



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**İZOLE HEPATİK ARTER İSKEMİSİ VE REPERFÜZYONU
SONRASI GELİŞEN HÜCRE HASARINDA AMİFOSTİNİN
SİTOPROTEKTİF ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. İbrahim AYVAZ

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Mahmut Can Yağmurdur**

Ankara/2006

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca tüm bilgi ve tecrübelerini büyük bir özveri ile aktaran, başta Prof. Dr. Mehmet Haberal olmak üzere Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nın tüm değerli öğretim üyelerine saygı ve şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Tez çalışmamda desteği olan; Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Suna Türkoğlu'na, Histoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gülten Karabay'a, Biyoistatistik Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ersin Öğüş'e, Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Hale Tufan'a, Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Nihan Haberal'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Uzun ve zorlu eğitim süreci boyunca benden destek ve sevgilerini esirgemeyen değerli ailem ve tüm dostlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Dr. İbrahim AYVAZ

ÖZET

Bu çalışmada; rat karaciğerinde oluşturulan in vivo izole arteriyel iskemi-reperfüzyon modeli kullanılarak safra epitelinde oluşturulan hasar ve bu hasara Amifostin'in etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Amifostin; onkoloji kliniklerinde, anti-kanser kemoterapötik ilaçların ve radyoterapinin normal hücrelerde yaptığı hasarı önlemek amacıyla kullanılmaktadır. İlacın selektif sitoprotektif etkisi birçok klinik çalışmada gösterilmiştir. Benzer mekanizmayla oluşan iskemi-reperfüzyon hasarında Amifostin'in koruyucu etki göstereceği düşünülmüştür.

Çalışmada; hepatic arter izole olarak klemplenecek, safra yollarında iskemi meydana getirilmiş ve ratlara 5 gün süre ile Amifostin uygulanmıştır. Beşinci günün sonunda sakrifiye edilen ratlardan alınan serum ve KC doku örneklerinde, oluşan hasarın değerlendirilmesi için biyokimyasal ve patolojik parametrelerden faydalanılmıştır.

İmmünohistokimyasal yöntemle apoptozis'i değerlendirmek için safra yollarında TUNEL ve PCNA parametre olarak kullanılmış, ultra strüktürel değişimleri değerlendirmek için elektron mikroskopik inceleme yapılmış, karaciğer dokusunda reperfüzyon hasarını değerlendirmek için ise MDA ve GSH düzeyleri bakılmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda; Amifostinin, safra yollarının izole iskemi-reperfüzyonu sonrasında oluşan hasarı azalttığı gösterilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
RESİMLER ve ŞEKİLLER	vii
TABLOLAR	viii
GRAFİKLER	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
• Hepatik Arteriyel Kan Akımı.....	3
• İskemik Hasar.....	7
• Oksidatif Stres.....	8
• Apoptoz.....	10
• Glutasyon.....	14
• Amifostin.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
• Deney hayvanları	20
• Gruplar	21
• Ön Çalışma.....	21
• Amifostinin Uygulanışı.....	24
• Cerrahi Teknik	25
• LDF	28

• Biyokimyasal Analiz.....	30
• İmmunhistokimyasal Analiz	32
• Elektron Mikroskopik inceleme	34
4. BULGULAR.....	35
5. TARTIŞMA	49
6. KAYNAKLAR	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

AEC	:3-amino-9-ethycarbazole
ATM	:Atexia telengiactasia mutated
DAB	:Diamino Benzidin
DISC	:Death Inducing Signal Complex
G6PD	:Glukoz 6 Fosfataz
GER	:Granüllü endoplazmik retikulum
GRX	:Glutaredoksin Redüktaz
GSH	:Glutasyon
GSSG	:Okside Glutasyon
LDF	:Laser doppler sitoflowmeter
MDA	:Malondialdehit
PBP	:Peribilyer pleksus
PCNA	:Proliferating Cell Nuclear Antigen
PPP	:Periportal pleksus
ROM	:Reaktif oksijen metabolitleri
SEMvcc	:Vascular corrosion casts observed with Scanning Electron Microscopy
TNF-α	:Tümör Nekroz Faktör
TPD	:Total periferik direnç
TUNEL	:Transferase- mediated d-UTP-biotin Nick End Labeling
TRX	:Thiol Transferaz
TBA	:Tiyobarbitürik asit
TBS	:Tris buffer salin

RESİMLER ve ŞEKİLLER

	<u>Sayfa No</u>
Resim 1: PBP (SEMvcc: A: X 40; B-C: X 110.....	5
Resim 2: PBP (SEMvcc: A: X 40; B: X 110.....	6
Resim 3: Wistar Albino ırkı erişkin dişi sıçan	20
Resim 4: Apoptoz ön çalışma.....	22
Resim 5: PCNA ön çalışma.....	23
Resim 6: Elektron mikroskopik ön çalışma.....	24
Resim 7: Portal pedikül disseksiyonu.....	26
Resim 8: Portal pedikül (Büyütme X 4)	26
Resim 9: İzole arteriyel iskemi ve mikro klemp	27
Resim 10: LDF ölçümü	29
Resim 11: TSD 144 LDF; BIOPAC, MP 100A Kaliforniya, ABD	29
Resim 12: LDF grafiği	30
Resim 13: EM - Kontrol grubu.....	39
Resim 14: EM - Amifostin grubu.....	40
Resim 15: EM - İskemi grubu	41
Resim 16: EM - İskemi grubu	42
Resim 17: EM - Amifostin + İskemi grubu.....	43
Resim 18: EM - Amifostin + İskemi grubu.....	43
Resim 19: Gruplara göre TUNEL boyamaları	46
Resim 20: Gruplara göre PCNA boyamaları.....	46
Şekil 1: Apoptotik ve nekrotik hücre ölümleri	11
Şekil 2: Ölüm Kaskadı.....	14
Şekil 3: Amifostin etki mekanizması.....	18

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1: TUNEL için önçalışma değerleri.....	22
Tablo 2: PCNA için ön çalışma değerleri	23
Tablo 3: Kan basınçları ortalama ve standart hata değerleri.....	35
Tablo 4: LDF ortalama ve standart hata değerleri.....	36
Tablo 5: PCNA için ortalama ve standart hata değerleri	44
Tablo 6: TUNEL için ortalama ve standart hata değerleri.....	45
Tablo 7: MDA için ortalama değerler ve standart hata değerleri.....	47
Tablo 8: GSH için ortalama değerler ve standart hata değerleri.....	48

GRAFİKLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Grafik 1: Kan basınçları indeks değerlerinin dağılımı.....	35
Grafik 2: LDF indeks değerlerinin dağılımı	37
Grafik 3: LDF indeks değerlerinin dağılımı	37
Grafik 4: LDF indeks değerlerinin sürece göre dağılımı.....	38
Grafik 5: PCNA indeks değerlerinin dağılımı	44
Grafik 6: TUNEL indeks değerlerinin dağılımı.....	45
Grafik 7: MDA indeks değerlerinin dağılımı	47
Grafik 8: GSH indeks değerlerinin dağılımı.....	48

1. GİRİŞ

Ortotopik karaciğer transplantasyonu son dönem karaciğer yetmezliği ve akut karaciğer yetmezliği gibi daha önceden sonu mutlak ölüm olan karaciğer hastalıklarında tek tedavi seçeneğidir. Organ saklama tekniklerinin gelişmesi, cerrahi teknikteki gelişmeler, immünsupresyondaki gelişmeler hastaların hayatta kalım sürelerinin uzamasına ve beraberinde de kısa ve uzun dönemde bazı komplikasyonların daha sık görülmesine sebep olmuştur. Bu komplikasyonlar, kanama, tromboz gibi vasküler komplikasyonlardan biliyer kaçak, darlık gibi safra yolları komplikasyonlarına, akut rejeksiyondan hepatik abselere kadar uzanan geniş bir yelpaze oluşturmaktadır.

Safra yolu komplikasyonları ortotopik karaciğer naklinin “Aşıl Tendonu”nu oluşturmakta ve hem mortalitede hemde morbiditede önemli bir yer teşkil etmektedir. Komplikasyon hızı klinikten kliniğe değişmekle birlikte %9-35 arasında yer almaktadır (1-11).

Vasküler komplikasyonlar genel olarak %9 oranında rapor edilmektedir (12). Hepatik arter stenozları ve trombozları vasküler komplikasyonlar arasında en sık görülenleri olup insidansları seriden seriye değişmekle birlikte % 6 ila 11 arasında değişmektedir (13). Pediyatrik vakalarda arter çapının daha küçük olmasına bağlı olarak görülme sıklığı daha fazla artmaktadır. Hepatik arter stenoz ya da trombozu cerrahi veya anjioplastik yöntemlerle erken dönemde düzeltilemediği takdirde safra yollarında iskemi/nekroza yol açarak biliyer komplikasyonlara ve ileri safhalarda

hastayı ağır karaciğer yetmezliğine sokmaktadır. Hastalığın bu dönemden sonra tek tedavisi retransplantasyondur (14,15). Portal venin ya da vena kavanın trombozunu içeren venöz komplikasyonlar ise çok daha nadir görülür (%3) ve genellikle anastomozda yerleşir (14).

Post-transplant erken dönemde safra yollarının arteriyel kan akımı yalnızca hepatik arter yoluyla olmaktadır. Hepatik arterin tam tıkanması hepatik parankimde geçici iskemiye, daha da önemlisi safra yollarında iskemi/nekroza yol açabilmektedir (16). Literatürde izole hepatik arter iskemisi ile ilgili in vivo çalışmaların sayısı azdır (17).

2. GENEL BİLGİLER

HEPATİK ARTERİYEL KAN AKIMI

Temel işlemlerde rol almaları sebebiyle (sekresyon, absorpsiyon, proliferasyon, neoanjiogenez) kolanjiyositler son dönemlerde inceleme altına alınmıştır (18-21). Kolanjiyositlerin metabolik ve fonksiyonel ihtiyaçlarını karşılayan kan akımı biliyer ağacın etrafında kompleks ağ yapısı oluşturan ve hepatik arterden kaynaklanan bir pleksus tarafından sağlanmaktadır (22-26).

Santral karaciğer vaskülarizasyonunun rolü ve hepatik fonksiyonlardaki mikrosirkülasyonun önemi Marcello Malpighi tarafından 17. yüzyılda gösterilmiştir (27). Bu açıklama Rappaport tarafından 1952 de açıklanan ve asinüs olarak adlandırılan morfo-fonksiyonel ünite ile koreledir (28).

Biliyer sistemi besleyen tipik mikrovasküler yapıyı inceleyen çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda saptanan mikrovasküler ağ intra ve ekstrahepatik biliyer sistemi kapsamakta ve peribiliyer pleksus (PBP) olarak adlandırılmaktadır (29,30).

Karaciğerin hepatik arter ve portal ven ile ikili akımı olduğu bilinmesine rağmen hepatik arteriyel kan akımının dağılımı hala tartışmalı bir konudur. Hepatik arterin terminal dallarının sinüzoidlere açıldığı, arter içine radyoopak madde enjekte edilerek yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (31-40). Ancak, hepatik arterin kanı direkt sinüzoidlere mi temin ettiği yoksa portal tarakt stromasına girerek PBP yi

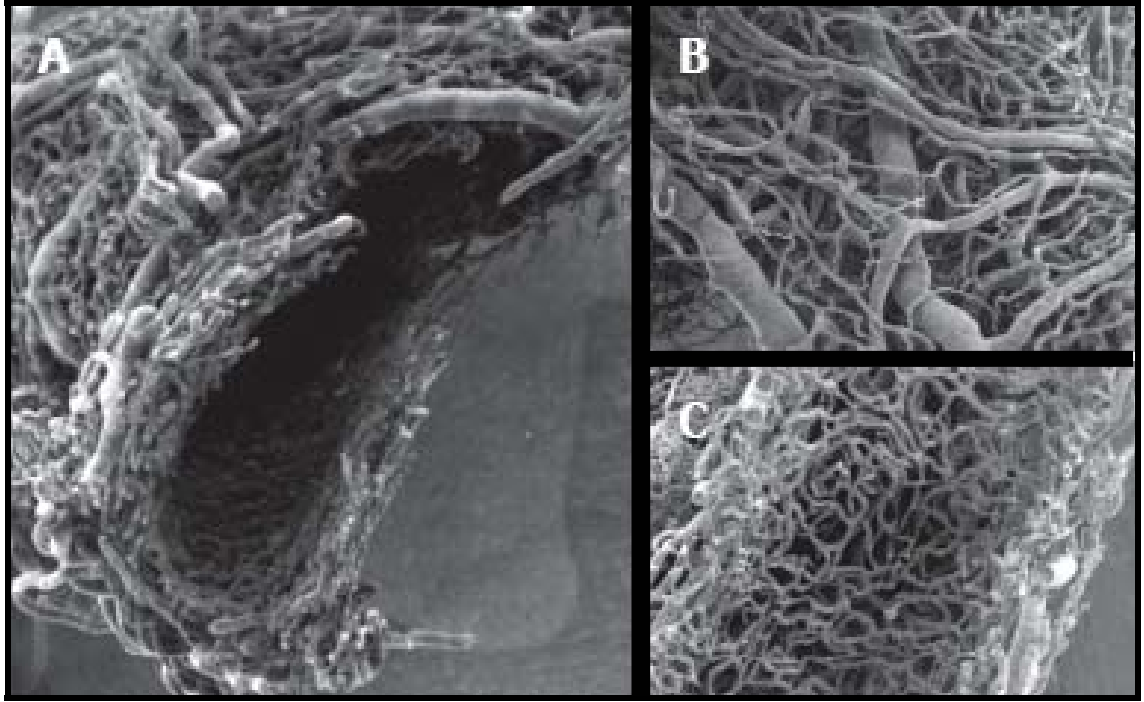
besleyip daha sonra mı sinüzoidlere ulaştığı hala tam olarak anlaşılmamıştır (31,35,37,39,41,42,43). Sinüzoidlerin kan akımını açıklamak için bir çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların bazılarında terminal portal traktlarda arteriyo-portal anastomozlar gözlenmiş, bazılarında ise arteriyo-portal anastomozlar inkar edilmiştir (31,39,44,45).

Mikrovasküler yapı ratlarda, “scanning” elektron mikroskopisi vasküler korozyon atıkları yöntemi (SEMvcc) ile incelenmiştir (26,46,47). Normal karaciğerde saptanan atıklar bunları çevreleyen sinüzoidler ile dağılım göstermektedir. Hepatik arter dalları büyük portal alanlarda genellikle venöz portal dallardan daha küçük, küçük portal alanlarda ise neredeyse görüntülenemeyecek büyüklüktedir (29,30,48,49). Hepatik arter’in terminal dalları, peribiliyer pleksus (PBP) ya da periportal pleksus (PPP) oluşturmaktadır. Küçük portal alanlarda hepatic arter’in küçük dallarından kaynaklanan kapillerler, sinüzoidlere girmektedir. Bunların çapları ve endoteliyal özellikleri kapiller yapıdadır. Hepatik arter dalları, interlobular damarlara kadar portal vene paralel seyrederek ve burada hepatic arterlerin kısa kollateral dallarından PBP ve PPP oluşur (30,48,50).

