik-26: HTK+A ve HTK gruplarında zamanla ALP değerlerindeki değişim



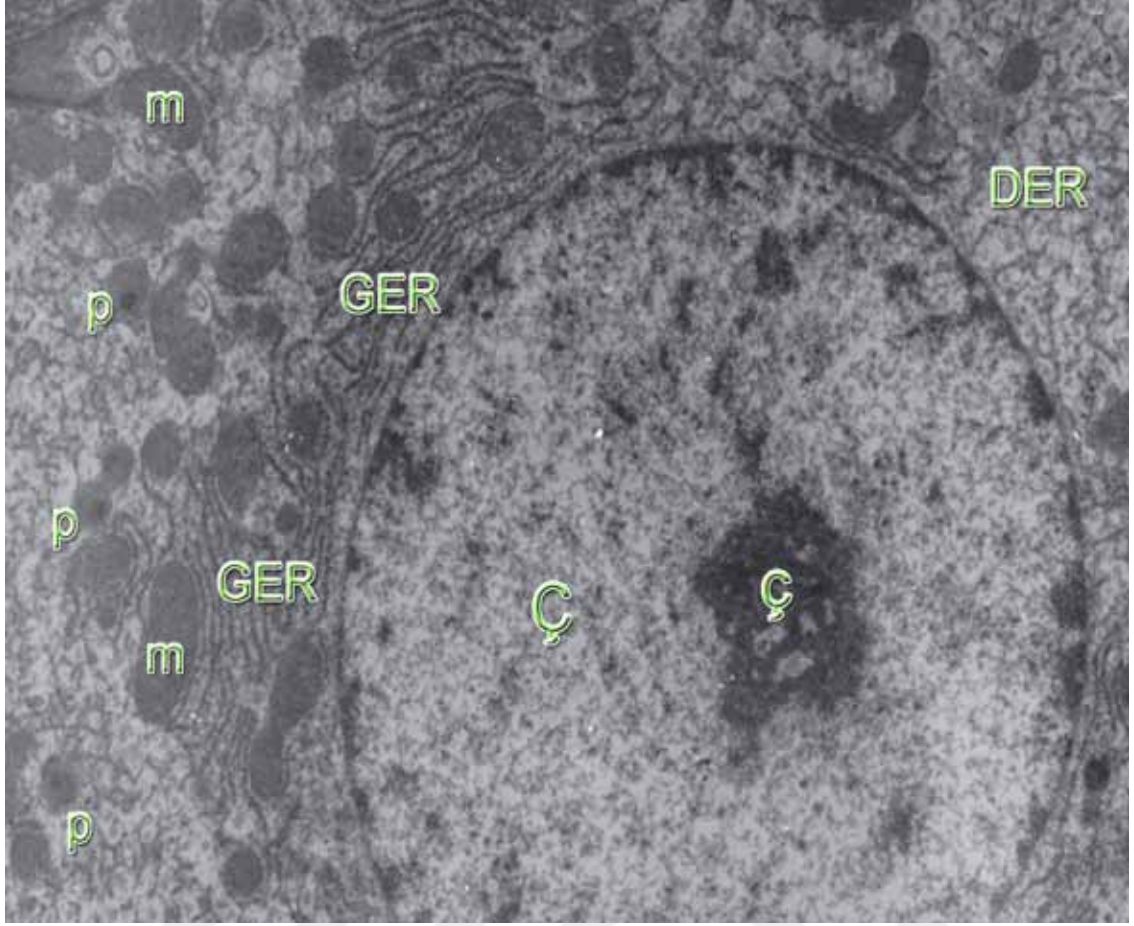
Grafik-27: RL+A ve RL gruplarında zamanla ALP değerlerindeki değişim



Grafik–28: UW+A ve HTK+A gruplarında zamanla ALP değerlerindeki değişim

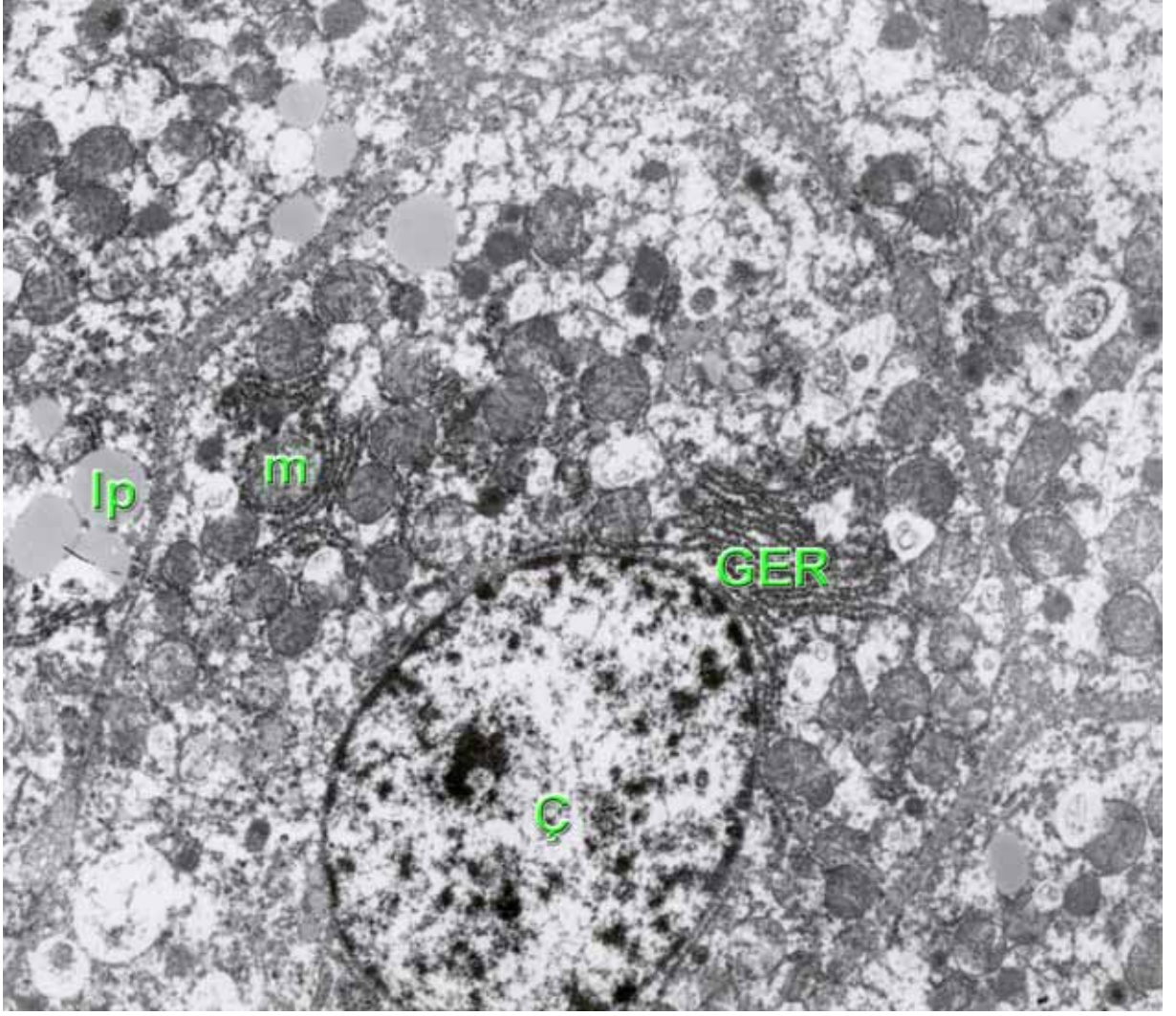
5.3. Histolojik Bulguların Değerlendirilmesi

İnce yapı düzeyindeki incelemelerde, altı deney grubu karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde kontrol grubuna en yakın ve en iyi korunmuş örneklerin UW+A grubunda olduğu görülmektedir. Bunu sırasıyla HTK+A, UW ve RL+A izlemektedir. HTK ve RL grubu ise korunması en bozuk olan gruplardır. Genel olarak, tüm gruplarda bazı hepatositlerin ince yapı düzeyinde izlenen lipid damlacıkları bulundurdıkları saptanmış ancak bunun tüm deney gruplarında izlenmiş olması nedeniyle dış etkenlere (muhtemelen ratların iyi beslenmiş olması buna sebep olabilir) bağlı olarak oluştuğu düşünülmüştür.

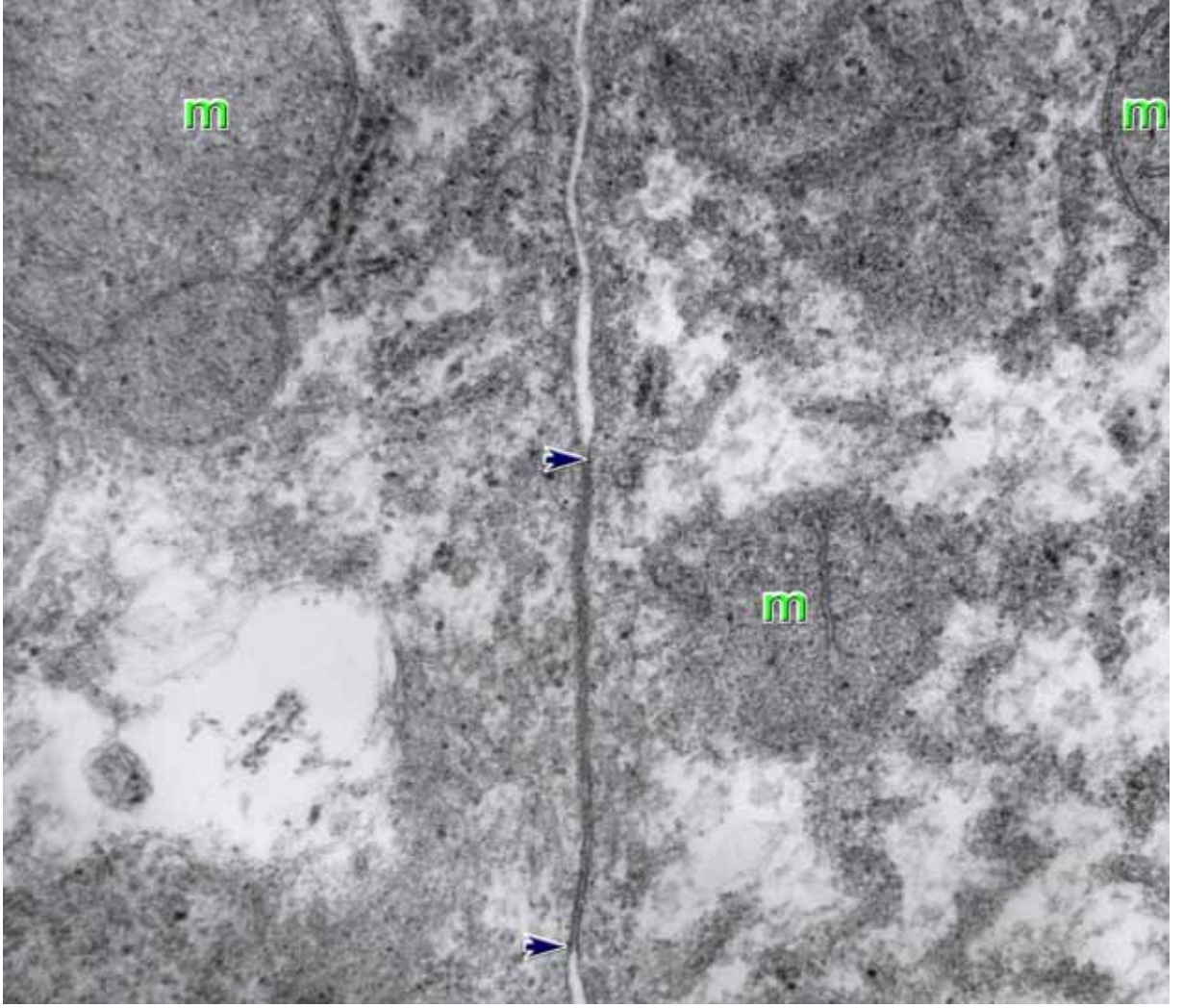


Resim-7: Normal sıçan karaciğeri ince yapısı. Orta büyütmedeki bu elektron ikrografta, bir hepatositin ince yapısı izlenmektedir. Çekirdek (Ç) ökromatinden zengin aktif görünümüyle ve belirgin çekirdekçığı (ç) ile dikkati çekmektedir. Organelden zengin sitoplâzmada granüllü endoplazma retikulum (GER) sisternaları, düz yüzlü endoplazma retikulumu (DER), çok sayıda mitokondriyon (m) ve birkaç peroksizom (p) izlenmektedir. Uranil asetat-kurşun sitrat, orijinal büyütme X4646- gerçek büyütme yaklaşık 16000.

RL GRUBU

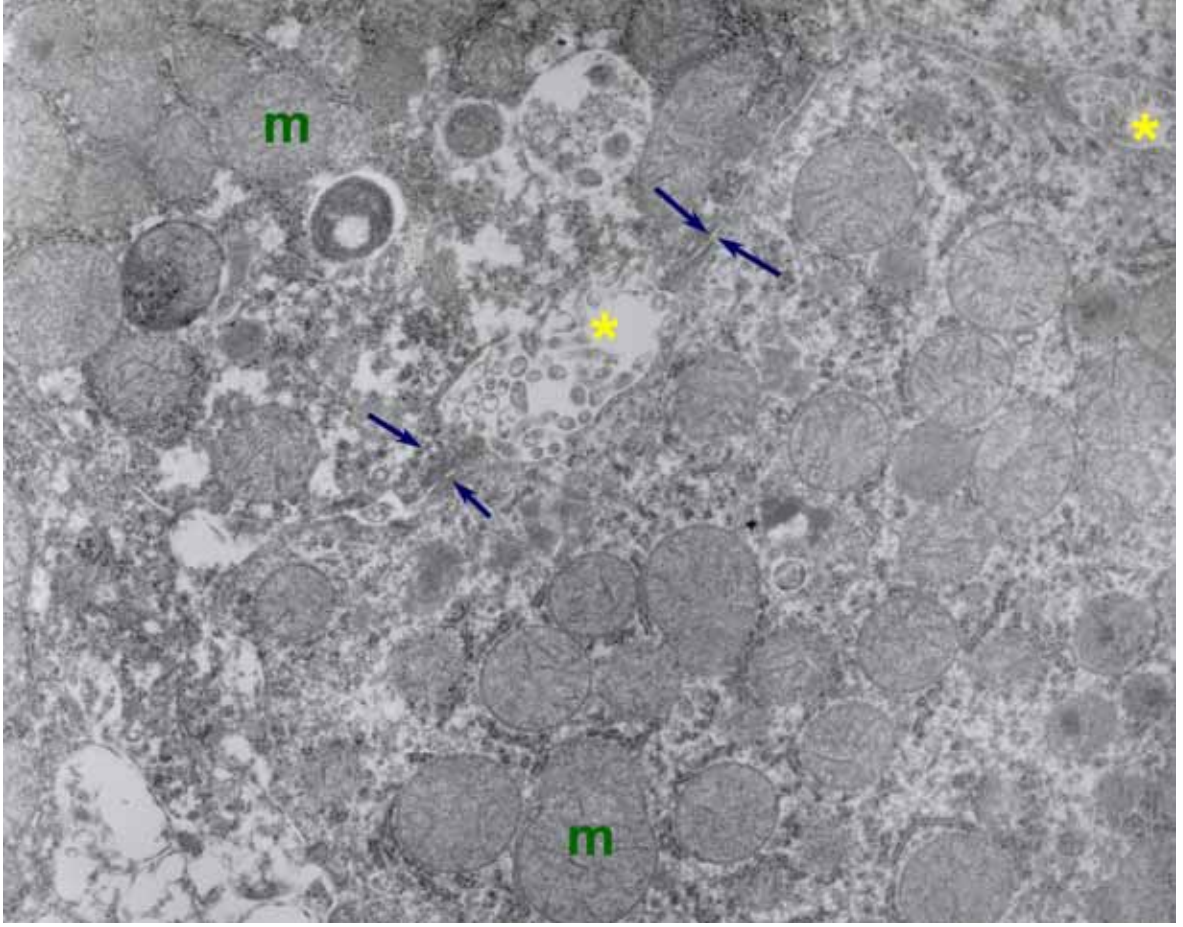


Resim-8: Ringer laktat grubuna ait örnekte bir hepatosit komşuluğundaki, hepatositlerin sitoplâzmalarının bir bölümü görülmektedir. Merkezdeki hepatositin çekirdeği (Ç) ökromatinden zengin görünümlü olup çekirdekçiği izlenmektedir. Sitoplâzmada kontrol grubundaki organellere ek olarak az sayıda lipid damlacığının (lp) bulunduğu görülmektedir. Hücrenin perinükleer bölgesinde granüllü endoplazma retikulumu (GER) profillerinin varlığı belirgindir. Sitoplâzmada çok sayıda mitokondriyonun (m) bulunmasının yanında kontrol grubuna oranla daha fazla oranda dejeneratif değişiklikler gösteren organelin de bulunduğu dikkati çekmektedir. Genel görünümüyle hücreler orta derecede korunmuş izlenimini yansıtmaktadır. Uranil asetat-kurşun sitrat, orijinal büyütme X4646- gerçek büyütme yaklaşık 16000.

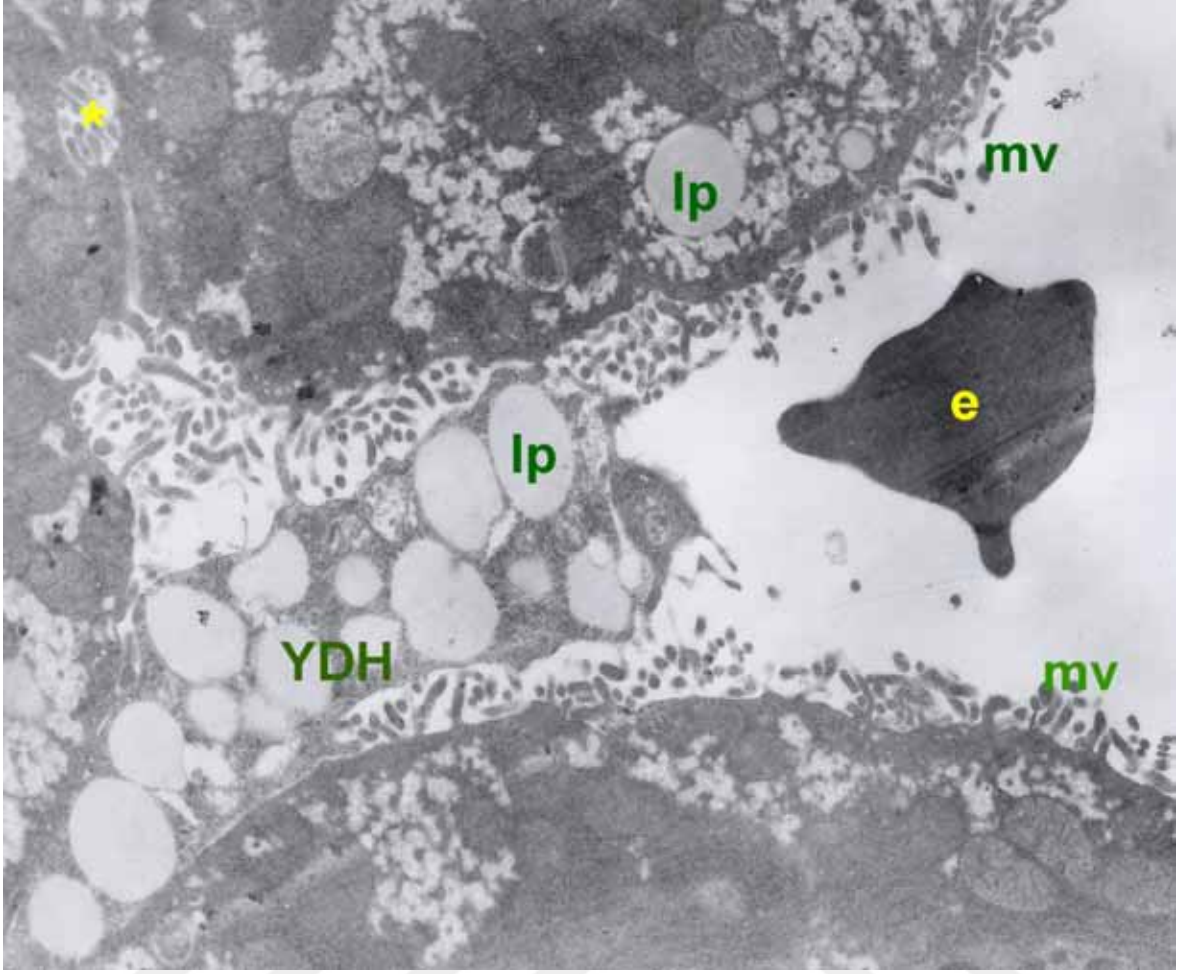


Resim-9: Ringer laktat grubuna ait diğer bir örnekte iki hepatositin komşuluğu büyük büyültmede izlenmektedir. Komşu hücre zarlarının arasında okbaşları ile işaretlenmiş bölgede neksus (gap junction) belirgin olarak izlenmektedir. Komşu hepatosit sitoplâzmalarında normal görünümlü mitokondriyonların (m) ve az sayıda granüllü endoplazma retikulum sisternasının yanında belirgin ince yapı özelliklerini yitirmiş alanların varlığı da dikkati çekmektedir. Uranil asetat-kurşun sitrat, orijinal büyütme X35970- gerçek büyütme yaklaşık 125000.

RL+AMİFOSTİN GRUBU

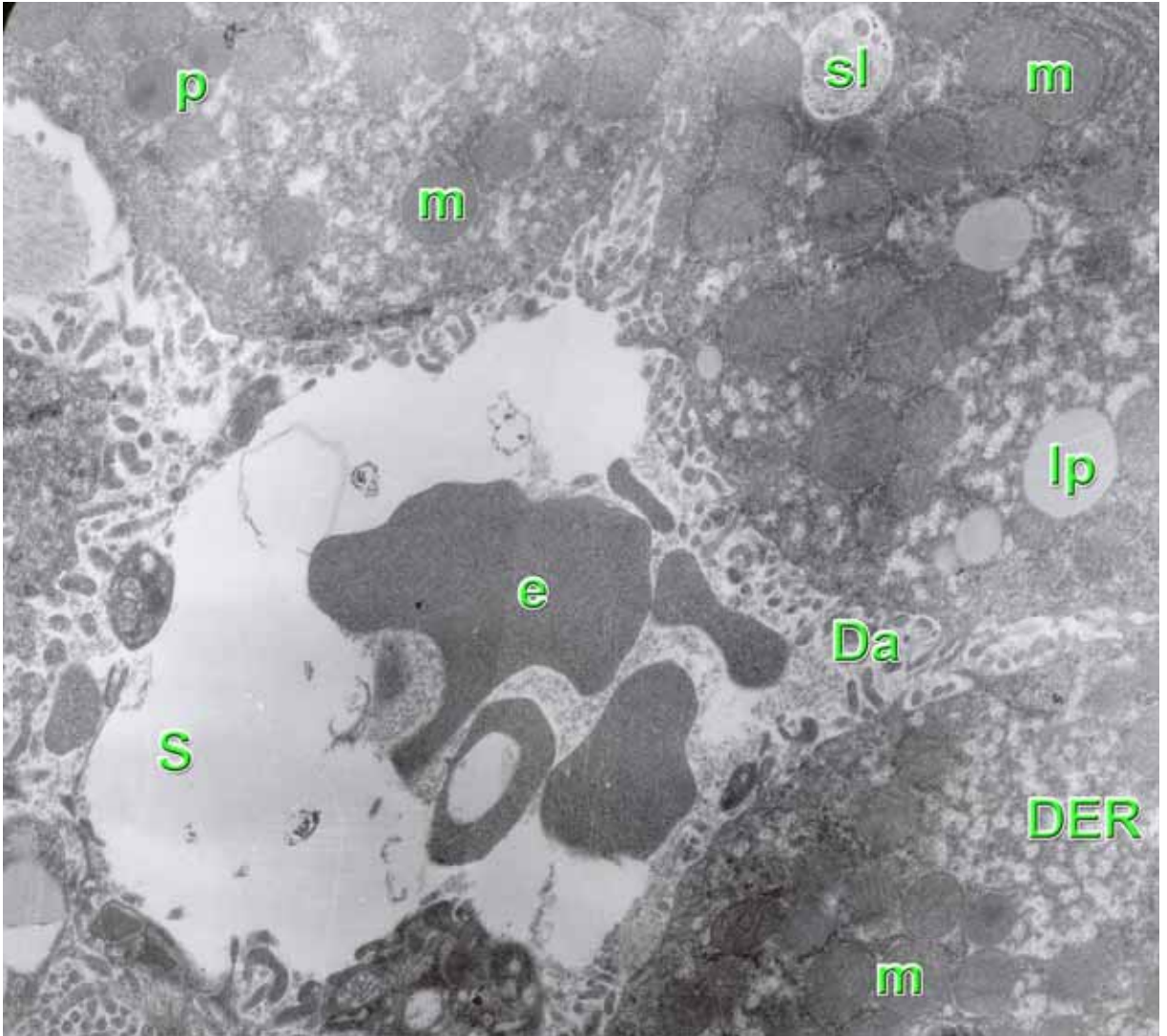


Resim-10: RL+A deney grubuna ait kesitte hepatositlerin komşu olduğu bir alanın büyük büyültmede bir elektron mikrografıdır. Bir safra kapillerine (yıldız) komşu iki hepatositin sitoplâzmalarının mitokondriyondan (m) çok zengin olduğu izlenmektedir. Mitokondriyonlar içyapıları ve kristaları ile normal görünümündedirler. Mitokondriyonların arasında Granüllü ve düz yüzlü endoplazma retikulumu sisternaları dağınık olarak izlenmektedir. Safra kapillerini sınırlayan komşu hücre zarları (oklar) hücreler arası bağlantı birimleri yer almaktadır. Sağdaki hepatositin sitoplâzmasında komşu üç peroksizom birlikte görülmektedir. Soldaki hepatositin sitoplâzmasında ise safra kapillerine komşu sitoplazmik bölgede organel hasarı mevcuttur. Aynı alanda birkaç sekonder lizozom (otofagozom?) ve bir multiveziküler cisim izlenmektedir. Uranil asetat-kurşun sitrat, orijinal büyütme X4646- gerçek büyütme yaklaşık 17500