Büyük portal alanlarda PBP kısa kollateral arteriyollerle aynı arteriyel daldan köken diğer arteriyoller arasında yer alan vasküler anastomotik bir ağdır ve genellikle tek tabakadan oluşmuştur. Hilus çevresinde yerleşmiş PBP lerde ise vasküler yapı iki tabaka halinde bulunmakta, portal alanlar küçüldükçe PBP progresif olarak tek tabakaya düşmektedir (30,48). Kapillerde, az sayıda endotelyal imprint ve irregüler atıklar bulunur (51,52).

PPP ise geniş portal alanlarda gözlenir. Geniş portal alanların dışındaki alanlarda PPP interstisiyal, izole kapillerler olarak görülür ve peribiliyer kapillerlerden ayırmak mümkün değildir (30,48).

Ekstrahepatik biliyer traktüste ana safra kanalı etrafında yoğun bir vasküler yapı vardır. Buradaki arteriyel ve venöz yapılar, endotel yapısından rahatça tanınabilir. Pleksusun dış kısmı sıkı ağ oluşturmuş arteriyel ve venöz damarlardan iç kısmı da yine sıkı bir ağ oluşturmuş kapillerlerden meydana gelir.

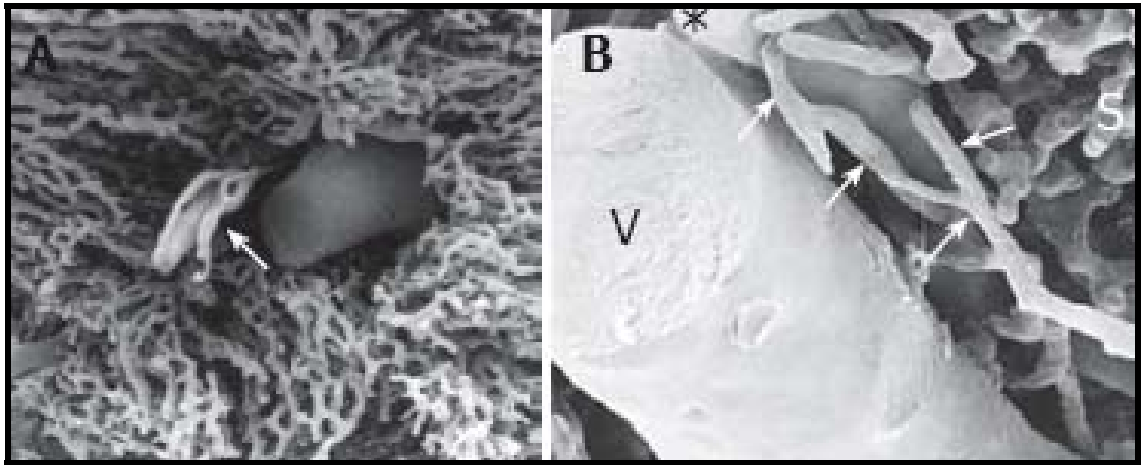


Resim 1: Elektron mikroskopik görüntüde ana safra kanalı etrafındaki yoğun vasküler yapı görülmektedir (SEMvcc: A: X 40; B-C: X 110) (120).

- A. Ekstrahepatik peribiliyer pleksus (Transvers düzlem)
- B. PBP dış yüzeyi
- C. PBP iç yüzeyi

Arteriyel ağ 30-40 µm büyüklüğünde prekapillerlere ayrılır. Prekapiller arteriyollerden orijin alan kapillerler, arteriyel ve venöz ağ ile aynı düzlemde bir ağ oluştururlar (49,53). Bu ağa iç yüzeyinden bakıldığında, kapillerlerin vasküler alanın etrafında iyi organize olduğu, arteriyoller tarafından bakıldığında ise ince kapillerler ile çevrilmiş küçük asiner bezlere benzediği görülmektedir. Arteriyollerin olduğu düzlemden bakıldığında ayrıca büyük venöz damarlar da görülmektedir. Bu venöz yapılar superfisiyal ve iç kapiller ağı drene ederler (46).

Ekstrahepatik PBP karaciğer içerisinde intrahepatik PBP ile devam eder. İntrhepatik PBP afferent arteriyol damarlar ve kapillerlerden oluşur ve büyük portal alanlarda daha kolay görülür. Küçük portal traktlarda ise PBP tipik olarak hepatik lobulün periferinde tanımlanan tek tabaka kapillerler ile karakterizedir.



Resim 2: Normal rat karaciğeri (SEMvcc: A: X 40; B: X 110) (120).

- **V:** Vena porta
- **S:** Sinüzoid
- **Oklar:** PBP
- **∗:** Terminal hepatic arter

PBP safra epitel fonksiyonunu destekler, safra bu toplayıcı sistemden geçerken su ve elektrolitler absorbe edilir. Ratlarda safra kesesinin olmaması sebebiyle gıda alımı dışındaki dönemde su reabsorbsiyonunda PBP'nin önemi açığa çıkmaktadır (46).

İntrahepatik biliyer epitelyumun beslenmesi hepatic arter yoluyla sağlanmaktadır. Karaciğer hasarı yapılan deneysel çalışmalarda ve insan patolojilerinde biliyer sistemin yapısal değişikliklerine karşı PBP'in adaptif değişiklikleri olduğu gösterilmiştir. Deneysel modellerde, safra kanalı ligasyonu selektif kolanjiyosit proliferasyonu için sıklıkla kullanılmaktadır (26,47,54). Safra kanalı ligasyonundan üç veya dört hafta sonra hepatic arteriyel dallardan köken alan arteriyollerden gelişen tipik, iyi gelişmiş, mikrovasküler pleksus gözlenir. Pleksus lobülün periferinde yerleşik ve hipertroftiktir ancak yapısı normaldir. Safra kanalı ligasyonundan sonra intrahepatik biliyer epiteli kolanjiyosit proliferasyonuna gider. Safra kanalı ligasyonu ile eş zamanlı hepatic arter ligasyonu yapılmış ratlarda yeni PBP oluşumu ve safra yollarında proliferasyon görülmemiştir (21,22,24,55).

İSKEMİK HASAR

Arteriyel kan akımının kesilmesi sonrası iskemik hasar üç aşamada oluşur.

1)Erken dönem: Bu dönemde glutamat ve aspartatın kontrolsüz salınımı meydana gelir. Glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması ile hücre içine çok miktarda kalsiyum, sodyum ve su girer. Hücre içinde kalsiyum miktarı arttığında hücresel oksidatif stres aktive olur ve bununla eş zamanlı olarak hücre içi lipaz, proteaz ve

endonükleazların aktivasyonu gerçekleşir. Lipaz, proteaz ve endonükleazların aktivasyonu sonucunda DNA, lipid ve protein hasarı gerçekleşir.

2)Orta dönem: Serbest radikaller salınmaya başlar. Salınan serbest radikaller lipid peroksidasyonuna sebep olur, mitokondriyal enzimleri etkileyerek hücrenin enerji kaynakları ile bağlantısını keser. Ayrıca nükleik asitlerde de yapısal bozulmalara neden olur.

3)Geç dönem: Dokuda inflamasyon meydana gelir. İnfilamasyon alanına göç eden polimorf çekirdekli nötrofillerin içerdiği myeloperoksidaz ve benzeri bir çok enzimler, oluşan hücre hasarının daha da artmasına sebep olur (56,57,58).

OKSİDATİF STRES

Organizmamızda gerçekleşen çeşitli tepkimelerde reaktif oksijen radikalleri /metabolitleri (ROM) olarak adlandırılan ve oksijenden daha fazla oksitleme yetisine sahip oksidanlar üretilmektedir. Söz konusu oksidanların başlıcaları süperoksit anyonu ve hidrojen peroksittir. Fizyolojik şartlarda sinyal iletilişinde işlevleri tanımlanmış olan bu metabolitler, yüksek derişimlerde biyolojik moleküllerde modifikasyonlara yol açarak hücre ve doku hasarına neden olmaktadır (59). Oksidanların neden olduğu hasara karşı organizmamızda antioksidan işleve sahip bir savunma sistemi mevcuttur. Bu sistemin bileşenleri süperoksit dizmutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, glutatyon peroksidaz enzimleri olabildiği gibi, endojen ve eksojen moleküller (vitamin E, glutatyon, ürat, bilirubin) de olabilmektedir.

Fizyolojik şartlarda oksidanların neden oldukları hasarlar proteaz, lipaz ve ligazlarca (tamir sistemi) onarılır. Oksidan-tamir ve savunma sistemleri arasındaki ilişki fizyolojik şartlarda denge halindedir. ROM derişiminin artması, bu sistemde dengenin bozulmasına ve hücrede oksidatif strese yol açmaktadır (60).

Hücre içinde artan ROM'lar plazma ve intrasellüler membran lipidlerinin peroksidasyonuna neden olabilirler. Lipit peroksidasyonu sonucu çoklu doymamış yağ asitleri kaynaklı çeşitli toksik aldehitler oluşmaktadır. Bunların başlıcaları 4-hidroksinomenal ve malondialdehit'tir. Söz konusu aldehitler organizmamızda fizyolojik şartlarda düşük konsantrasyonda oluşmaktadır. Kontrollü bir şekilde gerçekleşen lipit peroksidasyonu, hücre farklılaşması, matürasyon, intrasellüler vezikül trafiği ve fagositozda rol oynamaktadır.

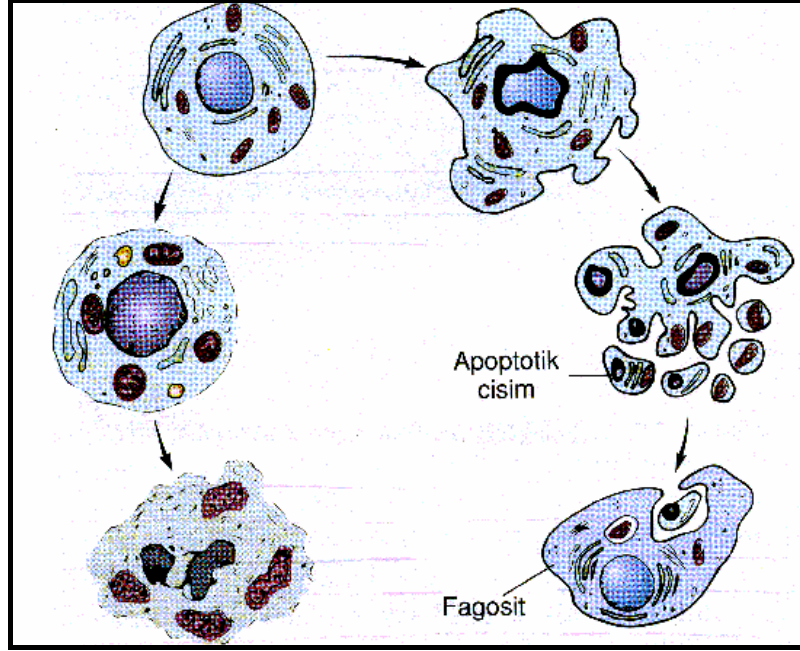
Buna karşın oksidatif stresin geliştiği durumlarda aldehitler hedef hücre membranlarında lipid modifikasyonuna neden olarak membranın akışkanlığını azaltmakta ve membran hasarı sonucunda membran bütünlüğünü bozabilmektedir. Lipid peroksidasyonu sadece lipidler üzerine etkili değildir, aynı zamanda membran proteinlerinde de hasara yol açmaktadır. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan toksik aldehitler, intra ve intermoleküler olarak proteinlerle çapraz bağlar oluşturabilirler. Oluşan bu bağlar sonucunda hücre membranında yüksek kütleli protein agregatları oluşmakta ve membran ile ilişkili reseptörlerin ve enzimlerin aktivitelerinde kayıplar olabilmektedir (G6PD, Ca-ATPaz, Na-K ATPaz gibi). Kanal protein hasarlarının yanı sıra mitokondri içerisinde elektron taşınım zincir bileşenleride etkilenmektedir. Bunun dışında aldehitler özellikle DNA bazları ile tepkimeye girerek mutasyonlara yol açabilmektedirler (59-64).

APOPİTOZ

Apopitozis, programlanmış hücre ölüm mekanizmasıdır. Bir grup protein ve gen ekspresyonunun birlikte işlemesi sonucunda meydana gelir. Gen ekspresyonu ile birlikte çekirdek DNA'sı kırılır, kromatin çekirdekte yoğunlaşır, çeperde toplanır, sitoplazma büzülür, bu esnada hücre membran bütünlüğü ve mitokondrion dış yapısı korunur. Sonunda hücre apoptotik cisimcikler oluşturularak parçalanır. Bu cisimcikler yakınındaki yerleşik hücreler, bölgesel makrofajlar, mikroglial hücreler tarafından abartılı bir inflamatuvar reaksiyon olmadan fagosite edilirler (65,66,67). Apopitoz, embriyonal dönemdeki temel hücre ölüm şeklidir. Fetal yaşam sırasında hücrelerin büyük kısmı bu yolla ortadan kaldırılır. Hücre çekirdeğinde DNA hasarı tamir edilemeyecek boyuta geldiğinde (Özellikle yüksek çoğalma yeteneğine sahip hücrelerde) apopitoz programları aktive olabilir. ATM (Ataxia telangiectasia mutated) gibi bazı kinazlar, DNA hasarını tarayıp saptarlar. Eğer DNA hasarı kontrol edilemeyecek boyutta ise ATM, p53 gibi hücre döngüsünde kontrol noktalarında yer alan pek çok proteini, hücre ölümünü desteklemek üzere fosforile eder. p53'ün yarı ömrü uğradığı fosforilasyon ile uzar, fosforile p53 hücre yıkımını hedefleyen proteinlere bağlanamaz ve stabilize hale gelir. Stabilize p53, proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırırken Bcl-2 gen ekspresyonunu baskılar. Böylece hem DNA tamir mekanizmalarını aktive eder hemde ölüm proteinlerinin salınımını baskılar. Ancak onarım yetersiz olursa, hücreyi apopitozise götürür (68,69,70,71).

Nekrotik hücre ölümü ise apopitozdan çok farklıdır. Hücre şişmesi, membran bütünlüğünün kaybı ve belirgin inflamasyon ile karakterizedir. DNA iplikçikleri,

apoptozdaki gibi internükleozomal bağlantı noktalarından, düzenli olarak kırılmaz, rastgele olacak şekilde kırılır (67,70,73,74,75).



Nekroz

Apoptoz

Şekil 1: Apoptotik ve nekrotik hücre ölümleri

Apoptozisin canlı hücrelerinin reperfüzyondan hasar görmelerinde önemli bir faktör olduğu, hem hayvan deneylerinde, hemde klinik transplantasyon çalışmalarında gösterilmiştir (76,77).

Reperfüzyon sonucunda pre- apoptotik proteinler olan caspase-3 ve caspase-8'in aktivasyonu ile apoptoz tetiklenir. Caspase-3 ve caspase-8 birlikte mitokondrial membran yapısında ve fonksiyonlarında bozulmaya yol açmanın yanısıra

sitoplazmaya sitokrom C salınımına ve sonuçta nükleer DNA'nın yıkılarak hücrenin ölmesine sebep olmaktadır (78,79,80).

Apopitozu başlatan genler, ölüm sinyallerini hücre dışında bulunan ölüm reseptörleri aracılığı ile hücre içine iletirler. Ölüm reseptörleri, tümör nekroze edici faktör (TNF) reseptörünün üst ailesine aittirler ve TNF R-1, FAS ve p75 NTR'yi içerirler. Ölüm sinyalinin dışarıdan gelmesi şart değildir hücre içerisinde hasarlanmış DNA, endoplazmik retikulum veya mitokondride bu sinyalin kaynağı olabilir (70,73,79).