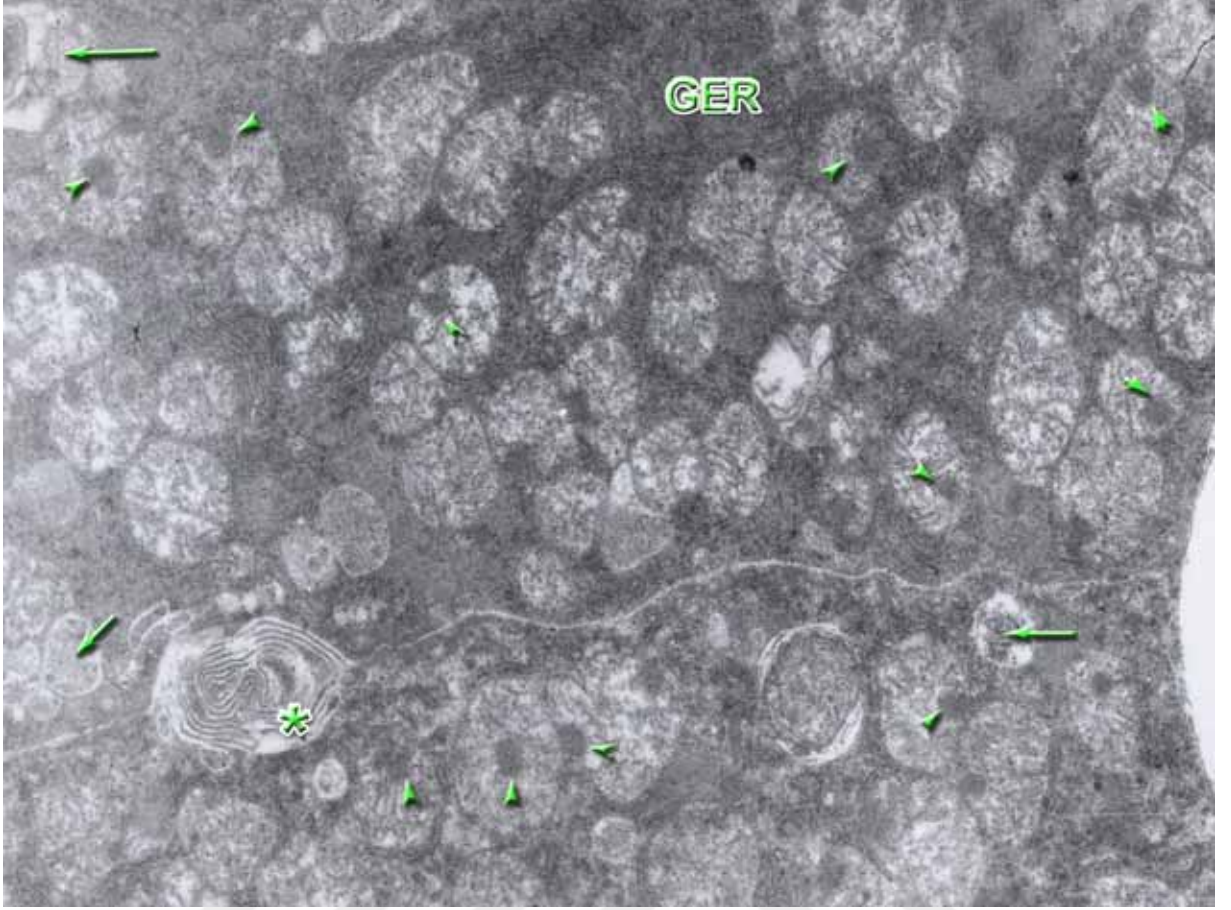


Resim-11: Yine RL+A grubuna ait diğ er bir kesitte sinuzoide komş u alanda hepositler ve perisinozidal alanda bir yağ depo hücresi (YDH) görölmektedir. Sinuzoid lümeninde deforme (atipik krenasyon gösteren) bir eritrosit (e) bulunmaktadır. Hepositlerin sinuzoide bakan yüzlerinde çok sayıda düzensiz mikrovillus izlenmektedir ancak sinüzoid endoteli yağ deposuna komş u bölge dışında çoğ u alanda izlenmemektedir. Sol üst köş ede komş u hepositler arasında bir safra kapilleri (*) kesiti görölmektedir. Bu alanda komş u hepositlerin zarları yapısal bütönlüğ ünü korumuş ve safra kapillerini sıkı baplantılarla sınırlamış olarak izlenmektedir. Hepatositlerin GER ve mitokondriyondan yoğun bölümleri normal görünmekle birlikte ara kompartmanlardaki düzyüzlü endoplazma retikulumu sisternaları daha dilate olarak görölmektedir. Uranil asetat-kurş un sitrat, orijinal büyütme X6000- gerç ek büyütme yaklaşık 21.500.

HTK GRUBU

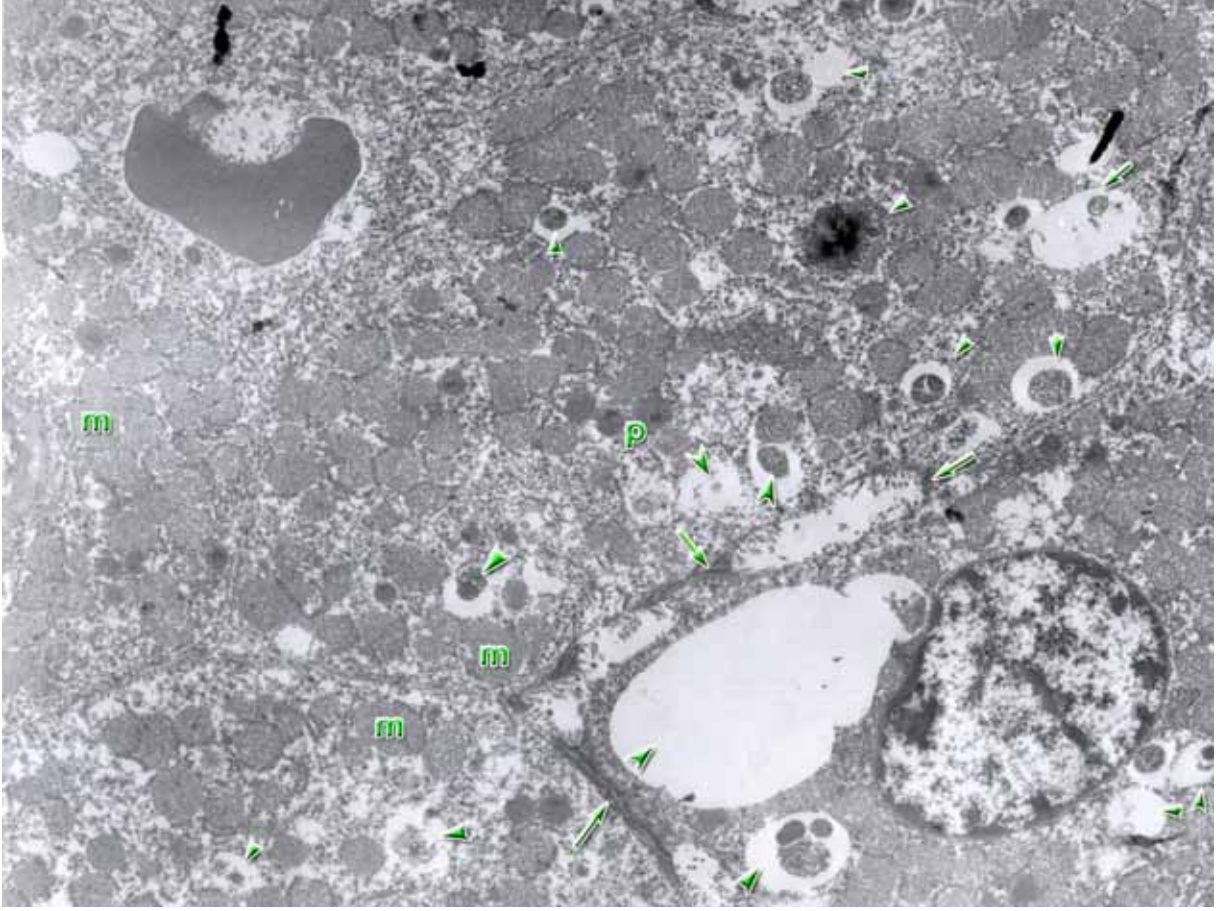


Resim-12: HTK deney grubuna ait diğerk bir örnekte bir hepatosit bir sinüzoidi (S) çevreleyen hepatositler ile komşu alandaki Disse aralıkları (Da) izlenmektedir. Sinüzoid lümeninde atipik görünümlü eritrositler (e) görölmektedir. Sinüzoid endoteli kesitlerine yer yer rastlanmaktadır. Hepatositlerin Disse aralığına bakan yüzünde düzensiz mikrovilluslar seçilmektedir. Hepatositlerin bu bölgedeki sitoplazmik kompartmanlarında lipid damlacıkları (lp), mitokondriyonlar (m) ve düz yüzlü endoplazma retikulumu profilleri (DER) ve birkaç peroksizom (p) seçilmektedir. Hücrelerin ince yapısı orta derecede korunmuştur. Hücrelerden birinde otofagozom nitelikli bir sekonder lizozom (sl) işaretlenmiştir. Uranil asetat-kurşun sitrat, orijinal büyütme X6000- gerçek büyütme yaklaşık 21500.

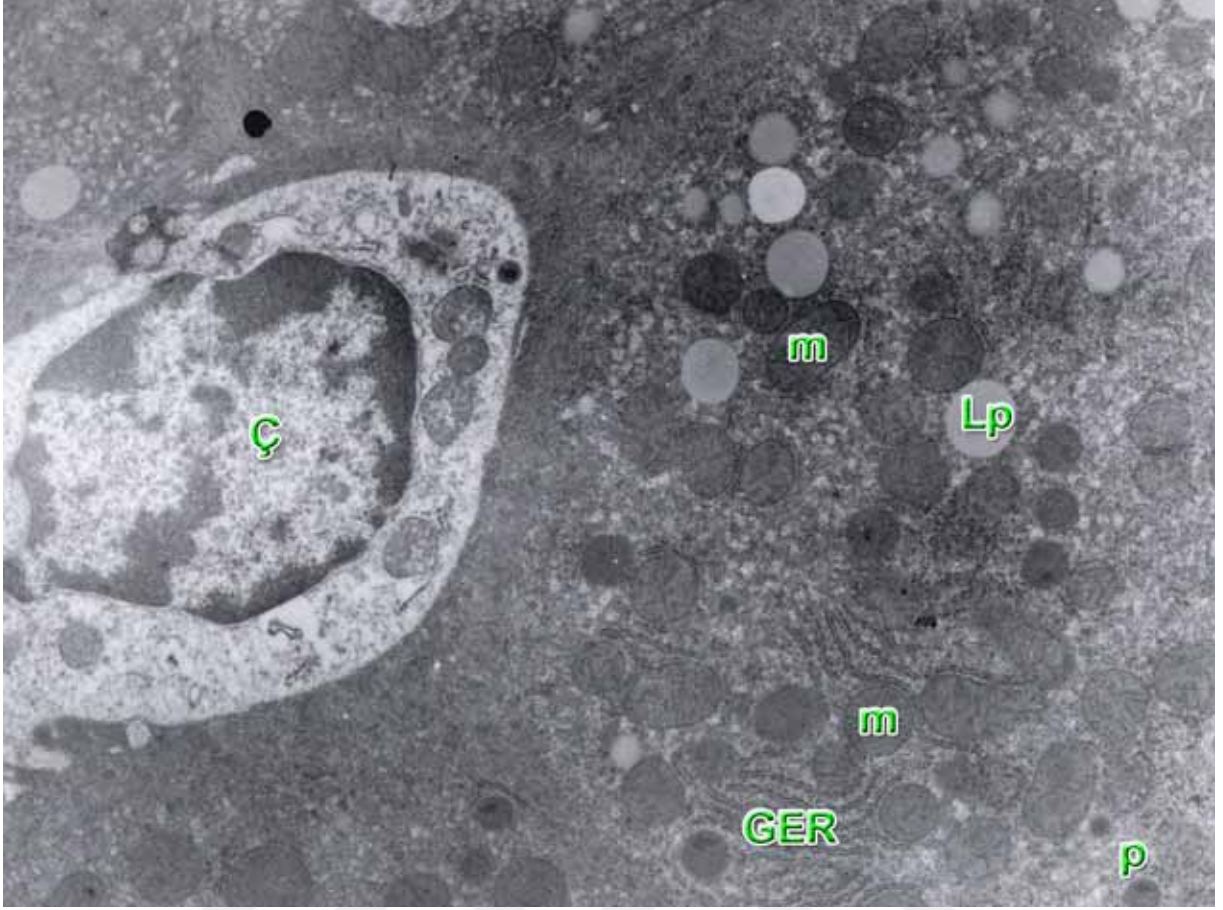


Resim-13: HTK deney grubuna ait diğerk bir örnekte komşu iki hepatositin sınır bölgesi ve bir safra kanalikülü (*) daha büyük büyültmede izlenmektedir. Safra kanalikülündeki mikrovilluslar alışlagelenden farklı olarak lameller bir süzen oluşturur biçimde ve dejeneratif değişiklikler gösterir şekilde izlenmektedir. Hepatositlerin sitoplâzmalarındaki çok sayıda mitokondriyonda ise olağandan çok daha fazla oranda ve iri yoğun matriks granüllerinin (ok başları) varlığı dikkati çekmektedir. Mitokondriyon dejenerasyonuna ait bazı figürler de oklarla işaretlenmiştir. Granüllü endoplazma retikulumu (GER) sisternalarını içeren bölümler de daha elektron yoğun olarak görülmektedir. Uranil asetat-kurşun sitrat, orijinal büyütme X7750- gerçek büyütme yaklaşık 27000.