Apopitozis iki aşamada gelişmektedir.

1. Başlangıç fazı (ölüm faktörleri, ölüm reseptörleri)
2. İkinci faz (mitokondriyal disfonksiyon)

Ölüm faktörleri TNF reseptör-1 (TNF-R1) ve Fas (CD95/APO-1) reseptörleridir. Bu reseptörler ligantları ile bağlandıktan sonra Fas, TNF-R1, adaptör proteinler ve pro-caspaslardan oluşan bir ölüm kompleksinin oluşmasına aracılık ederler. Oluşan bu kompleks ise caspase-8 ve caspase-3'ün aktivasyonunu sağlar (80).

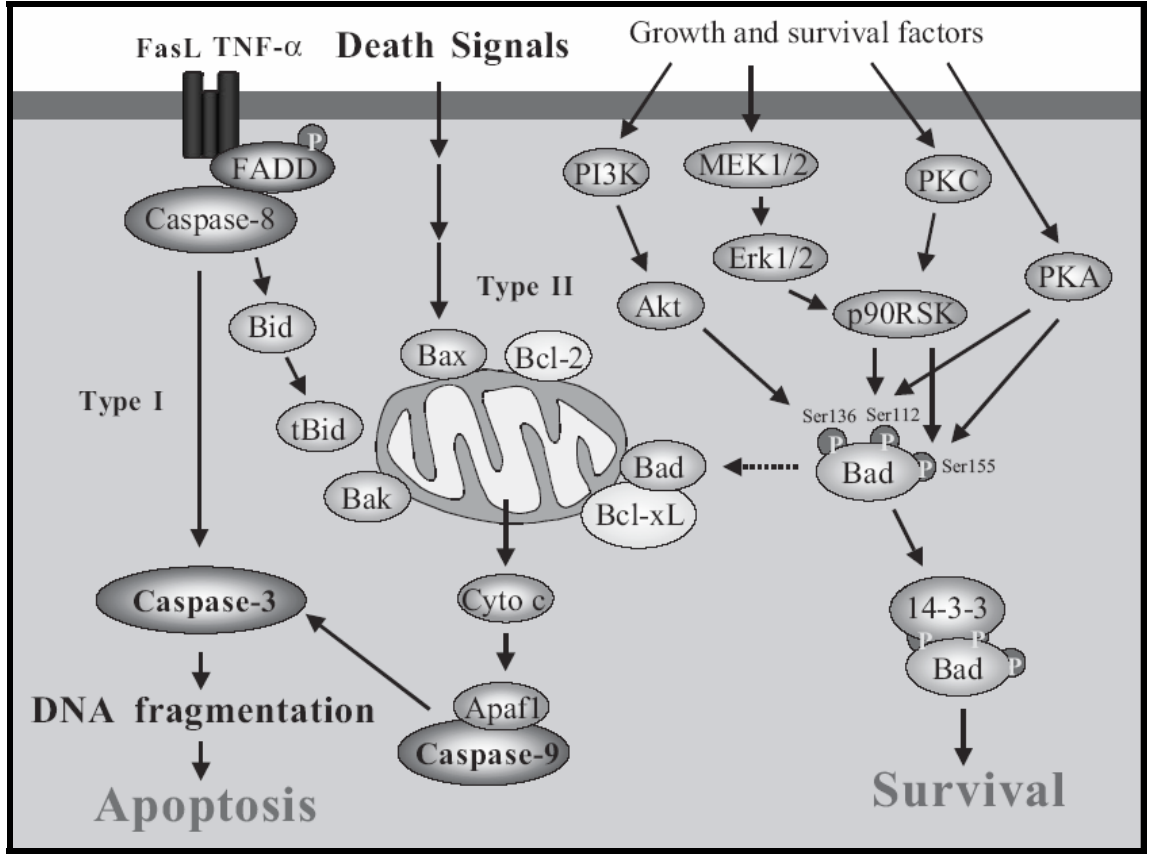
Ölüm faktörlerinin salınımını takiben mitokondriyal disfonksiyon başlar. Mitokondri dış zarı üzerindeki pro ve antiapoptotik Bcl reseptör ailesi üyelerinin birbirleriyle olan etkileşimlerinin hücrede yaşam ile ölüm arasındaki kararın alınmasında rol oynadığı düşünülmektedir (71,72,73,80).

Ölüm reseptörleri ile mitokondriyal disfonksiyonun başlaması bir bid proteini ile ilişkilidir. Bid proteini caspase-8 tarafından aktive edildikten sonra mitokondrilerden sitokrom-C salınmaya başlar. Oluşan sitokrom-C Apaf-1 aktivasyonunu sağlar, aktive Apaf-1 caspase 9 aktivasyonunu yapar. Aktive olan caspase-9, caspase-8 ile birlikte caspase-3 aktivasyonunu gerçekleştirir. Kaskadın en sonunda aktive olan caspase-3 nükleazları aktive eder ve çekirdek DNA'sının yıkılması ile hücrenin ölümüne sebep olur (72,75,82,83,84,85,86).

Apopitoz oluşumunun yan yolağında ise hücrel stres sonucunda ortaya çıkan sitokrom C, Apaf-1'e bağlanarak caspase-9'u aktive eder. Bu noktadan sonra her iki yolak birleşir (78).

Apopitozis'i değerlendirmek için, birçok histokimyasal tetkik geliştirilmiştir. TUNEL (Transferase- mediated d-UTP-biotin Nick End Labeling) bu yöntemlerden birisidir. Enzimatik olarak in-situ, DNA fragmentasyonunun tespitine olanak sağlar. Bu yöntemin temel prensibi tek ve/veya çift zincir kırıklı DNA bölgesine, işaretli nükleotidlerin girmesi veya eklenmesidir.

TUNEL yönteminin diğer apopitozis tespit yöntemlerine göre daha sensitif olma nedeni, pepsin, protein K, S1 nükleaz ve DNA zincirlerinin içine girebilen özellikle proteazlarla zenginleştirilmiş olmasındandır. Apopitozisteki yoğun kromatin yapıları ve nükleer proteinlerdeki oluşan çapraz bağlar, bu proteazlarla tespit edilir. Böylece bir çok histokimyasal metodla ya da yoğun ve zor DNA çalışmalarıyla gösterilemeyecek kadar küçük boyut ve orandaki apopitotik hücreleri bu yöntemle göstermek mümkün olur (81,87,88,89,90).



Şekil 2: Ölüm kaskadında yer alan hücre içi moleküler etkileşimler

GLUTATYON

Glutasyon, 1888 yılında Rey Pailhade tarafından keşfedilmiş ve 1930 yılındada glutasyonun L- γ -glutamil-sisteinil-glisin yapısında bir tripeptit olduğu ortaya konulmuştur (80,91,93). Glutasyon ana olarak karaciğerde glutamat, sistein ve glisinden sentezlenen bir tripeptittir. Biyosentez, sitoplazmada yer alan γ -glutamilsistein sentetaz ve glutasyon sentetaz enzimlerinin katalizi ile gerçekleşmektedir. Hücre içi yapılar ve diğer hücrelerin glutasyon ihtiyacı sentezlenen glutasyonun plazma ve intersellüler membranlarda yer alan özgün

taşıyıcı proteinlerle aktarılması ile karşılanmaktadır. Glutatyon hücre içi majör olmayan bir protein olan tiyoldür. Hücrede serbest ya da çeşitli moleküllere (özellikle proteinlere) bağlı olarak bulunabilmektedir. Serbest glutatyon formu indirgenmiş (GSH) veya oksitlenmiş tiyol (GSSG) formlarında bulunur.

GSH hücre içi antioksidan sisteminin bir üyesi olup, hücre redoks dengesinin sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Peroksitleri, daha az zararlı olan yağ asitlerine, su ve GSH disülfidlerine dönüştürür. Antioksidan işlevinin yanı sıra sinyal iletilisinin modülasyonu, hücre proliferasyonu ve immün cevapta da işlevleri tanımlanmıştır (92,93,94,97,98,99).

GSH bunların dışında

- 1) DNA' nın deoksiribonükleotid öncüllerinin sentezinde görev alır.
- 2) Esansiyel-SH grupları içeren enzimlerin koruyucusu ve aktivatörü olarak görev yapar.
- 3) GSH-peroksidaz gibi antioksidan enzimler için kofaktör olarak çalışır.
- 4) Hücre için toksik olan sisteini depo eder.
- 5) Hücre içi bakır taşınımı ve detoksifikasyonda görev yapar.

Hücre içi GSH derişimi, GSH'nın hücrede kullanım-sentez hızına bağlıdır. Özellikle savunma sisteminde GSH kullanımı, hücre GSH/GSSG oranının düşmesine sebep olmaktadır. Oksidatif stres hücrede GSSG ve protein-karışık disülfid derişimlerinin artmasına neden olmaktadır.

GSH hücre içerisinde özellikle hidrojen peroksit (H_2O_2) detoksifikasyonu (glutasyon peroksidaz aracılı) sırasında oksitlenmektedir. Oksidasyona uğrayan tiyollerin indirgenmesi ya da olası ise denovo biyosentez ile geri kazanımı NADPH bağımlı glutasyon redüktaz, tiyol transferaz (TRX) ve glutaredoksin redüktaz (GRX) enzimleri tarafından sağlanır. GSSG ve protein tiyolları ile karışık disülfidler bu enzim sistemleri tarafından GSH'a çevrilir (92,99,100,101).

GSH'nın çeşitli moleküllerle konjugasyonu, hücre GSH derişiminin düşmesi nedenleri arasında yer almaktadır. GSH'nın küçük moleküllerle oluşturduğu bu konjugatlar hücreden atılır. Konjugasyon veya atılım nedeni ile olan GSH miktarındaki azalma, hepatositlerde biyosentez ile ya da eksojen GSH alınımı ile karşılanır. Hücre içi GSH'nın düşmesi erken dönemde hücrede adaptif yanıt oluşturarak GSH biyosentezini arttırmaktadır (97,98,100).

Yüksek GSH derişimi hücre fonksiyon ve canlılığının bir göstergesi olarak kabul edilir (95). Bunun aksine GSH derişiminin düşmesi hücre içi savunma sisteminin zayıflamasının ve mitokondriyal hasarın belirteçlerinden olarak kabul edilir (102).

Hücrenin apoptozisi başlatması ya da devam ettirmesinde, hücre içi GSH seviyesinin önemli olduğu görülmüştür. Hücre içi GSH seviyesi düşük olduğunda, hücre içi ROM artmakta ve apoptotik yolda rolü olan kaspaz aktivasyonu uyarılmaktadır (92,99,103).

Mitokondriyal ve sitoplazmik glutasyonun tüketilmesi, apoptotik hücre ölümünün erken sinyalini oluşturur. GSH'daki azalma mitokondri transmembran

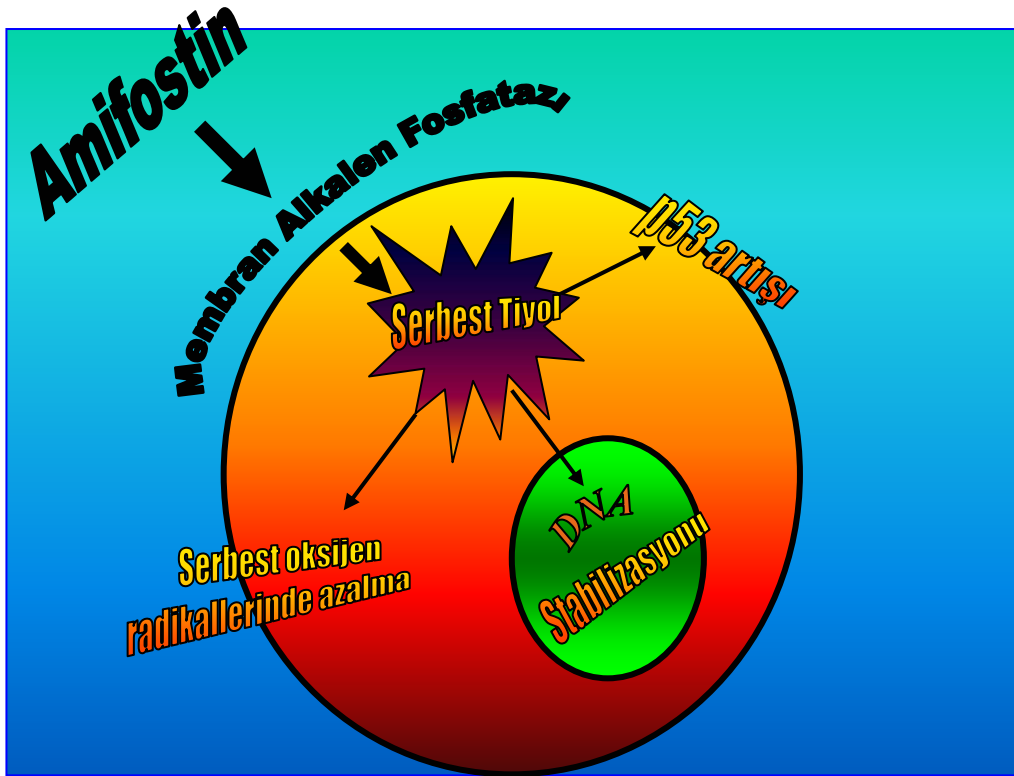
potansiyelini değiştirmekte, bu da mitokondrinin hızlı bir şekilde fonksiyonunu kaybederek, sitokrom C'nin sitoplazmaya salınımına sebep olmaktadır. Böylece apoptozise giden yol tetiklenmektedir (92) .

AMİFOSTİN

Ethyol[®] (amifostin, etanethiyol, 2-1 (3-aminopropil) amino-1-dihidrojen fosfat, WR-2721) organik bir tiyofosfattır. Farmasötik madde olarak 1998'den beri onkoloji kliniklerinde aktif olarak kullanılmaktadır. Amifostin'in kemik iliği transplantasyonu yapılan ve eş zamanlı kemoterapötik ilaç alan ya da onkoloji kliniklerinde anti-kanser kemoterapisi alan hastalarda normal hücrelerdeki DNA yıkımı ve hücre ölümünü, hücrede oluşan sitokinlere karşı hücre içi membran stabilizasyonunu sağlayarak önlediği gösterilmiştir. Amifostin sitoprotektif etkisini serbest radikalleri azaltarak ve hücrede DNA stabilizasyonunu sağlayarak yapar (78,80).

Amifostin inaktif bir prodrogtur, endotel hücrelerinde membran alkale fosforilazları tarafından defosforile edilerek serbest tiyole dönüşür, aktif metabolit WR 1065 olarak formüle edilmiştir (14,15). Amifostinin selektif koruyucu etki mekanizması, tümoral endotel ve stromal hücrelerde alkale fosfotaz aktivitesinin olmamasından kaynaklanır. Bu nedenle amifostin tümör hücrelerinde aktif metabolitine dönüşmez ve hücreyi kemoterapötiklerin etkisinden korumaz (80,104,105).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda amifostinin p53 genini arttırarak DNA stabilizasyonuna olanak sağladığı gösterilmiştir. Hücrelerde p53 geninin artışı hücre siklusunun G1-S aralığında duraksamasına ve DNA hasarının onarımı için daha fazla zaman kazanılmasına olanak sağlar (106,107,108). Glutatyon metabolizmasını anlatırken, hücre içi serbest tiyolün oksidatif stresi azalttığını, bu şekilde apoptozis oluşumunu engellediğinden bahsetmiştik. Aynı mekanizma ile amifostin sitoprotektif etki göstermektedir. Serbest tiyol olan WR-1065'e hücre içerisindeki iskemi reperfüzyon hasarı sonrası oluşan serbest oksijen radikallerini ve DNA hasarına yol açan oldukça reaktif nükleofilleri toplayarak yok etmesi sebebiyle süpürücü (scavenging) ajan da denmektedir (109,110,111).