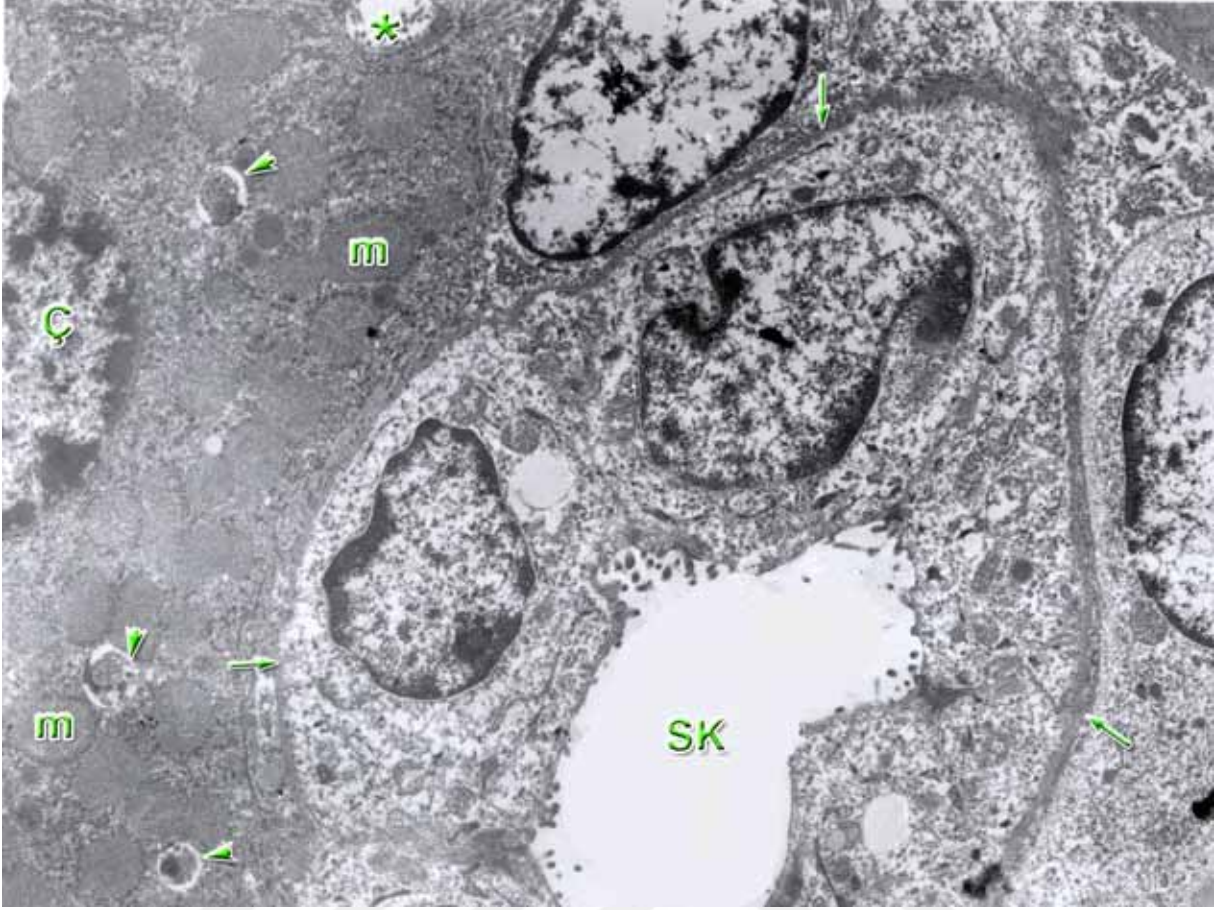
HTK + AMİFOSTİN GRUBU



Resim-14: HTK+A grubuna ait karaciğer örneğinin küçük büyültmedeki elektron mikrografında hepatositler ile içinde bir eritrositin bulunduğu granüle materyalle dolu bir sinüzoid izlenmektedir. Hepatositlerde mitokondriyonlar(m) ve peroksizomlar (p) ayırt edilmekte olup aralarında yer yer granüllü enoplazma retikulumu sisternaları izlenmektedir. Sinüzoid çevresinde zar yapılar net olraka seçilememektedir. Hepatositlerin sitoplazmasında çok sayıda dejenere organel içeren otofajik vakoul (ok başları) bulunmaktadır. Oklarla sınırları işaretlenmiş bir safra kanalikülü de genişlemiş lümeni ile ayırt edilmektedir. Genel olarak ince yapı özellikleri zayıf/orta derecede korunmuş görülmektedir. Uranil asetat-kurşun sitrat, orijinal büyütme X2784- gerçek büyütme yaklaşık 9700.

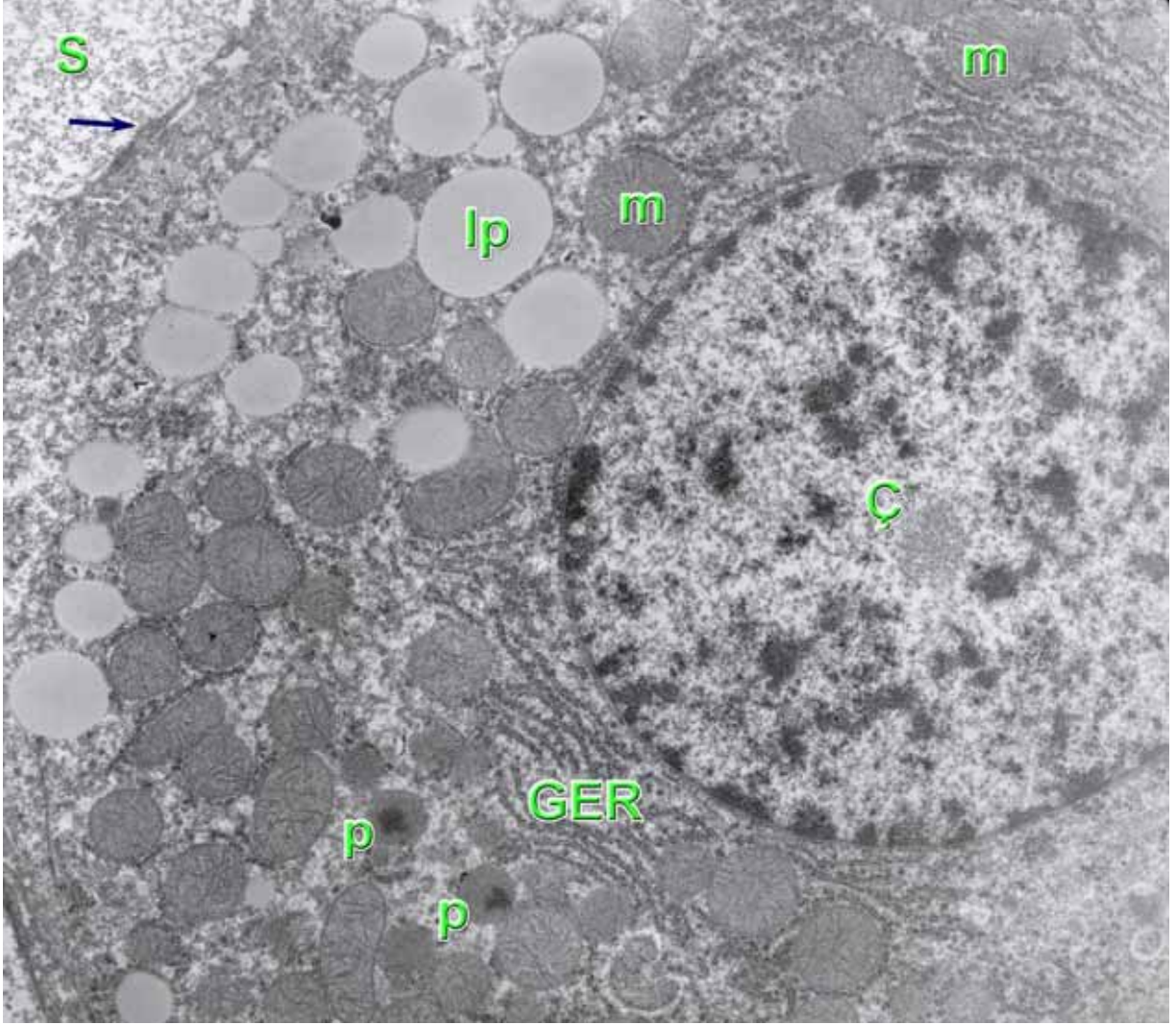


Resim-15: Yine HTK+A grubuna ait diğer bir kesitte bir hepatosit ve bir lenfosit (pit hücresi) izlenmektedir. Küçük lipid damlacıkları da (Lp) içeren hepatositin sitoplâzmasında mitokondriyonlar (m), granüllü endoplazma retikulumu (GER) ve peroksizomlar normal yapılarında izlenmektedir. Hücrelerin korunma düzeyi önceki örneğe oranla daha iyi görünmektedir. Uranil asetat-kurşun sitrat, orijinal büyütme X4646-gerçek büyütme yaklaşık 16000.

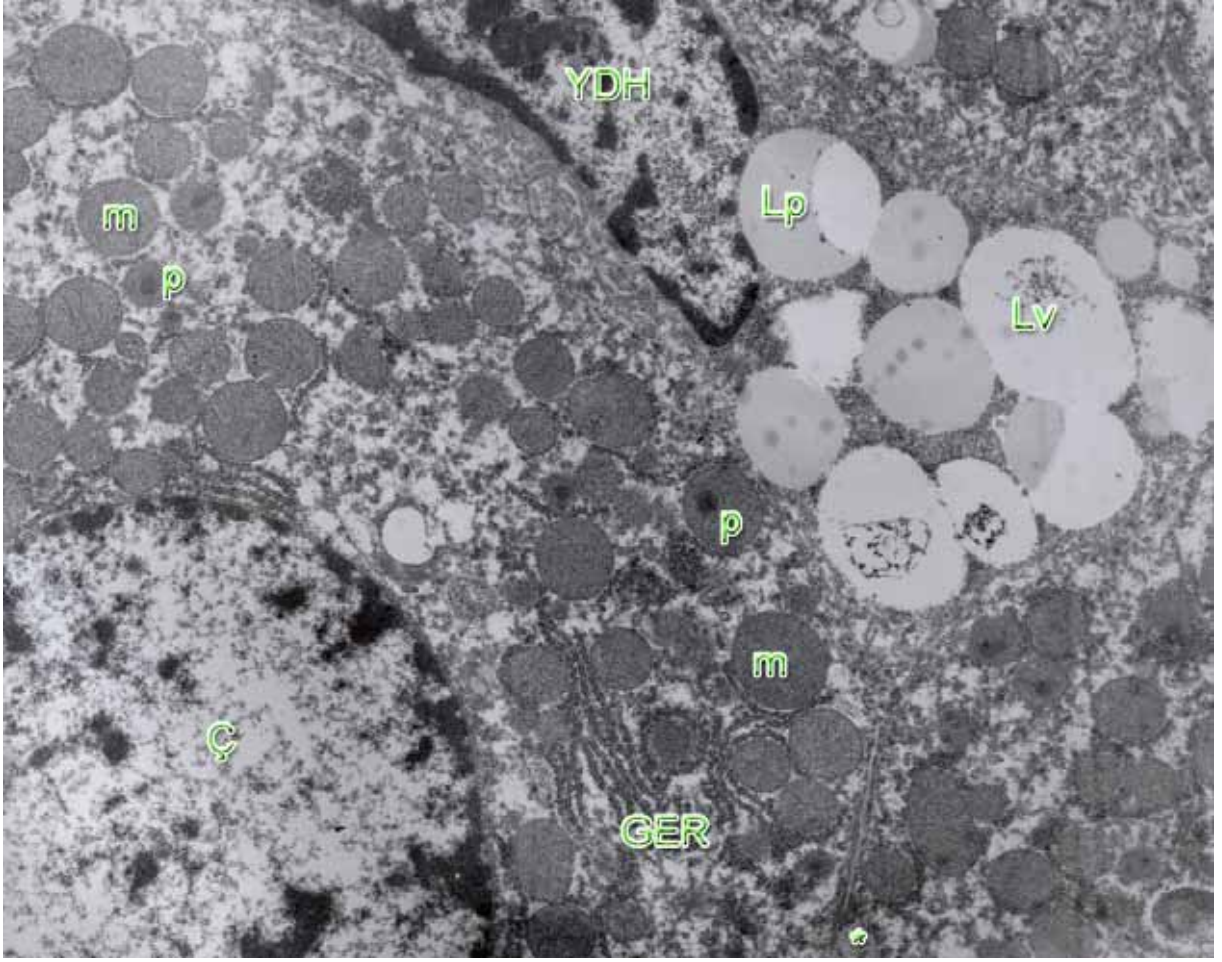


Resim-16: HTK+A grubuna ait karaciğer örneğinde bir lobülün periferik kompartmanı ile portal aralık izlenmektedir. Ortada görülen safra kanalı (SK) bazal lamina (ok) ile çevrelenmiştir. Solda görülen komşu hepatositin göreceli olarak elektron yoğun sitoplâzmasında çekirdek (ç) ve mitokondriyonlar (m) ayırt edilmektedir. Hücrede sekonder lizozomların (ok başları) bulunduğu izlenmektedir. Otofajik vakuol niteliğindeki bu yapılar organel yıkımının bir işaretçisidir. Sol üstte bir safra kanalikülü (*) de ayırt edilmektedir. Uranil asetat-kurşun sitrat, orijinal büyütme X3597- gerçek büyütme yaklaşık 9700.