Şekil 3: Amifostin etki mekanizması

Amifostin klinik kullanımında radyoterapiden ya da kemoterapiden 30 dakika önce intravenöz olarak verilmektedir. Hayvan deneylerinde ratlar için önerilen doz, 200 mg/kg yükleme dozunu takiben 10 mg/kg lik idame dozudur. İntravenöz ya da subkütan yolla veriliş arasında sitoprotektif etki açısından fark görülmemiştir (112,113).

Klinik farmakokinetik çalışmalar amifostin'in hızla plazmadan kaybolduğunu göstermiştir. Dağılım yarı ömrü 1 dakikadan daha az, eliminasyon yarı ömrü ise yaklaşık 8 dakikadır. İlacın uygulanmasını takiben %10 dan azı plazmada kalır. Amifostin hızla aktif metaboliti olan serbest tiyol halkasına dönüşür. Metabolitlerinin tamamı ve amifostin'in %4 ünden azı değişmeden renal yoldan atılır.

Amifostin'in en önemli yan etkisi geçici hipotansiyondur. İntravenöz uygulamanın 14.-15. dakikalarında başlayıp yaklaşık 6 dakika süren bir hipotansiyon atağı oluşur. Bu etki subkutan uygulamalarda görülmemektedir. Bunun dışında bulantı, kusma, hıçkırık ve hipokalsemi de rapor edilmiştir (68,114).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

DENEY HAYVANLARI

Çalışmada ortalama ağırlıkları $247,29 \pm 1,709$ gr olan 27 adet Wistar Albino ırkı erişkin dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, Başkent Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Üretim Ünitesi'nden sağlandı. Hayvanlar, optimum laboratuvar koşullarında, ($20 \pm 2^\circ\text{C}$ oda sıcaklığı, $\%50 \pm 10$ nemli ortam, 12 saatlik aydınlık / karanlık periyodu) polikarbon kafeslerde (Ehret, Almanya ve Techniplast, İtalya) tutulup, standart kuru peletler halindeki sıçan yemi (Purina®) ile beslendi.



Resim 3: Wistar Albino ırkı erişkin dişi sıçan

Deneysel protokolü Başkent Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı sonrasında Araştırma Kurulu tarafından DA 06/16 proje numarası ile desteklendi ve

deneysel alışmalar Başkent Üniversitesi, Deney Hayvanları retim ve Araştırma Merkezi, Araştırma nitesi Ameliyathanelerinde “National Institutes of Health, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” kurallarına uygun olarak gerçekleştirildi. Cerrahi prosedür esnasında disseksiyon aşamasında operasyon mikroskobu (OPML 9-FC, Zeiss, Almanya) kullanıldı.

GRUPLAR

Grup 1: KONTROL (6 Rat)

Grup 2: AMİFOSTİN (6 Rat)

Grup 3: İSKEMİ (6 Rat)

Grup 4: AMİFOSTİN+İSKEMİ (6 Rat)

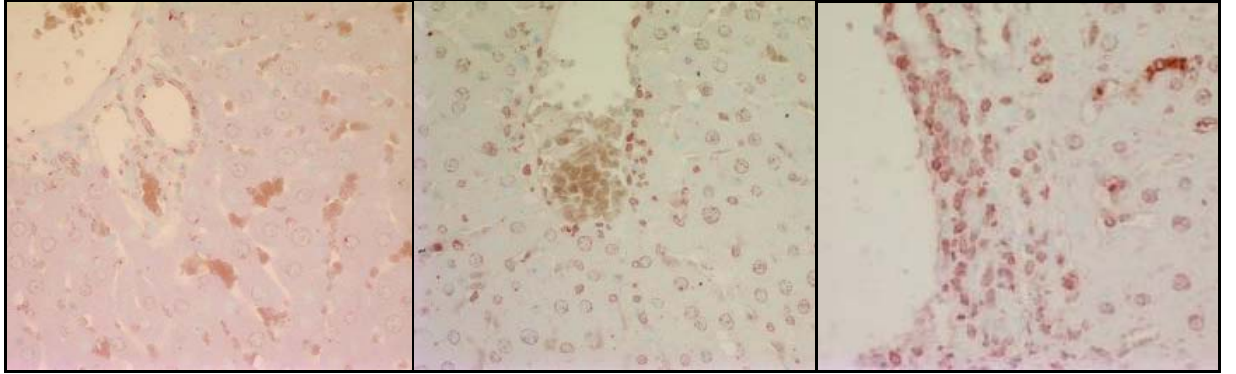
ÖN ÇALIŞMA

Safra yolu epiteli üzerinde daha önceden yapılmış in vivo iskemi modeli olmaması sebebiyle ayrı ayrı 1, 2 ve 3 saatlik izole hepatik arteriyel iskemiler oluşturuldu. Bu 3 grup immnhistokimyasal olarak apopitoz, PCNA ve elektron mikroskopisi ile ultrastriktrel değişimler açısından değerlendirildi. İskemik belirtilerin izlendiği en uygun srenin 2 saat olduğuna karar verildi.

Apoptoz

Tablo 1: TUNEL için ön çalışma indeks değerleri

Örnek	Toplam safra duktus epitel sayısı	Nükleer pozitif safra duktus epitel sayısı	%
I. saat	139	2	1,438
II. saat	166	5	3,012
III. saat	150	5	3,333



1. Saat

2. Saat

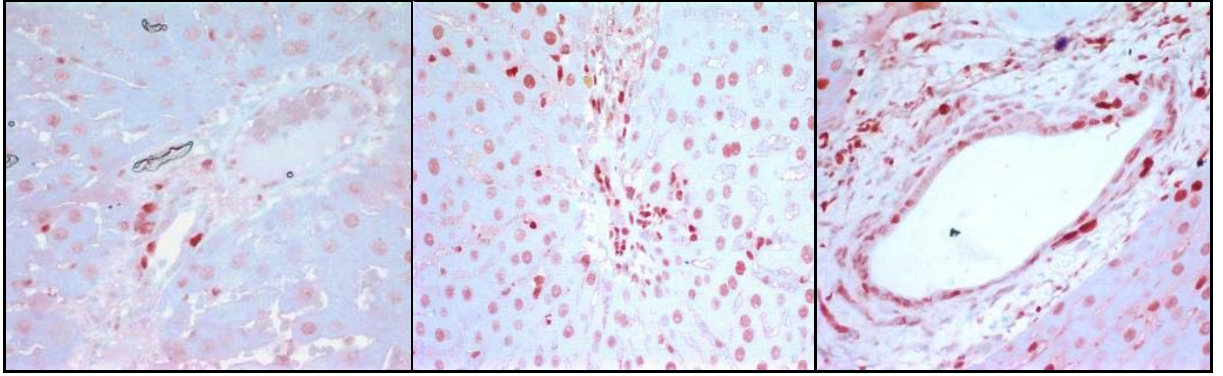
3. Saat

Resim 4: Apoptoz ön çalışma TUNEL boyamaları

PCNA

Tablo 2: PCNA için ön çalışma indeks değerleri

Örnek	Toplam safra duktus epitel sayısı	Nükleer pozitif safra duktus epitel sayısı	%
I. saat	193	4	2,072
II. saat	114	6	5,263
III. saat	142	10	7,042



1. Saat

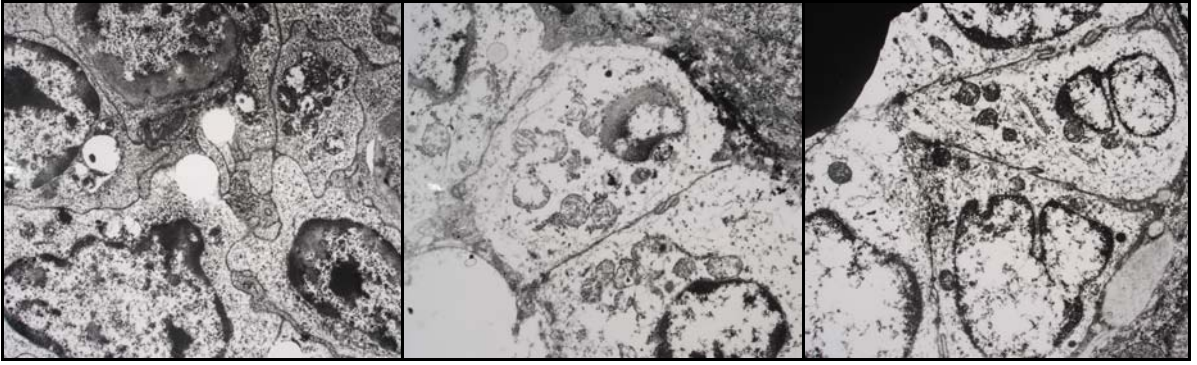
2. Saat

3. Saat

Resim 5: Proliferasyon ön çalışma PCNA boyamaları

Elektron Mikroskopi

Elektron mikroskopide oluşturulan 1 saatlik iskemide hücrede ultrastrüktürel olarak yalnızca hücrelerin birleşim yerlerinde, makula adherenslerde değişimler olduğu , iki saatlik iskemide çekirdeğin küçülüp koyulaştığı, çekirdek membranının düzensizleşmeye başladığı,. üç saatlik iskemide ise çekirdeğin parçalandığı ve mitokondri yapılarının bozulduğu tesbit edildi.



1. Saat

2. Saat

3. Saat

Resim 6: Elektron mikroskopik ön çalışma (Kurşun sitrat – Uranil asetat) X 4646

AMİFOSTİN' İN UYGULANIŞI VE SIVI REPLASMANI

Cerrahi işlemden 2 saat önce, Amifostin 200 mg/kg bolus dozunda sc olarak verildi. İlaç uygulaması ile eş zamanlı, her bir rata ilacın akut etkisi olan hipotansiyonu önleme amacı ile ortalama 3 cc SF intraperitoneal verildi. Cerrahi öncesi tüm ratlara, 45 mg/kg ketamin ve 20 mg/kg xylazin intraperitoneal olarak verilerek uygun anestezi ve kas gevşemesi sağlandı. İlacın ve laparatominin getireceği sıvı açığını karşılamak amacı ile her rata ek olarak ortalama 5 cc SF karın insizyon kapatılmadan önce intraperitoneal olarak verildi.

Ratlara, yükleme dozu olarak ilacın veridiği saat paralelinde, takip eden 5 gün süresince 10mg/ kg dozda Amifostin idame dozu olarak uygulamaya devam edildi.

Heparin

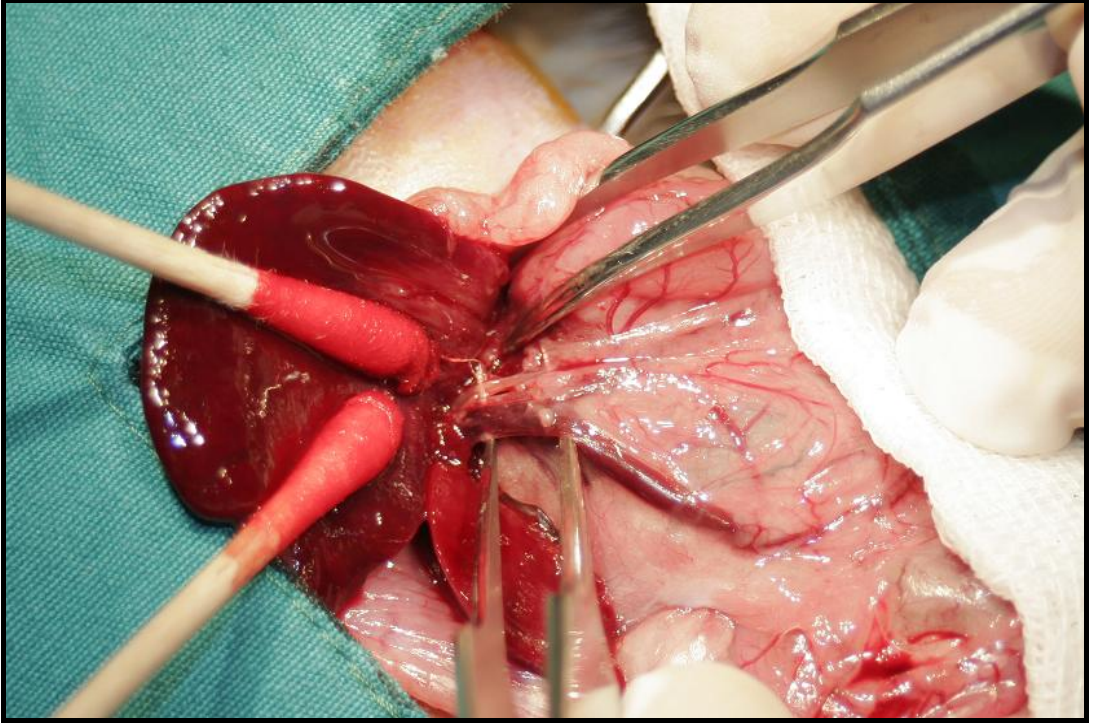
Hepatik arterin klemplenmesi sırasında oluşması muhtemel trombozu engellemek için her rata 150 UI/kg dozunda heparin uygulandı (92).

CERRAHİ TEKNİK

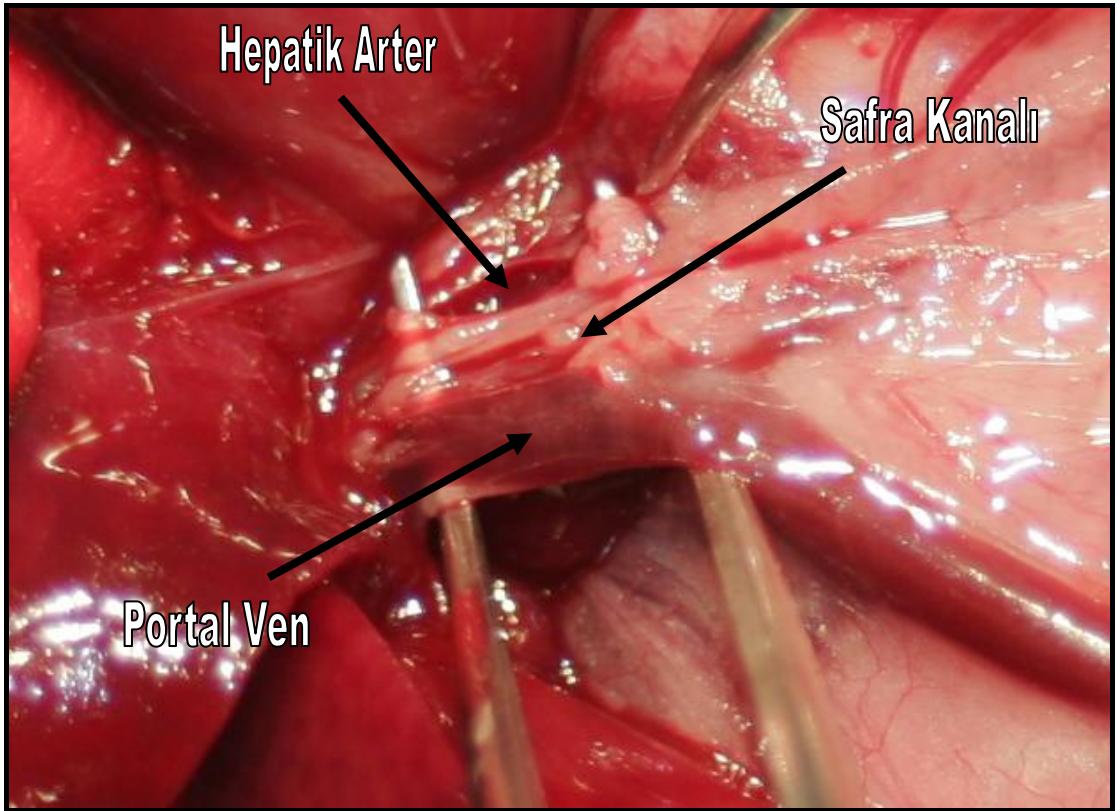
Anestezi alan ratların, insizyon sahası traşlandı. Povidon iyot ile cilt antisepsisi sağlandıktan sonra, ameliyat düzeneğine kol ve bacakları tesbit edildi. Düzenek aspirasyon riskini önlemek amacıyla, 30⁰ eğimle tutuldu ve steril örtü insizyon alanı açıkta kalacak şekilde kapatıldı. Orta hat insizyonu tercih edildi. Laparotomi sonrası ince barsaklar karın dışına alındı, portal pedinkül görüntülendi. Takiben mikroskop altında hepatic arter izole olarak disseke edildi, portal ven ve safra yolundan ayrıldı.