UW GRUBU

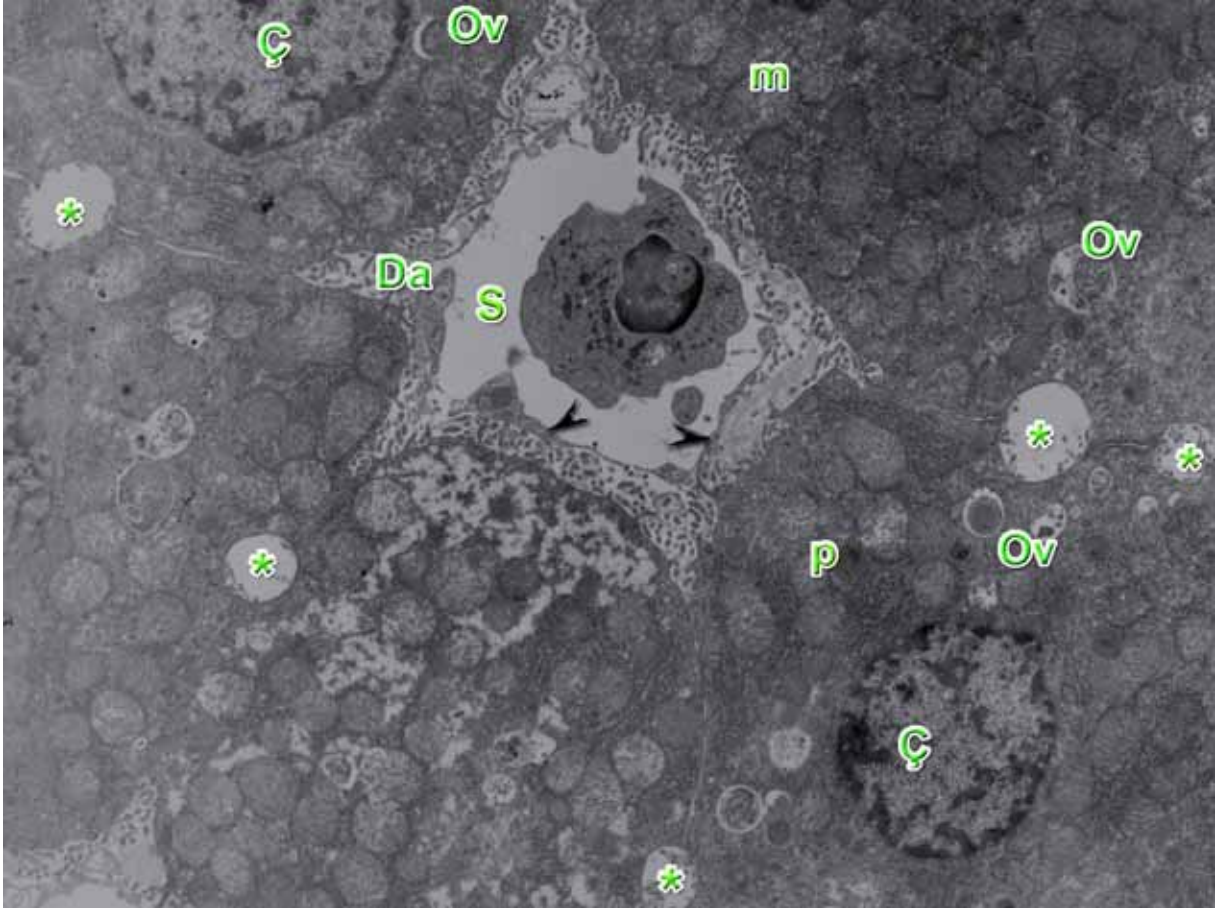


Resim-17: UW grubuna ait bir örnekte bir hepatosit ve komşuluğundaki granüle materyal içeren sinüzoid (S) orta büyültmede izlenmektedir. Hücrenin RL grubuna orana ince yapı düzeyinde çok daha sağlıklı bir görünümde olduğu izlenmektedir. Sinüzoid endoteli (ok)' ne komşu sitoplâzma kompartmanında çok sayıda küçük lipid damlacığının (lp) bulunduğu izlenmektedir. Çekirdek (ç) ökromatinden zengindir. Organelden çok zengin sitoplâzmada sağlıklı görünümde mitokondriyonlar (m), granüllü endoplazma retikulumu sisternaları (GER) ve birkaç peroksizom'un (p) bulunduğu görülmektedir. Ringer laktat grubundaki boyutta bir atipik organel varlığı bulunmadığı dikkati çekmektedir. Uranil asetat-kurşun sitrat, orijinal büyütme X6000- gerçek büyütme yaklaşık 21500.

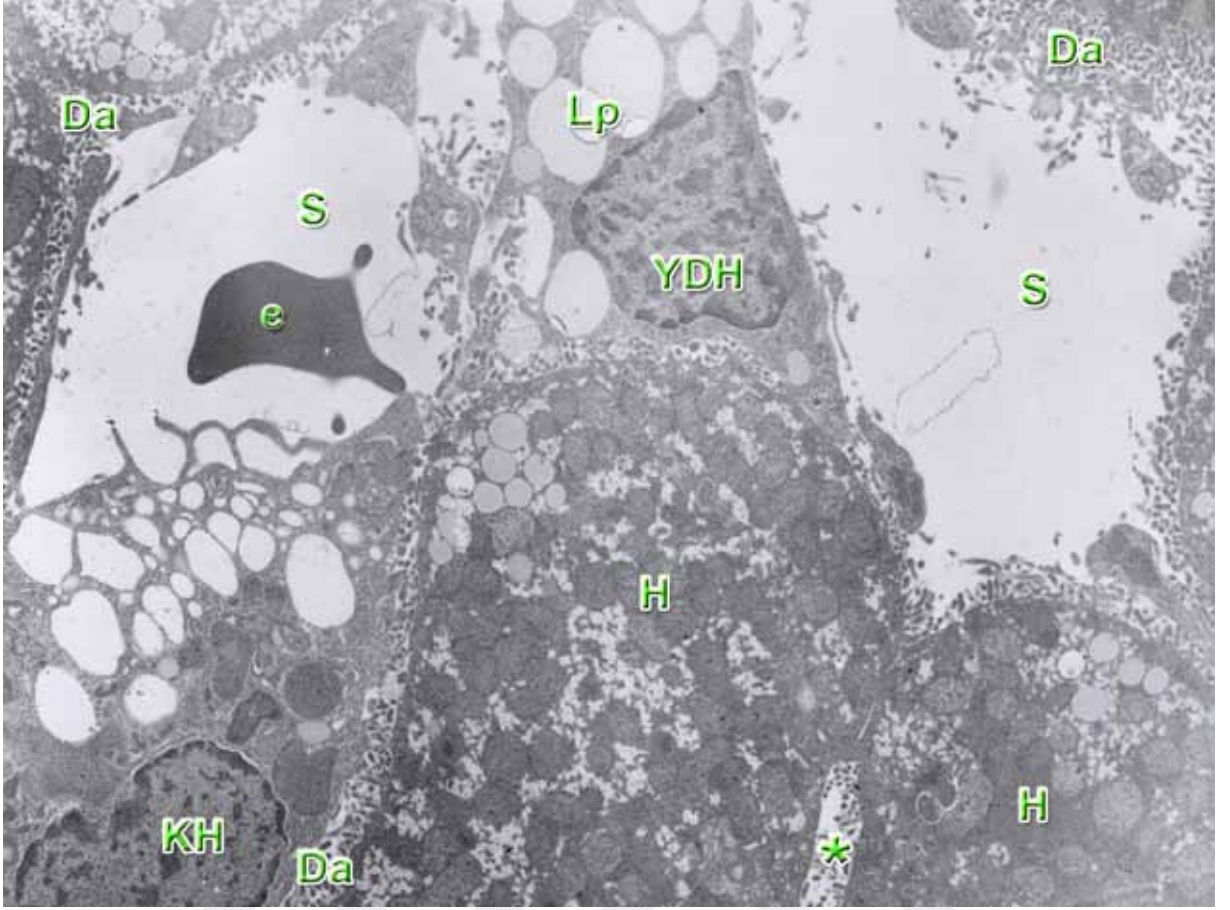


Resim-18: UW deney grubuna ait diğ er bir ö rnekte bir hepatosit ile komş u yağ depo hücre si (YDH) izlenmektedir. Ç ok sayıda iri lipid damlacı ğ ı (Lp) içeren yağ depo hücre sinin sitoplâzmasındaki bazı damlacıklar lipid erimiş (fiske olmamış) ve vakuol ş eklinde (Lv) görö lmektedir. Hepatositin ö kromatinden zengin çekirde ğ i (Ç) ve organelden zengin sitoplâzması izlenmektedir. GER: granö llü endoplazma retikulumu, m: mitokondriyon, p:peroksizom. Komş u hepatosit sınırında bir safra kanalikö lü (*) seçilmektedir. Uranil asetat-kurş un sitrat, orijinal büyü tme X4646- gerç ek büyü tme yaklaşık 16000.