İskemi: Porta üzerinde bası oluşturmayacak şekilde hepatic artere yerleştirilen mikrovasküler klemp ile sağlandı. İskemi süresi n çalışmada belirlendiği gibi 2 saat olarak uygulandı. Bekleme süresi dolduktan sonra mikroklemp kaldırılarak reperfüzyon sağlandı ve reperfüzyonun olduğu LDF ile doğrulandı. Isı kaybını nleme amacı ile her rat bu süreçte ısı lambası altında tutuldu.

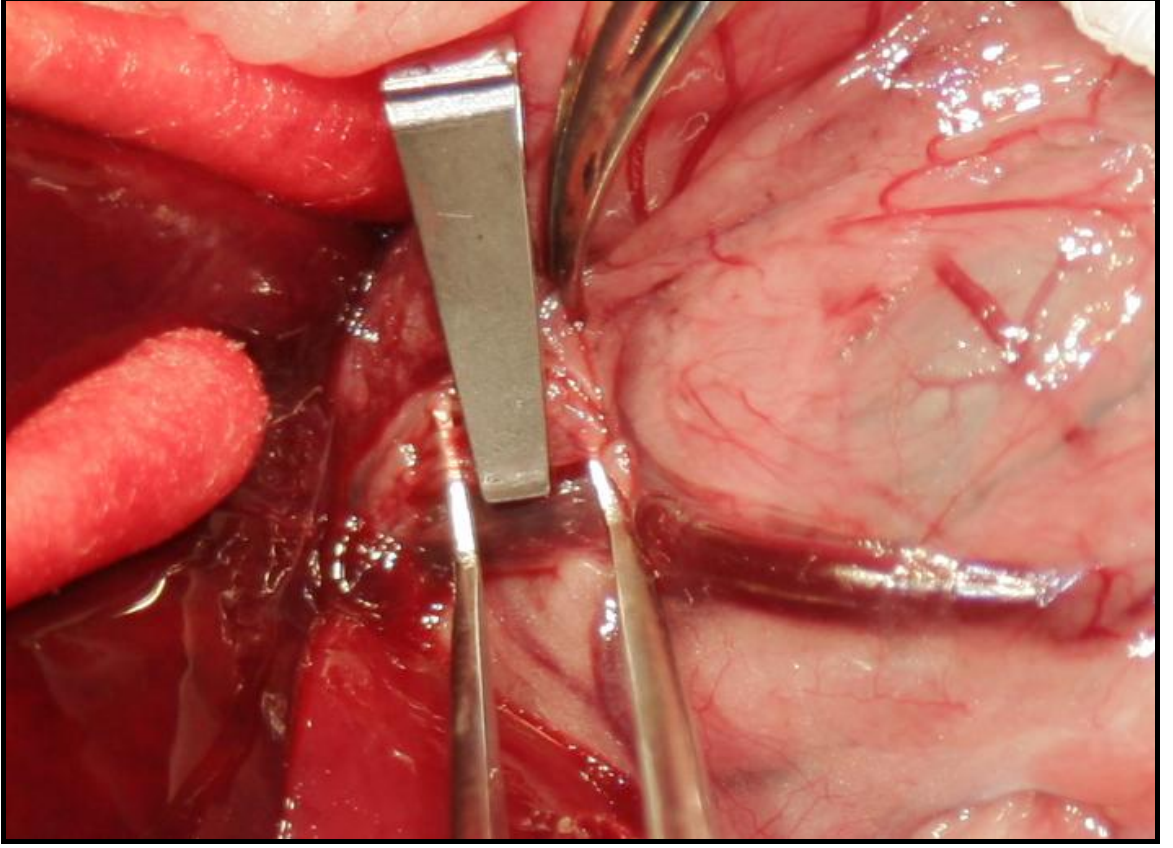
Cerrahi sonrası tüm ratların insizyonu, 3/0 ipek kullanılarak 2 tabaka halinde kapatıldı. Ratlara anestezinin etkisi geçene kadar oral verilmedi .



Resim 7: Portal pedikül disseksiyonu



Resim 8: Portal pedikül



Resim 9: İzole arteriyel iskemi ve mikro klemp uygulanması

Sakrifikasyon

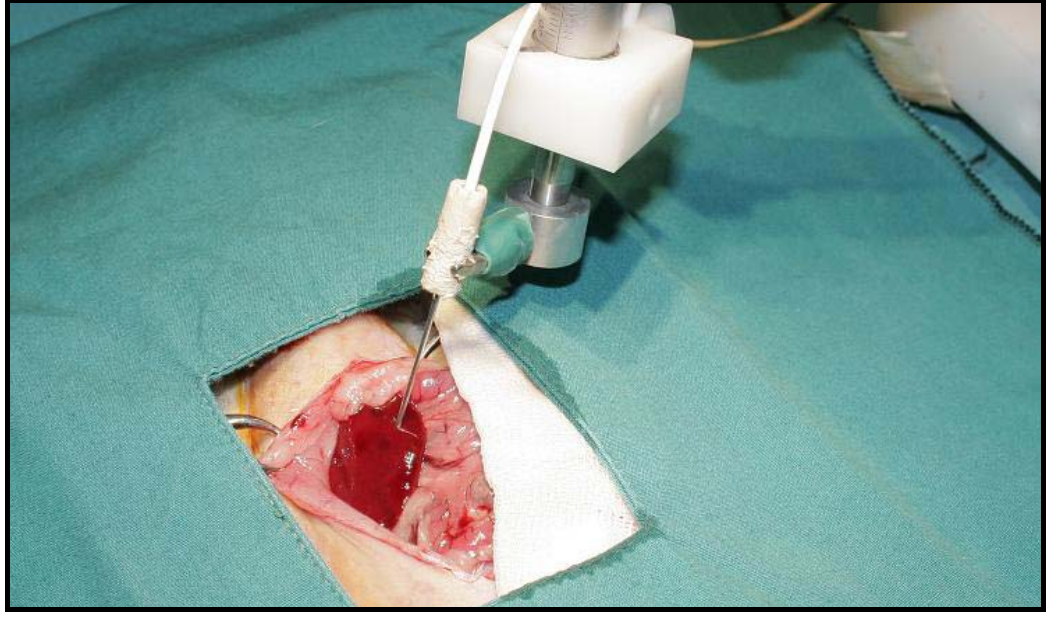
Ameliyat sonrası beşinci gün, tüm ratlar sakrifiye edildi. Anestezi altında relaparatomiyi takiben karaciğer üzerinden tekrar LDF ölçümleri yapıldı. Sağ mediyal visseral rotasyon yapılarak abdominal aortaya ulaşıldı ve doku perfüzyonunun hesaplanması için kullanılacak olan kan basınçlarının ölçümü amacı ile abdominal aortaya kanül yerleştirildi. Kan basıncı ölçümünü takiben biyokimyasal incelemeler için portal venden kan alındı. İmmünohistokimyasal incelemeler, MDH-GSH ölçümleri ve elektron mikroskopik incelemeler için hepatektomi yapılarak karaciğer loblarına ayrıldı. Her bir inceleme grubu için aynı lobun gönderilmesine dikkat edildi.

LASER DOPPLER FLOWMETRİ

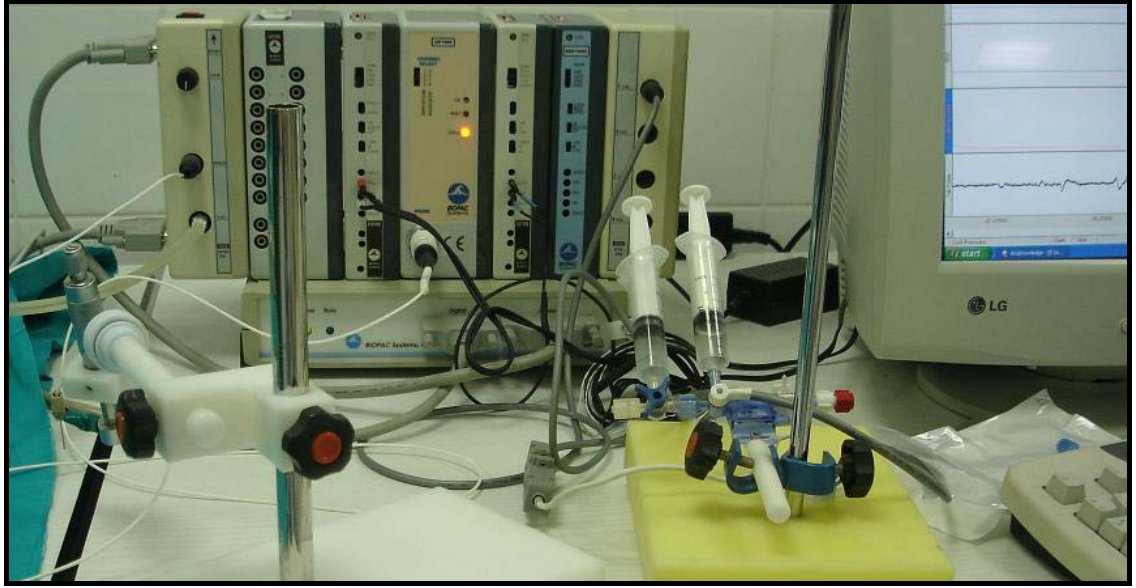
“Laser doppler flowmetri” 25mm uzunluk x 1mm çaplı iğne probu bulunan bilgisayar kontrollü bir akım ölçüm sistemidir (TSD 144, LDF; BIOPAC, MP 100A model, Kaliforniya, ABD). Çalışma prensibi olarak probdan çıkan lazer pı, probun çapı kadar bir alanda eritrositler üzerinden geri yansıyarak akım ölçümünü gerçekleştirmektedir. Sonuçlar “Blood Perfusion Unit” (BPU) olarak değerlendirilir. Bu değer ölçümün yapıldığı noktadaki anlık eritrosit perfüzyonunu veya kan akımını yansıtmaktadır. Prob doku üzerine dik şekilde yerleştirilmekte ve ardışık seri ölçümler alınmaktadır.

Perfüzyonun değerlendirilmesinde kullanılmak üzere ortalama kan basıncı abdominal aortaya yerleştirilen kanül aracılığı ile ölçüldü ($MAP = [SKB + 2DKB] / 3$). Bu ölçüm esnasında bilgisayar kontrollü fizyolojik veri kayıt sistemi (BIOPAC, MP 100A model, Kaliforniya, ABD) kullanıldı. Sonuçlar istatistiksel analiz yapılana kadar dijital ortamda saklandı.

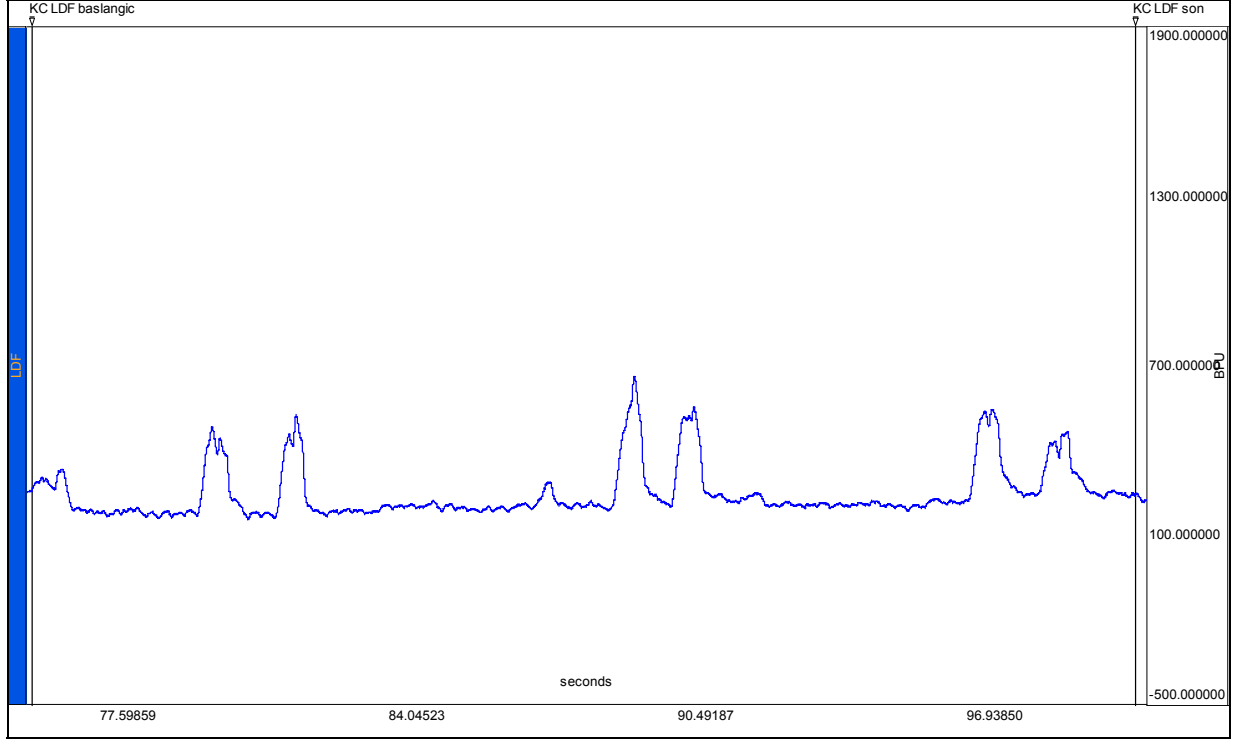
İskemi yapılan gruplarda LDF ölçümleri iskemi öncesi, iskemi esnası ve iskemi sonrasında yapıldı. Ayrıca tüm gruplarda sakrifikasyon öncesinde doku perfüzyonu olası trombozu ekarte etmek amacı ile LDF ile tekrar değerlendirildi.



Resim 10: LDF ölçümü



Resim 11: TSD 144 LDF; BIOPAC, MP 100A Kaliforniya, ABD



Resim 12: LDF değer grafiği

BİYOKİMYASAL ANALİZ

Karaciğer sol lob örnekleri biyokimyasal analizler yapıncaya kadar -86°C 'de saklandı. Tüm biyokimyasal analizler çift çalışma şeklinde gerçekleştirildi.

- Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Doku örneklerinde malondialdehit (MDA) ve redükte glutatyon (GSH) analizleri için doku homojenatları soğukta 0,15 M KCl içinde (%10, w/v) cam homojenizatör kullanılarak hazırlandı.

- Doku MDA Derişiminin Saptanması

Lipid peroksidasyon belirteci olarak doku MDA derişimi Beuge ve Aust tarafından tanımlanan yöntemle göre analiz edildi (115). Yöntem, MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile yaptığı kompleksin kolorimetrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır. Bu yöntemle göre bir hacim doku homojenat örneği iki hacim %14 trikloroasetik asit ve % 0,375 tiyobarbitürik asit içeren 0,25 N HCl içinde 15 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Tepkime sonrası örnekler soğutuldu ve 1000x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatanın absorbansı 535 nm'de örnek köre karşı ölçüldü (Shimadzu-1601). MDA derişimleri molar ekstinksiyon katsayısı ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı ve nmol/g doku olarak ifade edildi.

- Doku GSH Derişiminin Saptanması

Doku GSH derişimleri Ellman'ın doku sülfidril grup tayini yöntemi ile gerçekleştirildi (116). Bu yöntemde doku proteinlerinin uzaklaştırılması amacı ile homojenat örneklerinin deproteinizasyonu gerçekleştirildi. Örneklerin 3000xg'de 10 dakika santrifügasyonu sonrası elde edilen süpernatanın Ellman ayracı ile oluşturduğu renkli kompleksin absorbansları örnek köre karşı 412 nm'de ölçüldü (Shimadzu-1601). GSH derişimleri GSH standart eğrisi kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar nmol GSH / mg protein olarak ifade edildi.

- Doku Total Protein Derişiminin Saptanması

Doku homojenatlarında total protein analizi Lowry ve arkadaşlarının yöntemine göre gerçekleştirildi (117). Bu yöntemde, peptit bağlarının alkali ortamda oluşturdukları kuproz iyonu Folin reaktifi ile tepkimeye girmekte ve

fosfomolibdotungstatı bakır katalizli aromatik amino asit oksidasyonu yolu ile heteromolibden mavisine indirgemektedir. Reaksiyon sonrası oluşan renkli kompleksin absorbansı 550 nm'de örnek körüne karşı spektrofotometrik olarak ölçüldü (Shimadzu-1601). Protein derişimleri standart eğri kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar mg/ml olarak ifade edildi.

İMMÜNHİSTOKİMYASAL ANALİZ

Karaciğer örnekleri %10 tamponlanmış formalin solüsyonunda tespit olduktan sonra her parafin bloktan 3 µm kalınlıkta kesitler alınarak hematoksilin & eozin, PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen, Ab-1, clone PC10, LabVision) ve In situ Cell Death Detection Kit (TUNEL, Roche Diagnostics) ile boyandı. Her iki immünohistokimyasal incelemede, her kesitte en az 100 tane olmak üzere kesitteki tüm safra duktus epitel hücreleri sayıldı ve bu hücrelerdeki nükleer pozitif boyanan safra duktus epitel sayıları saptandı (118,119).

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

3 µm kalınlıkta kesilen örnekler 15 saat 56 C° de etüvde bekletildikten sonra 30 dakika ksilende tutuldu. 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) solüsyonları karıştırıldıktan sonra kesitlere uygulandı ve 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 (3-amino-9-ethycarbazole) bekletildi. 2 dakika boyunca çeşme suyunda yıkanan kesitlere 10 saniye metil yeşili uygulandı ve AEC kapama jeli kullanılarak lamel ile kapandı.

- PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)

3 µm kalınlıkta kesilen örnekler 15 saat 56 C° de etüvde bekletildikten sonra 30 dakika ksilende tutuldu. Daha sonra 15 dakika alkolde bekletildi ve 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 15 dakika hidrojen peroksitte bekletilip 5 dakika TBS ile yıkandı. Antikor ½ oranında dilüe edilerek 1 saat boyunca oda ısısında kesitlerde bekletildi. 2 kez 5'er dakika TBS ile yıkanan kesitlere 20 dakika biotin, 5 dakika TBS ve 20 dakika avidin uygulandı ve tekrar 5 dakika TBS ile yıkandı. 10 dakika AEC'de bekletilen kesitler 2 dakika çeşme suyunda yıkandıktan sonra 10 saniye metil yeşili uygulandı. Kesitler çeşme suyunda yıkanıp oda ısısında kurutulduktan sonra AEC kapama jeli kullanılarak lamel ile kapandı.

ELEKTRON MİKROSKOPİK İNCELEME

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. Spesimenler propilen oksit içerisinde geçirildi, araldit CY 212, 2-dodesenil süksinik anhidrat, bezildimetil amin ve dibutilpivalat içine gömüldü. Yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile renklendirildi ve ışık mikroskobu altında sahalar seçildi. Ardından ince kesitler alınarak uranil asetat ve kurşun sitrat ile kaplanarak LEO 906E transmisyon elektron mikroskopisinde incelendi.

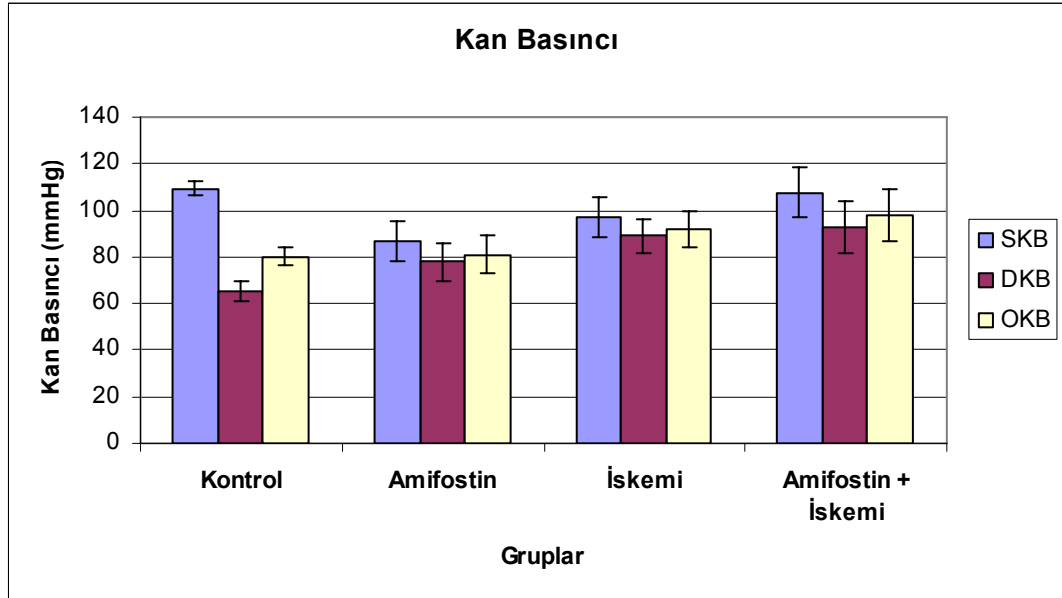
4. BULGULAR

- LDF Ölçümleri

Grup ortalamaları arasındaki farklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* Newman-Keuls çoklu karşılaştırma testi kullanılarak bulundu.

Tablo 3: Kan basınçları ortalama ve standart hata değerleri

Kan Basınçları	SKB		DKB		OKB	
	Ortalama	Standart Hata	Ortalama	Standart Hata	Ortalama	Standart Hata
Kontrol	109,50	2,95	65,33	4,29	80,06	3,69
Amifostin	86,83	8,67	77,83	7,88	80,83	8,14
İskemi	97,00	8,51	89,00	7,47	91,67	7,80
Amifostin+İskemi	107,67	10,99	92,67	11,19	97,67	11,02

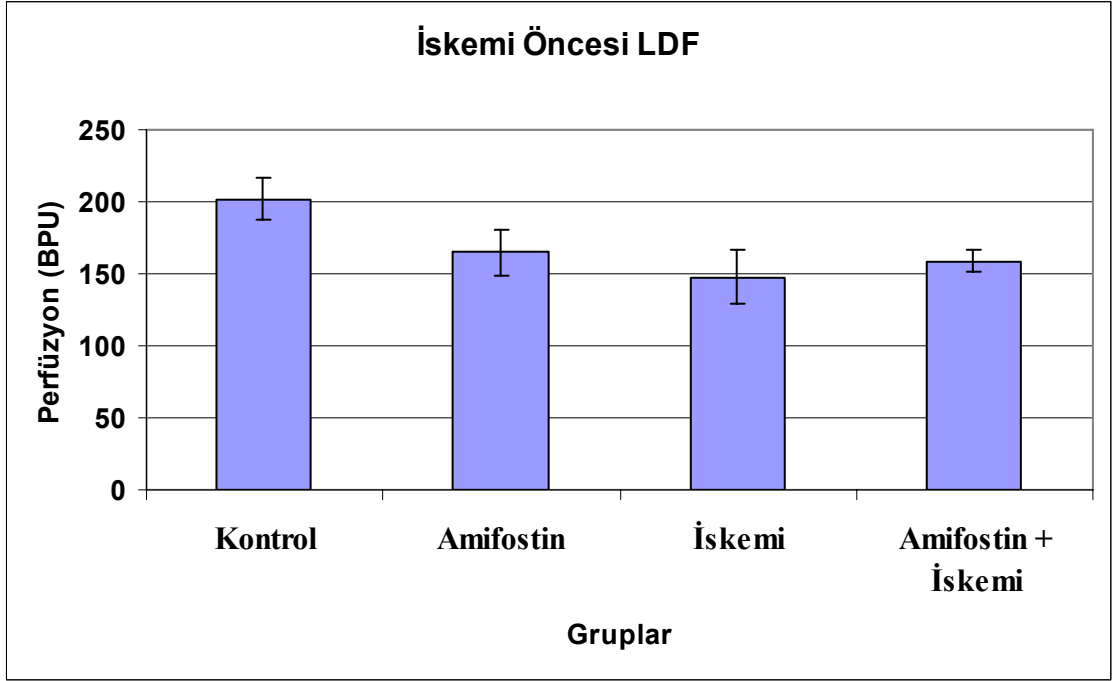


Grafik 1: Kan basınçları indeks değerlerinin dağılımı

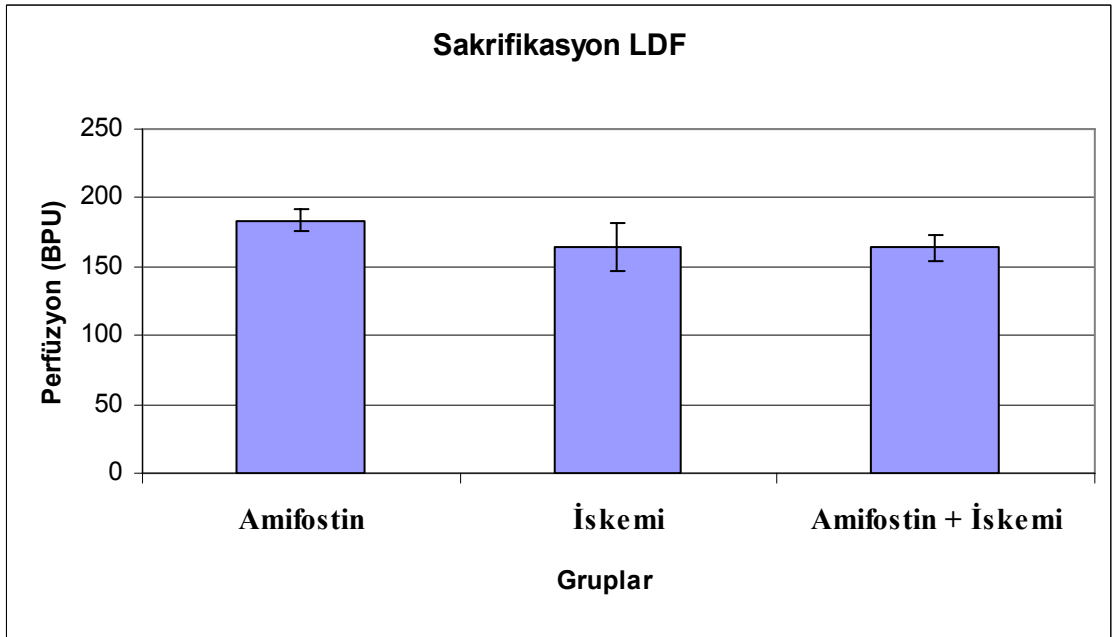
Gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamaktadır.

Tablo 4: LDF ortalama ve standart hata değerleri

İskemi Öncesi LDF				
	Kontrol	Amifostin	İskemi	Amifostin +İskemi
Ortalama	201,92	164,92	147,67	158,75
Standart Hata	14,58	15,67	18,33	7,82
İskemi Esnası LDF				
	Kontrol	Amifostin	İskemi	Amifostin +İskemi
Ortalama	-	-	91,08	95,83
Standart Hata	-	-	18,33	11,41
İskemi Sonrası LDF				
	Kontrol	Amifostin	İskemi	Amifostin +İskemi
Ortalama	-	-	138,67	149,83
Standart Hata	-	-	14,07	5,83
Sakrifikasyon LDF				
	Kontrol	Amifostin	İskemi	Amifostin +İskemi
Ortalama	-	183,5	164,83	163,67
Standart Hata	-	7,70	17,51	9,90

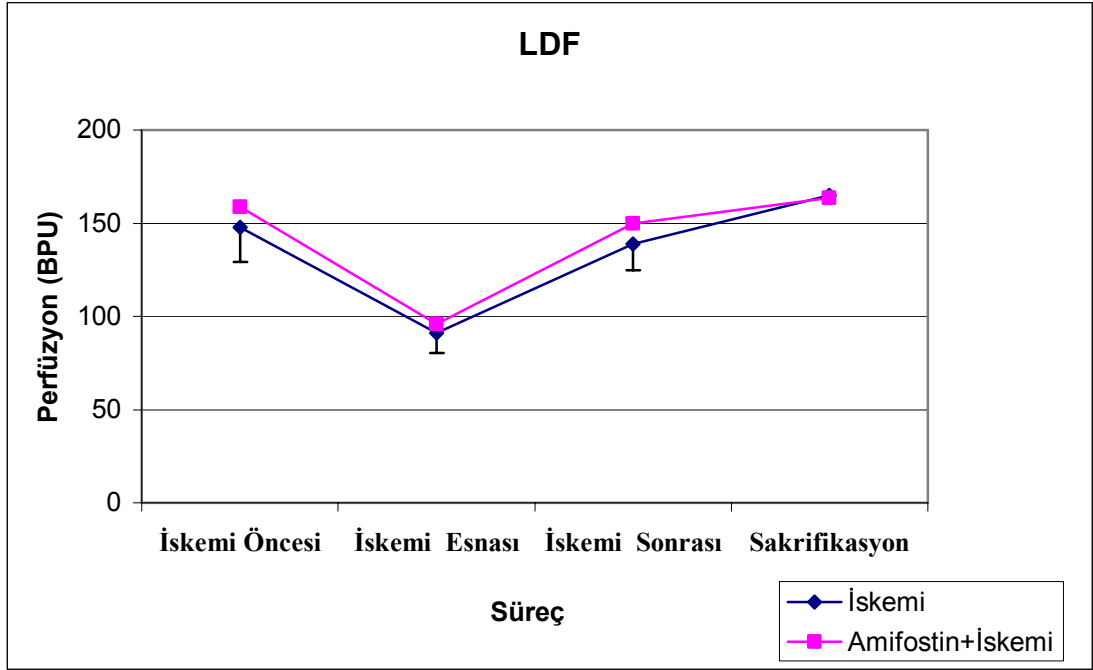


Grafik 2: LDF indeks değerlerinin dağılımı



Grafik 3: LDF indeks değerlerinin dağılımı

Gruplar arasında hem iskemi öncesi hemde sakrifikasyon LDF leri arasında istatistiksel farklılık anlamlı değil.