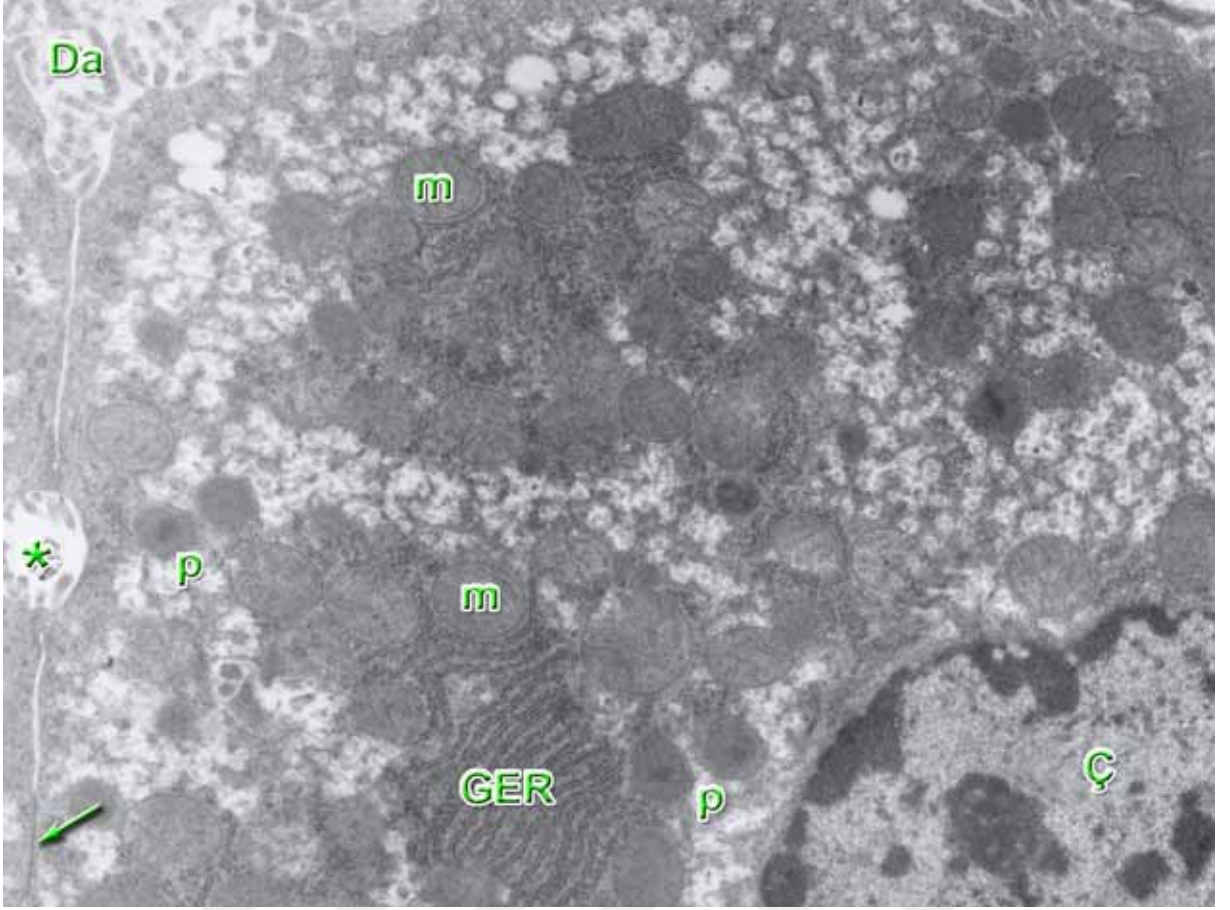
UW + AMİFOSTİN GRUBU



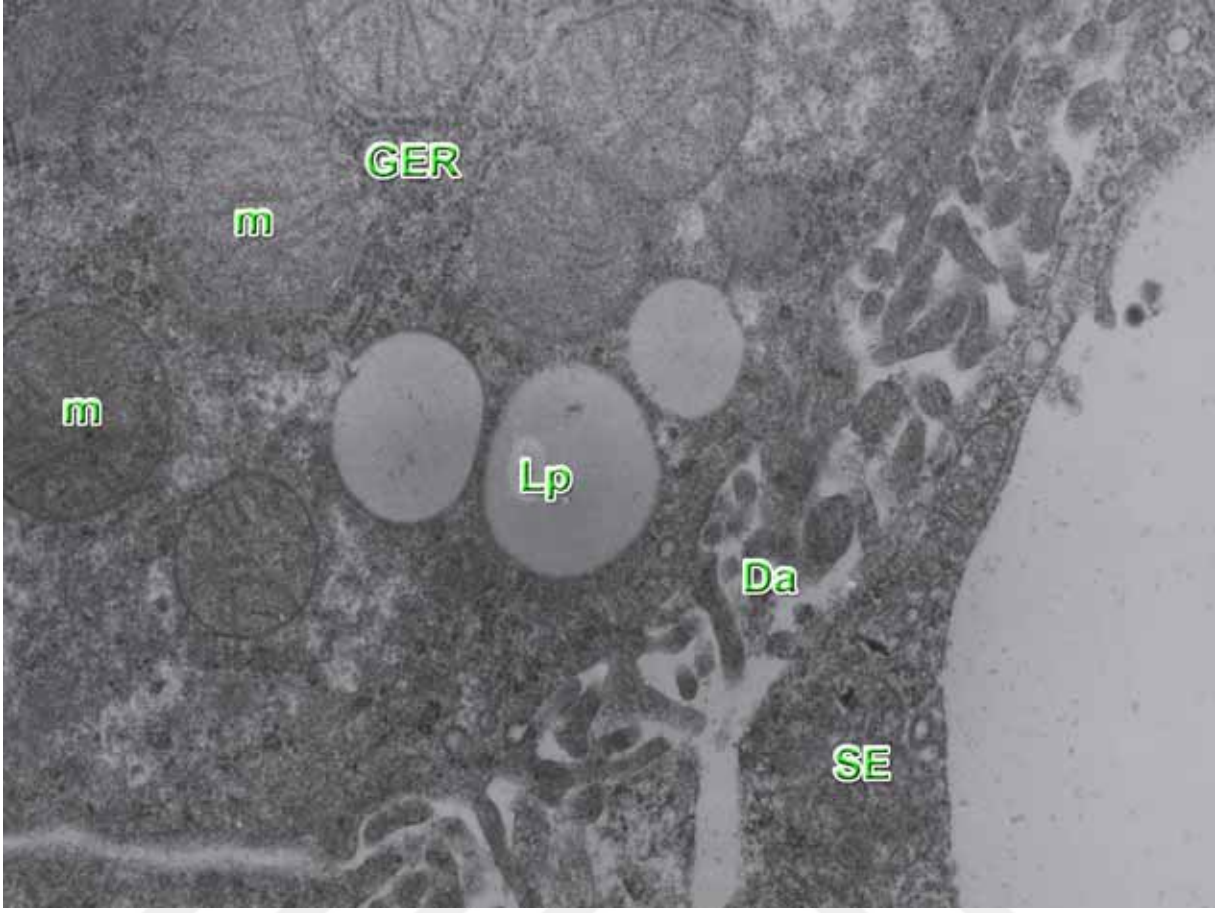
Resim-19: UW+A deney grubuna ait örneğin küçük büyültmede elektron mikrografında bir sinüzoid ve çevresindeki hepatositler izlenmektedir. Sinüzoid endoteli (oklar) ve Disse aralığındaki (Da) mikrovilluslar ayrıntılı olarak izlenmektedir. Sağdaki oka komşu Disse aralığında retiküler lif demeti de gözlenmektedir. Mitokondriyondan (m) zengin hepatositlerin sitoplazmasında granüllü ve düz yüzlü endoplazma retikulumunu yanında birkaç peroksizom (p) ve otofajik vakuol (Ov) ayırt edilmektedir. Dikkati çeken diğer bir bulgu da safra kanaliküllerinin (*) ileri derecede dilate ve mikrovilluslarının silinmiş olmasıdır. Genel görünümüyle doku ince yapısı korunmuştur. Uranil asetat-kurşun sitrat, orijinal büyütme X2784- gerçek büyütme yaklaşık 9700.



Resim-20: UW+A deney grubuna ait diğerk bir örneğink küçük büyültmede elektron mikrogramında lümeninde bir eritrositin (e) bulunduğuk bir sinüzoid, sinüzoid duvarındaki Kupffer hücresi (KH) ve lipid damlacıkları (Lp) içeren yağ depo hücresi (YDH) ile komşu hepatositler izlenmektedir. Mitokondriyondan zengin hepatosit sitoplâzmasında Disse aralığına yakın yerleşimde küçük lipid damlacıkları mevcuttur. İki hepatosit arasında yerleşik safra kanalikülü (*) izlenmektedir. Genel görünümüyle her üç hücrenin de ince yapı özellikleri korunmuştur. Kupffer hücresi sitoplâzmasında vakuoller ve sekonder lizozomlar bulunmaktadır. Hepatosit sitoplâzmasında da az sayıda otofajik vakuol mevcuttur. Bunun dışında olağan organel dağılımı izlenmektedir. Uranil asetat-kurşun sitrat, orijinal büyütme X2784- gerçek büyütme yaklaşık 9700.



Resim-21: Aynı gruba ait diğer bir örneğin orta büyültmedeki elektron mikrogramında bir hepatosit ve komşuluğu izlenmektedir. Sol üstte Disse aralığı (Da), sol ortada bir safra kanalikülü (*) ve solt alta da komşu hücreler arasındaki neksus (ok) izlenmektedir. Hepatosit sitoplâzmasında granüllü endoplazma retikulumu (GER), mitokondriyonlar (m) ve peroksizomlar (p) ayırt edilmektedir. Çekirdek (ç) , hücre zarları, hücre bağlantıları ve organellerin olağan ince yapı özelliklerini taşıdıkları izlenmektedir. Uranil asetat-kurşun sitrat, orijinal büyütme X6000- gerçek büyütme yaklaşık 21500.



Resim-22: Bu grubun diğeri bir örneğinde daha büyük büyültmede bir hepatositin Disse aralığına (Da) bakan yüzü ve aralıktaki mikrovilluslar izlenmektedir. Sinüzoid endotel hücresi (SE) aralığı sinüzoid tarafından sınırlamaktadır. Mitokondriyonlar (m) ve granüllü endoplazma retikulumu normal ince yapı özelliklerini yansıtmaktadırlar. Uranil asetat-kurşun sitrat, orijinal büyütme X12930- gerçek büyütme yaklaşık 45000.

6.TARTIŞMA

Günümüzde karaciğer transplantasyonu fulminan karaciğer yetmezliği, başka cerrahi ve medikal tedavilere yanıt vermeyen terminal dönemdeki kronik karaciğer hastalıkları, bazı metabolik karaciğer hastalıkları, karaciğerin primer ve nöroendokrin tümör metastazlarında daha fazla olmak üzere sekonder tümörleri ve alveolar kist hidatik gibi bazı parazitik hastalıkların tedavisinde uygulanmaktadır. Karaciğer nakli ile ilgili ilk çalışmalar Welch tarafından köpekler üzerinde yapılmış ve ardından 1963 yılında T.Starzl tarafından insanda ilk karaciğer nakli gerçekleştirilmiştir(1). Fakat başarılı sonuçlar, siklosporin gibi immünsupresif ajanların kullanıma girmesiyle alınmaya başlanmıştır.

Artan cerrahi teknik, yoğun bakım imkânları, immünsüpresif tedavilerdeki gelişmelere rağmen günümüzde halen belli oranda karaciğer transplantasyonu PNF'a bağlı olarak başarısızlıkla sonuçlanmaktadır (78,79). PNF, karaciğer transplantasyonu sonrası ölümcül bir komplikasyondur. PNF, nakil sonrası serum KCFT yüksekliği, safra üretiminin azalması ve ciddi koagülopati görülmesi şeklinde tanımlanabilir (80–81). Karaciğer transplantasyonu sonrası PNF gelişiminden birçok faktör sorumludur. Bunların içinde cerrahi teknik, prezervasyon hasarı, donör organın histopatolojik yapısı ve sıcak iskemi periyodunda gelişen hasarlar önemli rol oynar. Bu çalışmada prezervasyon sürecinde meydana gelen ve PNF gelişmesinde belki de en önemli faktör olan prezervasyon hasarı incelendi.

Organ prezervasyonunda temel amaç, transplante edilen organı normal işlevini kazanana kadar hipotermide tutmak, hücresel şişmeyi önlemek ve serbest radikallere bağlı gelişen hücresel hasarı minimalde tutmaktır. İskemi gibi travmalardan sonra azalan hücre içi oksidatif fosforilasyon mekanizmaları sonucunda ATP azalırken, hücre içi AMP düzeylerinde belirgin artış saptanmaktadır. Bu AMP oksijenli koşullarda sırasıyla hipoksantin, ksantin ve üre dönüşüm yolunu izlerken oksijensiz ortamda elektron alıcısı olarak NAD⁺ yerine moleküler oksijeni kullanmakta, bunun sonucu olarak da süperoksit anyon radikali ve hidrojen peroksit üretimine yol açmaktadır.

Karaciğerde, iskeminin oluşturduğu doku hasarının, reperfüzyonun sağlanması ile daha da arttığı birçok deneysel çalışmada gösterilmiştir (82–84). Reperfüzyon hasarının ortaya çıkmasında, en çok sorumlu tutulan mekanizma endotel hücreleri, kupffer hücreleri ve nötrofillerden salınan SOR'dir (85,86).

Bu hasar mekanizmasının anlaşılması ile yeni cerrahi teknikler geliştirmiş ve hasarı önlemeye yönelik, antioksidan ve sitoprotektif ajanlar araştırılmıştır (87–91). Bu ajanlar, oksidatif stresin değişik basamaklarında, stresin yarattığı olumsuz etkileri ortadan kaldıran antioksidan moleküllerdir.

Amifostin, ilk kez 1969 yılında Yuhas ve arkadaşları tarafından hayvan deneylerinde kullanılmış ve sıçanlarda cilt ve kemik iliğini kemoterapötik ilaçların toksik etkilerine karşı koruduğu gösterilmiştir (92). Daha sonra yıllarca hayvan deneyleri ile etkinliği araştırılmış ve 1992 yılında ilk anlamlı klinik kullanımın sonuçları yayınlanmıştır (93,94). Amifostin, antioksidan ve sitoprotektif bir ajan olup, SOR'ni temizleyebilen bir ilaçtır. Sağlıklı hücrelerin membran bağımlı alkalen fosfataz enzim aktivitesi yüksek iken hipoksik ve kanser hücrelerinin membran lipid yapısında meydana gelen değişiklikler sebebiyle bu enzimin aktivitesi oldukça düşmektedir (95). Bu yüzden amifostinin etkin olabilmesi için hücrede hasar oluşmadan önce kullanılması gerekir. Aksi takdirde hipoksi geliştikten sonra verilen ilaç hücre içine geçemeyecek ve aktif metabolitine (WR1065) dönüşemeyecektir.

Amifostinin i.v. kullanımından sonra 1 dakika içinde plazma düzeyi maksimuma ulaşırken 6 dakika sonra <5'i plazmada kalır. İdrarda saptanan düzey ise bunun sadece % 2'si kadardır. Dolayısı ile geriye kalan % 98 'lik kısmı hücreye geçer ve burada uzun bir süre birikir. Kullanımından 30 dakika sonra normal dokularda (kalp, böbrek, karaciğer ve kemik iliği gibi) ölçülen ilaç düzeyi tümör dokusunda ölçülen düzeyin yaklaşık 100 katı kadardır (96–99). Çalışmamızda amifostin hepatektomiden 30 dakika önce subkütan olarak verildi.

Çalışmamızda, amifostin verilen ve verilmeyen 6 grup karşılaştırıldı. Amifostin verilen üç grupta da biyokimyasal olarak ALT ve ALP değerlerinin daha düşük olduğu, histolojik olarak amifostin verilen gruplarda vakuolizasyon, safra kanaliküllerinde hasar ve sinuzoidal epitelde dejenerasyonun daha az olduğu görüldü. İmmünohistokimyasal boyamalarda ise, amifostinli gruplarda hücre hasarının daha az olduğu saptandı. Bu sonuçlar amifostinin hücre koruyucu etkisini göstermektedir.