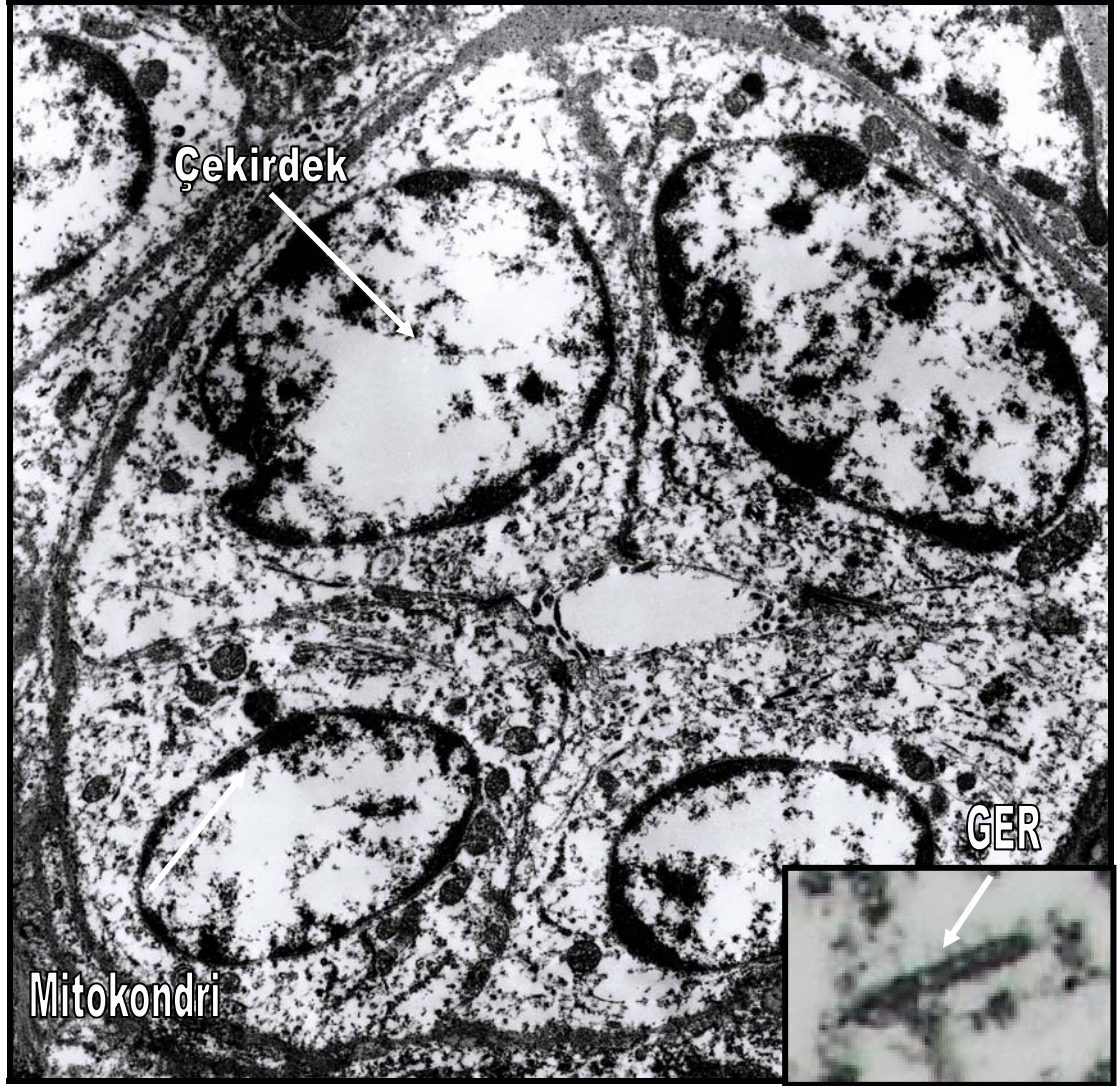


Grafik 4: LDF indeks değerlerinin sürece göre dağılımı

İskemi uygulanan grupların sürece göre LDF leri karşılaştırıldığında her iki grupta iskemi esnası LDF'ler diğer tüm gruplardan anlamlı derecede farklı ($p < 0,05$).

- **ELEKTRON MİKROSKOPİSİ**

Kontrol Grubu: Safra kanalını oluşturan epitel hücrelerinde çekirdek, mitokondriyonlar, granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve hücrelerin yan bağlantı birimleri (GAP junction, makula adherens) normal olarak saptandı.



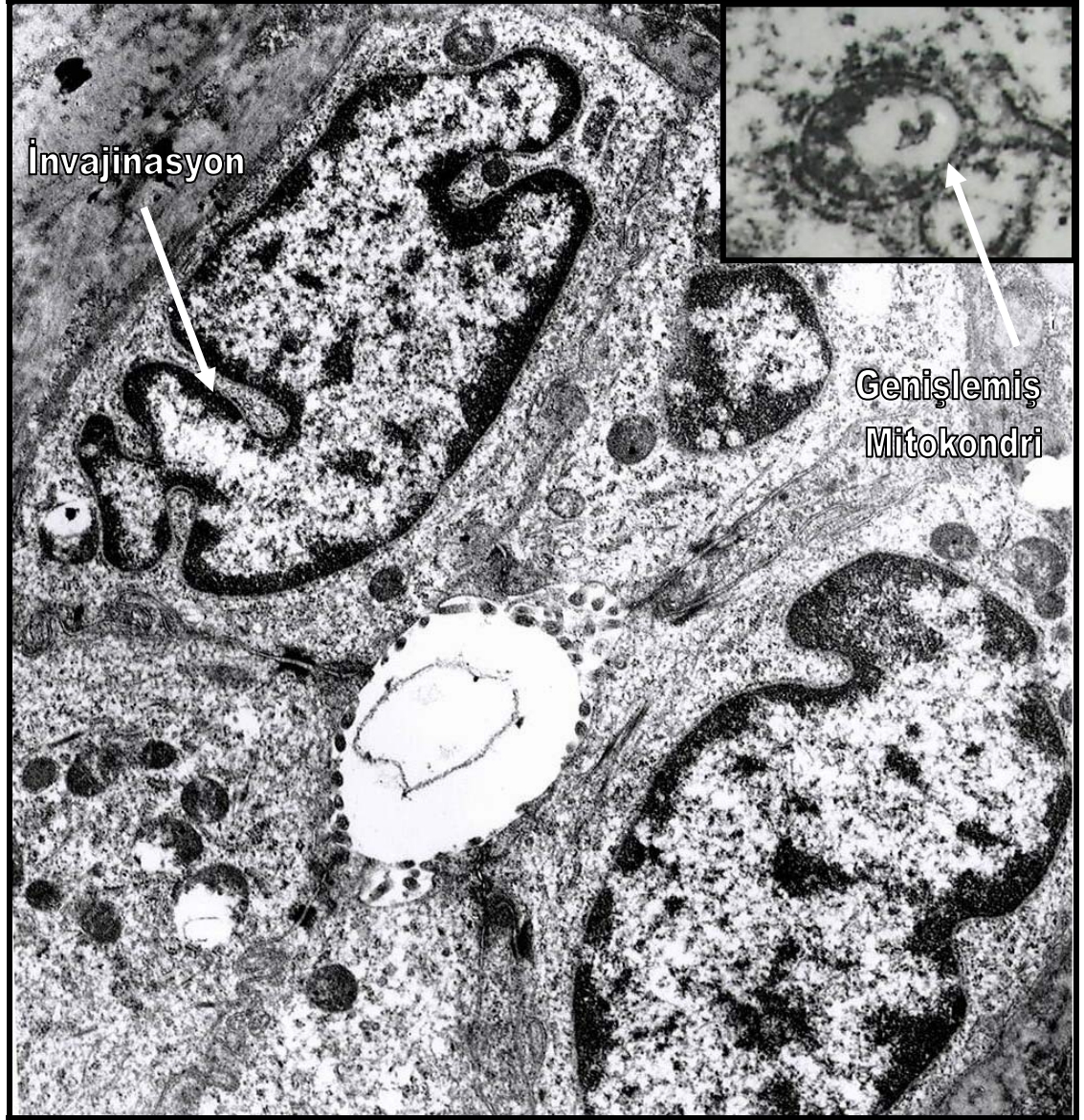
Resim 13: Kontrol grubu (Kurşun sitrat – Uranil asetat) X 4646

Amifostin Grubu: Epitel hücrelerindeki çekirdek, mitokondriyonlar, granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve hücrelerin yan bağlantı birimlerinde kontrol grubundan bir farklılık saptanmadı.

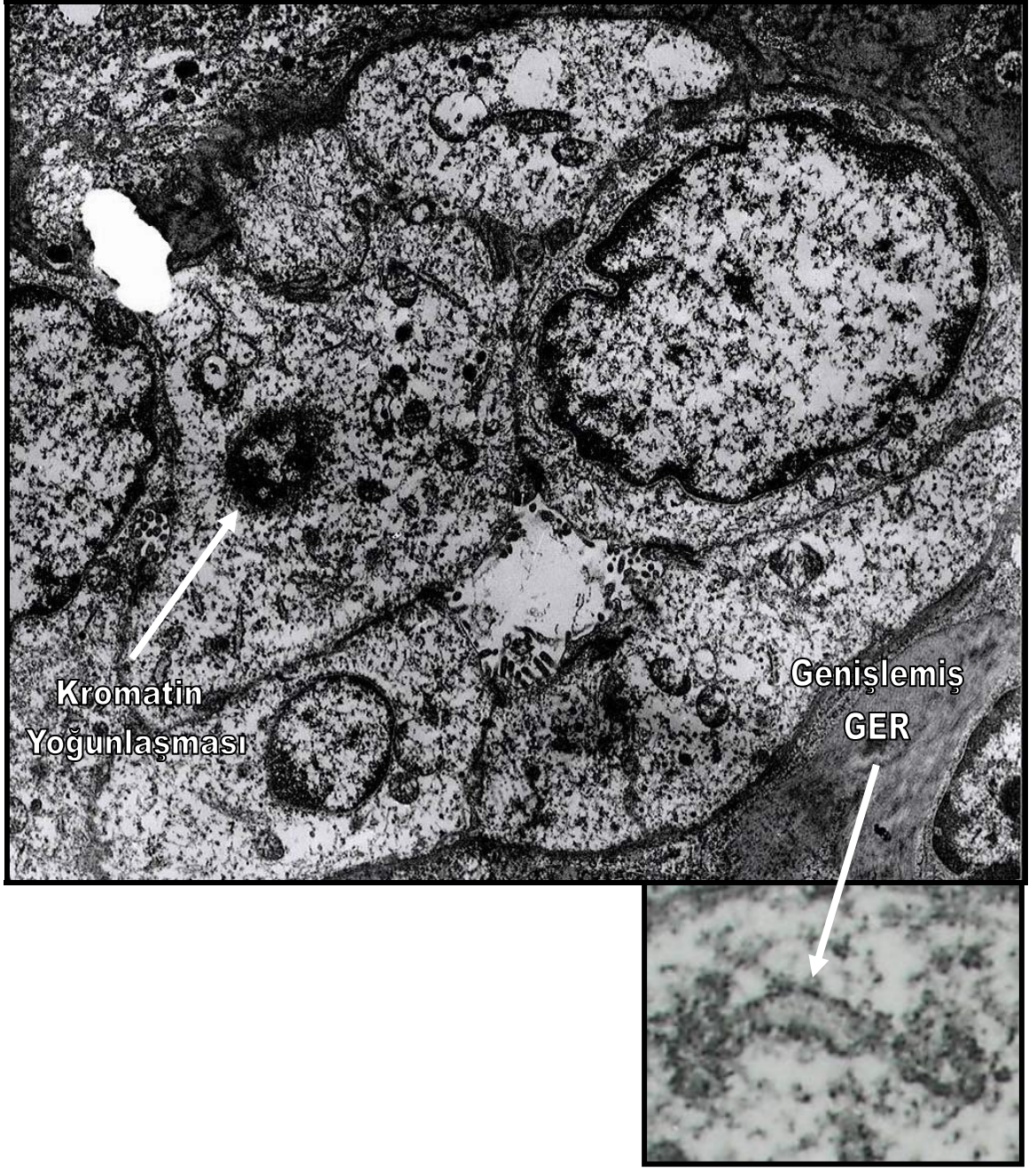


Resim 14: Amifostin grubu (Kurşun sitrat – Uranil asetat) X 4646

İskemi Grubu: Hücrelerde apoptoz görülmemekle birlikte çekirdekte kromatin yoğunluğunda artış ve çekirdek membranında derin invajinasyonlar dikkati çektii. Bunların dışında mitokondriyonlarda kristalarda silinme ve ödem hali saptandı. Ayrıca GER dilate olarak görüldü.

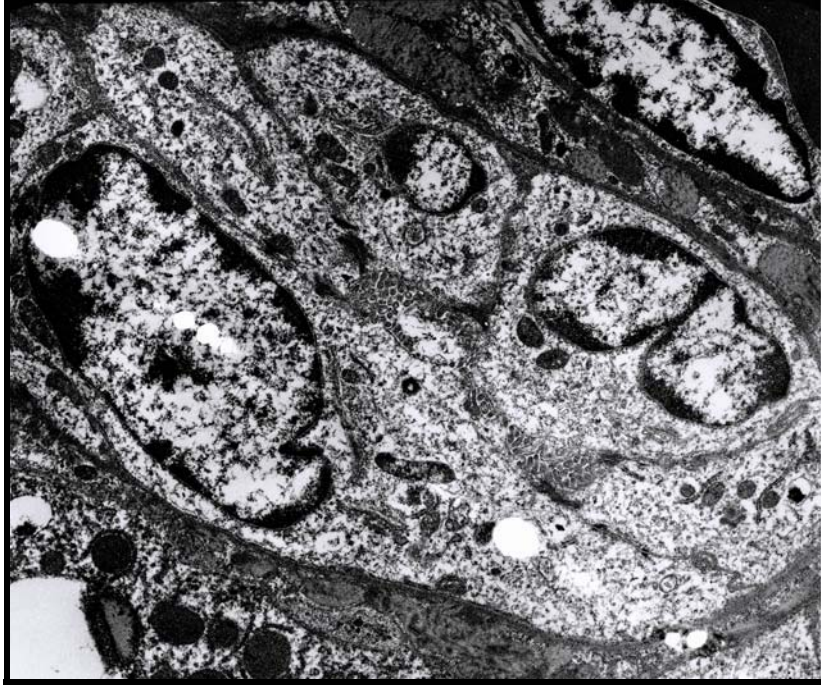


Resim 15: İskemi grubu (Kurşun sitrat – Uranil asetat) X 7750



Resim 16: İskemi grubu (Kurşun sitrat – Uranil asetat) X 4646

Amifostin + İskemi Grubu: Bu grupta yer yer iskemik değişiklikler görülmekle birlikte sayı ve şiddet olarak iskemi grubundan daha az olarak saptandı.