E.Atık ve arkadaşları, hepatositlerde hasar oluşturan herhangi bir kronik veya akut karaciğer hastalığında yapılan biyopsilerde, hastalığın şiddeti ile hücrelerin iNOS immünperoksidaz boyası ile boyanması arasında ilişki olduğunu göstermişlerdir (73). Yine Miriam Romero ve arkadaşları transplant rejeksiyonunda gelişen hücre hasarının şiddeti ile iNOS boyama arasında ilişki olduğunu göstermişlerdir (74). Çalışmamızda özellikle 12. saatten sonra amifostinli gruplarda istatistiksel olarak iNOS ile daha az boyanma görülmüştür. Amifostinli gruplar içinde ise HTK+A ve UW+A gruplarının birbirine yakın

oranlarda boyandığı görülmektedir. Amifostinsiz gruplar karşılaştırıldığında ise UW grubunun nispeten daha az hepatosit hasarına sebebiyet verdiği görülmektedir. Bu sonuç amifostinin soğuk prezervasyon esnasında gelişen hepatosit hasarını azalttığı hipotezimizi desteklemektedir.

Natori Shiho ve arkadaşları, soğuk iskemi sürecinde sinüzoidal epitel hücrelerinde kaspas bağımlı apoptozisin geliştiğini, buna karşın hepatosit hasarının çok nadir geliştiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada, kaspas inhibitörlerinin kullanımının soğuk iskemik süreçte endotel hücrelerini apoptozise uğramaktan koruduğunu TUNEL testi ile göstermişlerdir (75). Yine Kuo PC ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, soğuk saklama koşullarında meydana gelen hasardan, özellikle karaciğerde apoptozis şeklinde hücre ölümü geliştiği TUNEL testi ile gösterilmiştir (100). Çalışmamızda hepatektomiden sonra tüm gruplarda 0, 6 ve 12. saatlerde TUNEL testi ile apoptozise bakıldı. Amifostin verilen gruplarla verilmeyen gruplar arasında 6. saatten sonra apoptozisin gelişimi açısından istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi. Amifostin verilmeyen gruplar içinde UW ve HTK'nın RL'ye göre daha iyi olduğu görüldü. Bu bulgu RL'nin uygun bir prezervasyon solusyonu olmadığını göstermektedir. Amifostin verilen gruplar incelendiğinde RL grubuna göre UW ve HTK grubunda daha iyi sonuçlar elde edildi. UW kullanımı ile daha iyi sonuç alınmasına rağmen, HTK ile arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Bu sonuçlar ışığında, amifostinin apoptozis ilişkili hepatosit hasarını azalttığı söylenebilir.

A.W. Avolio ve arkadaşlarının HTK veya UW ile perfüzyon uyguladıkları 35 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, genel postoperatif safra yolu komplikasyonları dışında komplikasyon açısından fark olmadığı, safra yolu komplikasyonlarının HTK grubunda daha fazla olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada, UW kullanılan grupta ilk hafta serum AST ve ALT düzeyleri daha yüksek iken daha sonra aynı olduğu saptanmıştır (101). Richard S. Mangus ve arkadaşlarının 378 karaciğer transplantlı hasta üzerinde yaptığı çalışmada HTK ve UW gruplarında greft ve hasta sağkalımı, PNF bulguları ve postoperatif komplikasyonlar açısından istatistiksel hiçbir fark saptanmamıştır (102). Yine aynı ekibin yaptığı başka bir çalışmada, HTK'nın UW'ye nazaran daha hızlı ve kolay hipotermi sağladığı, organı kandan daha çabuk ve efektif temizlediği, buna karşılık UW'nin uzun soğuk iskemi süresine sahip greftleri daha iyi koruduğu belirtilmiştir (103). Richard S. Mangus ve arkadaşlarının 698 standart ve genişletilmiş donör hepatektomi materyalleri üzerinde yaptığı bir başka çalışmada, postoperatif erken dönemde HTK grubunda enzim yüksekliği daha fazla iken, 1. aydan sonra her iki grupta fonksiyonların aynı düzeye indiği,

fakat HTK'nın UW'ye göre biliyer komplikasyonlara daha az sebebiyet verdiği görülmüştür. Yine HTK'nın maliyeti açısından daha uygun olduğu üzerinde durulmuştur (104). Çalışmamızda, biliyer komplikasyonu gösterebilecek olan ALP ve histopatolojik olarak safra kanaliküllerinin yapısı değerlendirildi. Amifostin verilen gruplar arasında ALP değeri açısından anlamlı fark saptanmadı. Fakat histopatolojik incelemede hücre çatısının dolayısıyla safra kanaliküllerinin yapısının UW+A grubunda daha iyi korunduğu saptandı. ALT açısından yapılan değerlendirmede ise UW+A ve HTK+A gruplarının daha iyi olduğu ve bu iki grubun karşılaştırılmasında da UW+A'nın istatistiksel olarak daha iyi olduğu görüldü.

Sonuç olarak, donör karaciğer ihtiyacı her geçen gün artmakta, kadavra organ bekleme listelerinde bekleyen hasta sayılarının ihtiyacı karşılanamamakta ve hastalar bekleme sürecinde hayatlarını kaybetmektedirler. Böyle bir tabloda, çıkan organların korunmasının önemi ortadadır. Bu alanda yapılan çalışmaların ana amacı, transplantasyonun yapılacağı ana kadar geçen sürede, çıkarılan organda soğuk iskemik hasarı en aza indirebilmek ve daha uzun süre muhafaza edebilmek için ideal prezervasyon solüsyonu ve tekniğini bulmaktır. Çalışmamızda, klinikte kullanılan prezervasyon solüsyonları öncesi, sitoprotektif bir ajan olan amifostin kullanarak, bu solüsyonların etkinliğinin artırılması amaçlanmış ve umut verici sonuçlar elde edilmiştir.

7. YORUM

1. Biyokimyasal, histolojik ve immünhistokimyasal analizler sonucunda, RL grubunda oluşan hepatosit hasarı, diğer tüm gruplara göre belirgin olarak daha fazla görülmüştür. Fakat RL'a amifostin ilave edilmesiyle birlikte özellikle 12. saatte hücresel hasarın belirgin olarak azaldığı görüldü.
2. Tüm gruplar karşılaştırıldığında, en iyi sonuçlar UW+A grubunda elde edildi.
3. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında, amifostinli grupların amifostinsiz gruplara göre belirgin olarak iyi sonuçlar verdiği görüldü.
4. Amifostinli gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde ise, UW+A grubunun diğer iki gruba göre daha iyi sonuçlar verdiği görüldü. Bu bulgular, özellikle elektron mikroskopisi ile de desteklendi.
5. Sonuç olarak, amifostinin hepatektomi öncesi kullanımının iskemi-reperfüzyon sürecinde hepatoprotektif etki yaptığı gösterilmiştir.

8.KAYNAKLAR

1. Haberal M, Emiroğlu R. Karaciğer Transplantasyonu, Temel ve Sistemik Cerrahi (Gulay H), 1. basım, Bölüm III.4, İzmir, Güven Kitapevi, Cilt 1, sayfa 711-738, 2005
2. Eren E. Donor Heart Preservation in Heart Transplantation. Turkish Journal of Cardiovascular Surgery 2004;12: 145–150
3. Sözbilen M, Tokat Y. Organ Prezervasyonu, Temel ve Sistemik Cerrahi (Gulay H), 1. basım, Bölüm III, İzmir, Güven Kitapevi, Cilt 1, sayfa 631- 645, 2005
4. Markin RS, Wisecarver JL, Radio SJ, et al. Frozen section evaluation of donor livers before transplantation. Transplantation. 1993; 56: 1403– 09
5. Symon Z, Levi M, Ensminger WD, et al. Selective Radioprotection Of Hepatocytes By Systemic And Portal Vein Infusions Of Amifostine In A Liver Tumor Model. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.2001; 50 (2): 473–478
6. Jirtle RL, Pierce LJ, Crocker IR, et al. Radiation protection of rat parenchymal hepatocytes with S- 2-(3-aminopropylamino)ethylphosphorothioic acid. Radiother Oncol. 1985; 4(3): 231- 7
7. Borowska H, Arciszewska E, Czauderna P, et al. Dactinomycin-induced veno-occlusive disease in rats. The hepatoprotective action of amifostine. Evaluation in a light and electron microscope. Folia Morphol. 2004; 63 (1):91- 3
8. Stankiewicz A, Skrzydlewska E, Makiela M. Effects of amifostine on liver oxidative stress caused by cyclophosphamide administration to rats. Drug Metabol Drug Interact. 2002; 19(2): 67- 82
9. Dehghani SM, Gholami S, Bahador A, et al. Comparison of Child-Turcotte-Pugh and pediatric end-stage liver disease scoring systems to predict morbidity and mortality of children awaiting liver transplantation. Transplant Proc. 2007; 39(10):3175–7.
10. Farnsworth N, Fagan SP, Berger DH, et al. Child-Turcotte-Pugh versus MELD score as a predictor of outcome after elective and emergent surgery in cirrhotic patients. Am J Surg 2004; 188: 580–583.
11. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: A review in relation to free tissue transfers. Microsurgery 2004; 24: 468- 75.

12. Kayyali U.S, Donaldson C, Huang, H et al. Phosphorylation of xanthine dehydrogenase/oxidase in hypoxia. *J. Biol. Chem.* 2001; 276 (17): 14359- 65.
13. Wiezorek, J.S, Brown, D.H, Kupperman, et al. Rapid conversion to high xanthine oxidase activity in viable Kupffer cells during hypoxia. *J. Clin. Invest.* 1994; 94 (6): 2224- 30.
14. Vento AE, Ramö OJ, Nemlander AT et al. Nitecapone is of benefit to functional performance in experimental heart transplantation. *Res Exp Med* 1997;197: 137–146
15. Folden DV, Gupta A, Sharma AC, et al. Malondialdehyde inhibits cardiac contractile function in ventricular myocytes via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Br J Pharmacol* 2003; 139:1310–16.
16. Kacmaz A, Polat A, User Y, et al. Octreotide improves reperfusion-induced oxidative injury in acute abdominal hypertension in rats. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2004; 8: 113–19.
17. Horton JW. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology* 2003; 189: 75–78
18. Szabo C, Billiar TR. Invited review: Novel roles of nitric oxide in hemorrhagic shock. *Shock* 1999; 12: 1–9
19. Thies JC, Koepfel TA, Lehmann T, et al. Efficacy of N-Acetylcysteine as a Hepatoprotective Agent in Liver Transplantation: An Experimental Study. *Transplantation Proceedings*, 1997; 29: 1326–1327
20. Minor T, Akbar S, Tolba R. Value of alpha glutathione S-transferase for in vitro evaluation of preservation injury in normal and steatotic livers. *Transplant Int.*2000; 13: 551–554
21. Koukourakis MI. Amifostine in Clinical Oncology: Current use and future applications. *Anti-cancer drug* 2002; 13: 181–209
22. Shaw LM, Turrisi AT, Glover DJ, et al. Human pharmacokinetics of WR-2721. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys* 1986; 12(8), 1501–1504
23. Capizzi RL. Clinical status and optimal use of amifostine. *Oncology* 1999; 13(1):47- 59
24. Jordan SW, Yuhas JM, Glick J. Modulation of cisplatin renal toxicity by the radioprotective agent WR2721 *Exp Molecular Pathology.*1982; 36: 297–305

25. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992; 119(3): 493- 501
26. Gold R, Schmied M, Giegerich G, et al. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by combined use of insitu tailing and nick translation techniques. *Lab. Invest.* 1994; 71(2): 219–225
27. Porter NA. Chemistry of Lipid Proxidation, *Methods in Enzymology* 1984; 105: 273–283
28. Dorr RT. Radioprotectants: pharmacology and clinical applications of amifostine. *Semin Radiat Oncol.* 1998; 8(4): 10- 3
29. Kanat O, Kurt E, Yalcinkaya U, et al. Comparison of uroprotective efficacy of mesna and amifostine in Cyclophosphamide- induced hemorrhagic cystitis in rats. *Indian J Cancer.* 2006; 43(1):12–5
30. Pienaar BH, Lindell SL, Van Gulik T, et al. 72 hour preservation of the canine liver by machine perfusion. *Transplantation.* 1990; 49(2): 258–260
31. Markin RS, Wisecarver JL, Radio SJ, et al. Frozen section evaluation of donor livers before transplantation. *Transplantation.* 1993; 56: 1403– 09
32. Briceno J, Marchal T, Padillo J, et al. Influence of marginal donors on liver preservation injury. *Transplantation* 2002; 74: 522–526
33. Compagnon P, Wang H, Lindell SL, et al. Brain death does not affect hepatic allograft function and survival after ortotopic transplantation in a canine model. *Transplantation.* 2002; 73: 1218–27
34. Cywes R, Mullen JB, Stratis MA, et al. Prediction of the outcome of transplantation in man by platelet adherence in donör liver allografts. Evidence of the importance of prepreservation injury. *Transplantation.* 1993; 56: 316–323
35. Upadhy GA, Topp SA, Hotchkiss RS, et al. Effect of cold preservation on intracellular calcium concentration and calpain activity in rat sinusoidal endothelial cells. *Hepatology.* 2003; 37: 313–323
36. Arnault I, Bao YM, Dimicoli JL, et al. Combined effect of fasting and alanine on liver function recovery after cold ischemia. *Transplant Int.* 2002; 15: 89–95
37. Upadhy GA, Strasberg SM. Glutathione, lactobionate, and histidine: Cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in university of Wisconsin and histidine-tryptophan/ketoglutarate liver preservation solution. *Hepatology.* 2000; 31: 1115–22.

38. Aguilar HI, Steers JL, Wiesner RH, et al. Enhanced liver calpain protease activity is a risk factor for dysfunction of human liver allografts. *Transplantation*. 1997; 63: 612–614
39. Upadhyaya AG, Harvey RP, Howard TK, et al. Evidence of a role for matrix metalloproteinases in cold preservation injury of the liver in humans and in the rat. *Hepatology*. 1997; 26: 922–928
40. Topp SA Upadhyaya GA, Strasberg SM. Leukocyte adhesion to cold – preserved rat sinusoidal endothelial cells (SEC): Role of actin disassembly and ICAM–1. *Liver transpl*. 2003; 9: 1286- 94
41. Imamura H, Sutto F, Brault A, et al. Role of kupffer cells in cold ischemia/reperfusion injury of rat liver. *Gastroenterology*. 1995; 109:189–197
42. Urata K, Imamura H, Brault A, et al. Effects of extended cold preservation and transplantation on the rat liver microcirculation. *Hepatology*. 1997; 25: 664–671
43. Urata K, Brault A, Huet PM. Effects of portal vein clamping time on rat liver microcirculation following extended cold preservation and transplantation. *Transpl Int*. 1999; 12: 408–414
44. Kiuchi T, Oldhafer KJ, Schlitt HJ, et al. Background and prognostic implication of perireperfusion tissue injuries in human liver transplants: A panel histochemical study. *Transplantation*. 1998; 66: 737–747
45. Urata K, Brault A, Rocheleau B, et al. Role of Kupffer cells in the survival after rat liver transplantation with long portal vein clamping times. *Transpl Int*. 2000; 13: 420–427
46. Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, et al. Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. *Gastroenterology*. 2000; 118(1): 183–191
47. Cywes R, Packham MA, Tietze L, et al. Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat. *Hepatology*. 1993; 18(3): 635–647
48. Schoenwaelder SM, Yuan Y, Cooray P, et al. Calpain cleavage of focal adhesion proteins regulates the cytoskeletal attachment of integrin α and the cellular retraction of fibrin clots. *J Biol Chem*. 1997; 272(3):1694–02
49. Gow AJ, Thom SR, Ischiropoulos H. Nitric oxide and peroxynitrite mediated pulmonary cell death. *Am J Physiol*. 1998; 274(1): 112–118
50. Takei Y, Marzi I, Gao WS, et al. Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation*. 1991; 51(5): 959–965

51. Jaeschke H, Smith CW. Mechanism of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J leukoc Biol.* 1997; 61(6): 647–653
52. Bajt ML, Farhood A, Jaeschke H. Effects of CXC chemokines on neutrophil activation and sequestration in hepatic vasculature. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 281(5):1188- 95
53. Clavien PA, Rudiger HA, Selzner M. Mechanism of hepatocyte death after ischemia: Apoptosis versus necrosis. *Hepatology.* 2001; 33(6): 1555–57
54. Le Moine O, Louis H, Demols A, et al. Cold liver ischemia-reperfusion injury critically depends on liver T cell and is improved by donor pretreatment with interleukin 10 in mice. *Hepatology.* 2000; 31(6): 1266–1274
55. Vajdova K, Smrekova R, Kukam M et al. Endotoxin-induced aggravation of preservation-reperfusion injury of rat liver and its modulation. *J.Hepatol.* 2000; 32: 112- 120
56. Sindram D, Kohli V, Madden JF, et al. Calpain inhibition prevents sinusoidal endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver. *Transplantation.* 1999; 68: 136–140
57. Bessems M, Doorschodt BM, Dinant S. Machine perfusion Preservation of the Pig Liver Using a New preservation solution, Polysol. *Transplantation Proceedings.* 2006; 38: 1238–42.
58. Butlr AJ, Rees MA, Wight DG. Successful extracorporeal porcine liver perfusion for 72 hr. *Transplantation.* 2002; 73: 1212–1218
59. Lauschke H, Olschewski P, Tolba R. Oxygenated Machine perfusion mitigates surface antigen expression and improves preservation of predamaged donor livers. *Cryobiology.* 2003; 46: 53- 57
60. Demmy TL, Biddle JS, Bennett LE, et al. Organ preservation solution in heart transplantation pattern of useage and related survival. *Transplantation.* 1997; 63(2): 262–269
61. Nardo B, Beltempo P, Bertelli R, et al. Comparison of Celsior and University of Wisconsin solutions in cold preservation of liver from octogenarian donors. *Transplant Proc.* 2004; 36(3): 523- 4
62. Feng L, Zhao N, Yao X, et al. Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution vs. University of Wisconsin solution for liver transplantation: a systematic review. *Liver Transpl.* 2007; 13(8): 1125- 36

63. Ringe B, Braun F, Moritz M, et al. Safety and efficacy of living donor liver preservation with HTK solution. *Transplant Proceedings*. 2005; 37(1): 316- 9
64. Tolba RH, Akbar S, Muller A, et al. Experimental liver preservation with Celsior: A novel alternative to University of Wisconsin and histidine-tryptophan- α -ketoglutarate solution. *Eur Surg Res*. 2000; 32: 142–147
65. Falasca L, Tisone G, Palmieri G, et al. Protective role of tauroursodeoxycholate during harvesting and cold storage of human liver: A pilot study in transplant recipients. *Transplantation*. 2001; 71: 1268–1276
66. Pirene J, Van Gelder F, Coosemans W, et al. Type of donor aortic preservation solution and not cold ischemia time is a major determinant of biliary strictures after liver transplantation. *Liver transpl*. 2001; 7: 540–545
67. Rentsch M, Post S, Palma P, et al. Anti-ICAM–1 blockade reduces postsinusoidal WBC adherence following cold ischemia and reperfusion, but does not improve early graft function in rat liver transplantation. *J Hepatol*. 2000; 32: 821–828
68. Mosbah IB, Franco-Gou R, Abdennebi HB, et al. Effects of polyethylene glycol and hydroxyethyl starch in University of Wisconsin preservation solution on human red blood cell aggregation and viscosity. *Transplant Proc*. 2006; 38(5):1229- 35
69. Avolio A, Agnes S, Nure E, et al. Comparative Evaluation of Two Perfusion Solutions for Liver Preservation and Transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2006; 38: 1066–1067
70. Basaran O, Emiroglu R, Moray G, et al. Comparison of Two Different Liver Storage Techniques in Rat Liver Model *Transplantation Proceedings*, 2003; 35: 2816–20
71. Selzner N, Rudiger HA, Graf R. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology*. 2003; 125: 917–936
72. Pries JM, Stables AB, Hanson RF. The effect of hepatic blood flow on taurocholate extraction by the isolated perfused rat liver. *J lab Clin Med*. 1981; 97: 412–417
73. Atik E, Onlen Y, Savas L et al. Inducible nitric oxide synthase and histopathological correlation in chronic viral hepatitis. *International Journal of Infectious Diseases*. 2008; 12; 12—15
74. Miriam R, Carmelo GM, Gerardo C, et al. Intrahepatic Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Acute Liver Allograft Rejection: Evidence of Modulation by Corticosteroids. *Liver Transplantation* 2001; 7(1) : 16- 21

75. Natori S, Selzner M, Valentino KL, et al. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation*. 1999; 15; 68(1): 89- 96
76. Targal AC, Cesar ACG, Cury PM et al. Apoptosis in different gastric lesions and gastric cancer: relationship with *Helicobacter pylori*, overexpression of p53 and aneuploidy. *Genet. Mol. Res.* 2007; 6 (3): 554- 565
77. Phuong Baries, Christian Baries. *Clin. Chem.*1995; 41: 6, 904–907
78. Greig PD, Wool GM, Sinclair SB, et al. Treatment of primary liver graft non-functioning with prostaglandin E1. *Transplantation* 1989; 48:447.
79. Ploeg RJ, Alessandro AM, Knechtle SJ, et al. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation a multivariate analysis. *Transplantation* 1993; 55:807
80. McKeown CMB, Edwards V, Philips MJ, et al. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* 1988; 46:178.
81. Flowers M, Sherker a, Sinclair SB, et al. Prostaglandin E in the treatment of recurrent hepatitis B infection after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1994; 58:183
82. Bedirli A, Pasaoglu H, Erdem O, et al. Effects Of Ischemic Preconditioning On Regenerative Capacity Of Hepatocyte In The Ischemically Damaged Rat Livers. *Journal of Surgical Research*. 2005; 125: 42- 48
83. Yagmurdu MC, Ozdemir A, Topaloglu S, et al. Effects of alpha tocopherol and verapamil on liver and small bowel following mesenteric ischemia-reperfusion, *Turk. J. Gastroenterol.* 2002; 13 (1): 40- 46
84. Yagmurdu MC, Başaran O, Ozdemir H, et al. The impact of transient elevation of intraabdominal pressure on liver regeneration in the rat. *J. Invest. Surg.* 2004; 17(6):315- 322
85. Rolf J. Schauer, Alexander L. Gerbes, et al. Induction of Cellular Resistance Against Kupffer Cell- Derived Oxidant Stress: A Novel Concept of Hepatoprotection by Ischemic Preconditioning. *Hepatology*. 2003; 37 (2): 286- 295
86. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, et al. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*. 2000; 32: 169- 73

87. Peralta C, Serafin A, Fernandez L, et al. Liver Ischemic Preconditioning: A New Strategy for the Prevention of Ischemia- Reperfusion Injury. *Transplantation Proceedings*.2003; 35(5): 1800–1802
88. Camargo CA , Madden JF, Gao W, et al. Interleukin–6 Protects Liver Against Warm Ischemia/Reperfusion Injury and Promotes Hepatocyte Proliferation in the Rodent: *Hepatology*.1997; 26(6): 1513–1520
89. Qing D, Han B. Tolerance Limits of Liver Grafts With 30 Minutes of Warm Ischemia to Cold Preservation in Swine. *Transplantation Proceedings*.2005; 37(1): 409- 412
90. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, et al. Protective Effects of Ischemic Preconditioning for Liver Resection Performed Under Inflow Occlusion in Humans. *Annals Of Surgery*. 2000; 232(2): 155- 162
91. Vincenzo D, Stefania B, Michela S, et al. Protective Role of Dehydroascorbate in Rat Liver Iscehemia Reperfusion Injury: *Journal of surgical Research*. 2005; 123: 215- 221
92. Yuhas JM, Storer JB. Differential cytoprotection of normal and malignant tissues. *J. Natl Cancer Inst*. 1969; 42(2): 331–5
93. Liu T, Liu Y, He S, et al. Use of radiation with or without WR–2721 in advanced rectal cancer. *Cancer*. 1992; 69 (11): 2820–5
94. Kligerman MM, Liu T, Liu Y, et al. Interim analysis of a randomized trial of radiation therapy of rectal cancer with/without WR–2721. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1992; 22(4): 799–802
95. Dziegielewski J, Baulch JE, Goetz W, et al. WR–1065, the active metabolite of amifostine, mitigates radiation-induced delayed genomic instability. *Free Radic Biol Med*. 2008
96. Shaw LM, Glover DJ, Turrisi A, et al. Pharmacokinetics of WR–2721. *Pharmac Ther* 1988; 39: 195–201.
97. Yuhas JM. Active versus passive absorption kinetics as the basis for selective protection of normal tissues by S–2-(3-aminopropylamino)-ethylphosphorothioic acid. *Cancer Res* 1980; 40(5): 1519- 1524.
98. Rasey JS, Krohn KA, Menard TW, et al. Comparative biodistribution and radioprotection studies with three radioprotective drugs in Mouse tumours. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12(8): 1487–1490.

99. Borg M. Radiation injury to the rectum and amifostine. *Support Cancer Ther.* 2006; 3(4): 251–3
100. Kuo PC, Drachenberg CI, Bartlett ST, et al. Apoptosis and hepatic allograft reperfusion injury. *Clin Transplant.* 1998; 12(3):219- 23
101. Avolio AW, Agnes S, Nure E, et al. Comparative Evaluation of Two Perfusion Solutions for Liver Preservation and Transplantation. *Transplantation Proceedings* 2006; 38: 1066–1067
102. Mangus RS, Avinash A, Rodrigo V, et al. Comparison of Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate Solution (HTK) and University of Wisconsin Solution (UW) in Adult Liver. *Transplantation.* 2006; 12(2): 226- 230
103. Mangus RS, Tector AJ, Fridell JA, et al. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution in intestinal and multivisceral transplantation. *Transplantation.* 2008; 86(2): 298- 302
104. Mangus RS, Fridell JA, Vianna RM, et al. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution in extended criteria liver donors. *Liver Transpl.* 2008; 14 (3): 365- 73