Resim 17: Amifostin + İskemi grubu (Kurşun sitrat – Uranil asetat) X 4646



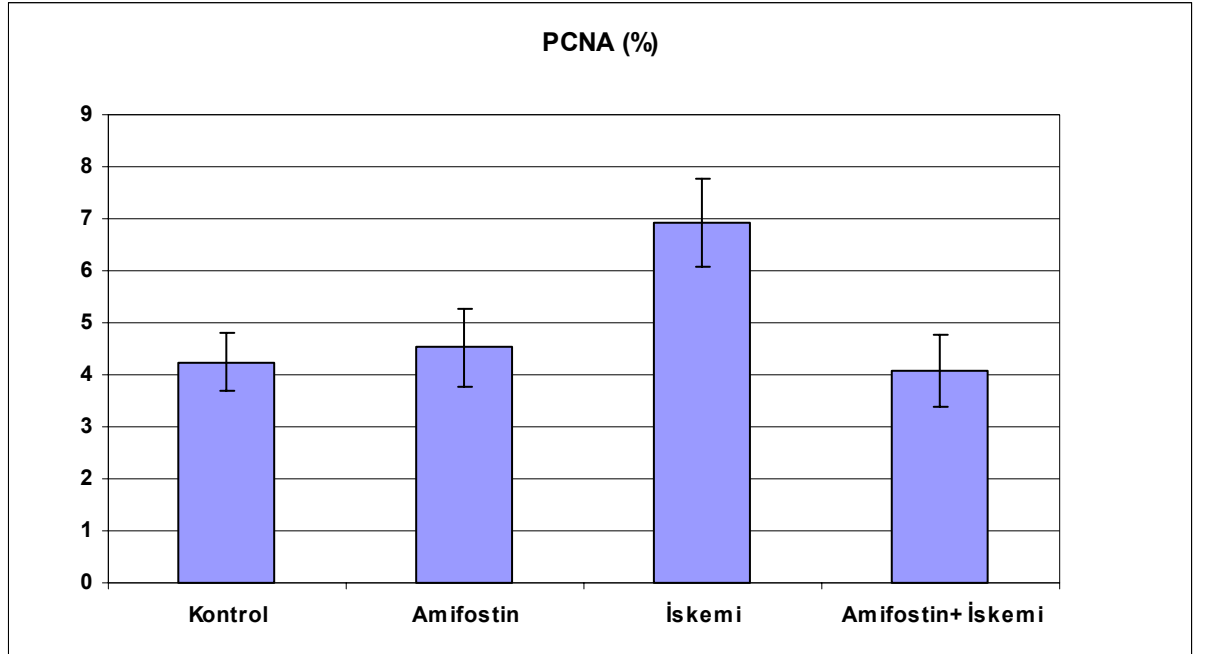
Resim 18: Amifostin + İskemi grubu (Kurşun sitrat – Uranil asetat) X 4646

- **PATOLOJİ**

Grup ortalamaları arasındaki farklar parametrik ve parametrik olmayan varyans analizi ve çoklu karşılaştırma yöntemleri SPSS 13.0 ve MINITAB 13.0 programları kullanılarak bulundu.

Tablo 5: PCNA için ortalama ve standart hata değerleri

PCNA (%)	Ortalama (%)	Standart Hata
Kontrol	4,25	0,544
Amifostin	4,52	0,741
İskemi	6,93	0,858
Amifostin+ İskemi	4,09	0,696



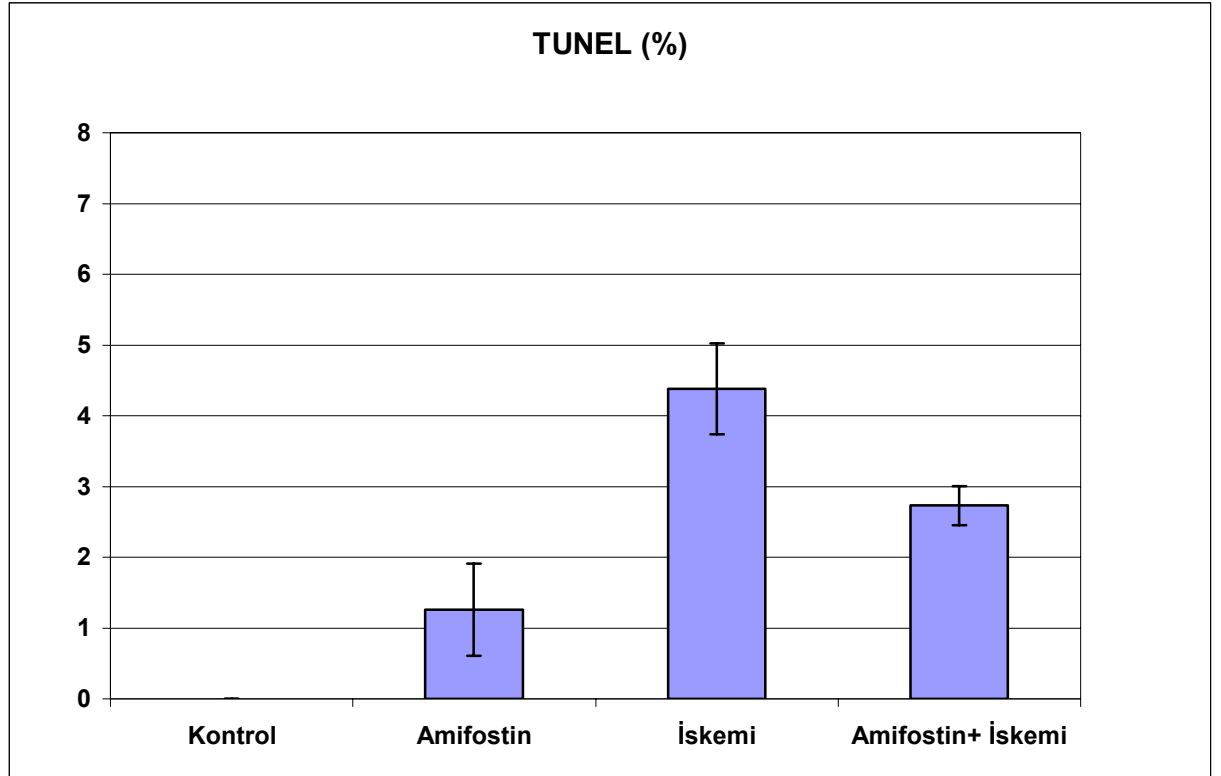
Grafik 5: PCNA indeks değerlerinin dağılımı

İskemi grubu diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı (p: < 0,01).

Diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değil.

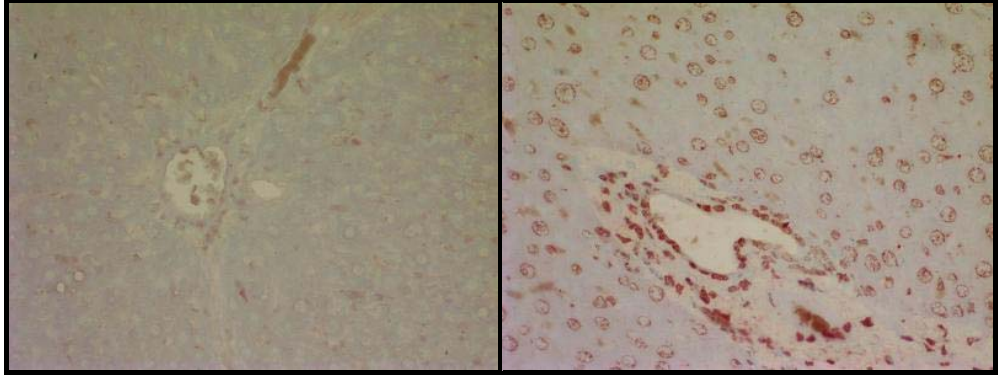
Tablo 6: TUNEL için ortalama ve standart hata değerleri

TUNEL (%)	Ortalama (%)	Standart Hata
Kontrol	0	0
Amifostin	1,26	0,645
İskemi	4,38	0,639
Amifostin+ İskemi	2,73	0,278



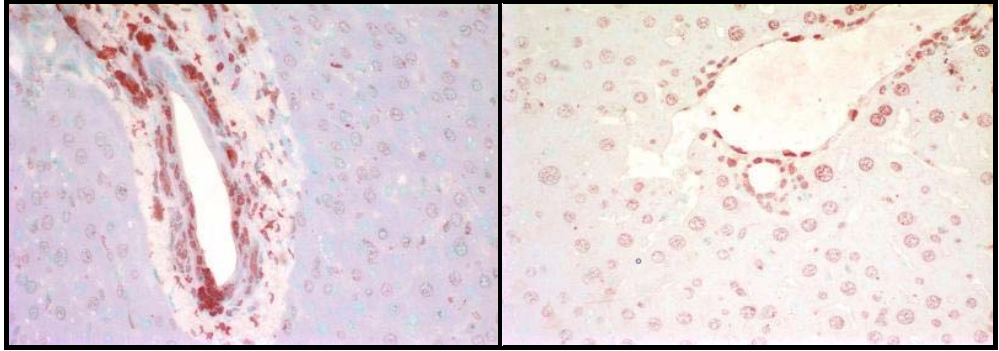
Grafik 6: TUNEL indeks değerlerinin dağılımı

Tüm gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,01$).



Kontrol Grubu

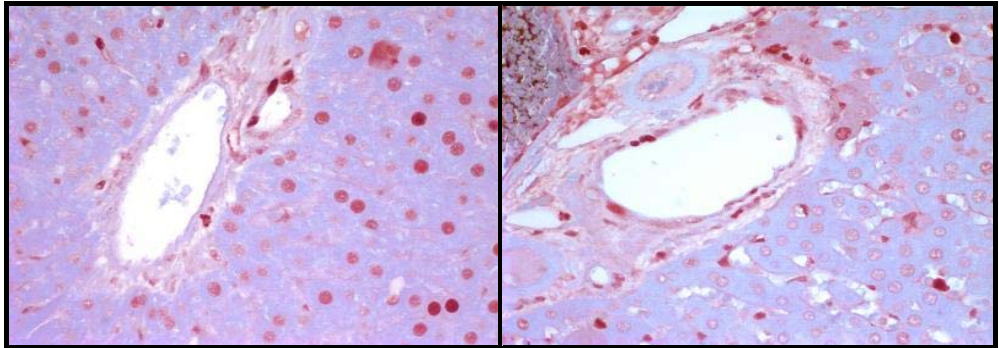
Amifostin Grubu



İskemi Grubu

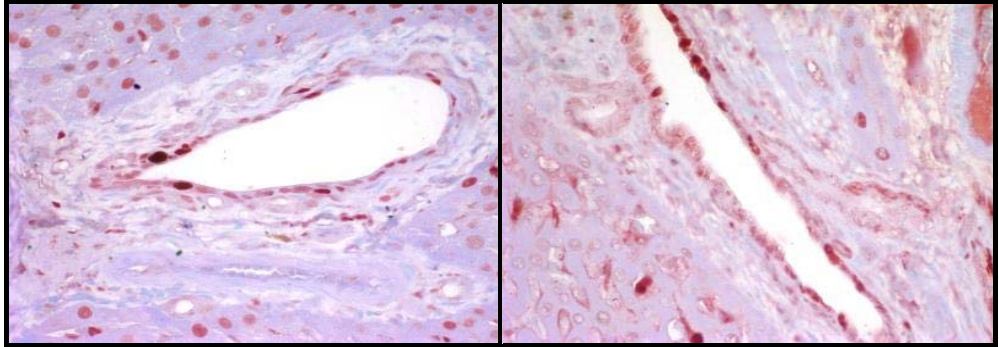
Amifostin+İskemi Grubu

Resim 19: Gruplara göre TUNEL boyamaları.



Kontrol Grubu

Amifostin Grubu



İskemi Grubu

Amifostin+İskemi Grubu

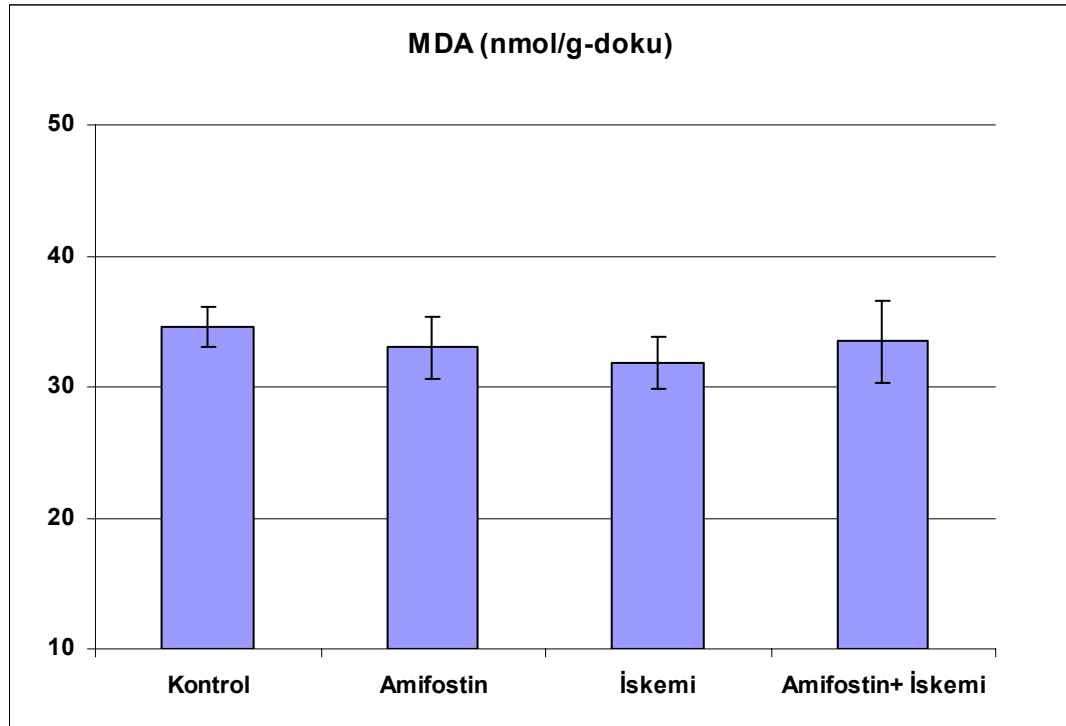
Resim 20: Gruplara göre PCNA boyamaları.

• MDA-GSH ANALİZLERİ

Grup ortalamaları arasındaki farklar parametrik ve parametrik olmayan varyans analizi ve çoklu karşılaştırma yöntemleri SPSS 13.0 ve MINITAB 13.0 programları kullanılarak bulundu.

Tablo 7: MDA için ortalama değerler ve standart hata değerleri

MDA (nmol/ g-doku)	Ortalama	Standart Hata
Kontrol	34,60	1,556
Amifostin	33,00	2,328
İskemi	31,82	2,018
Amifostin+İskemi	33,48	3,149

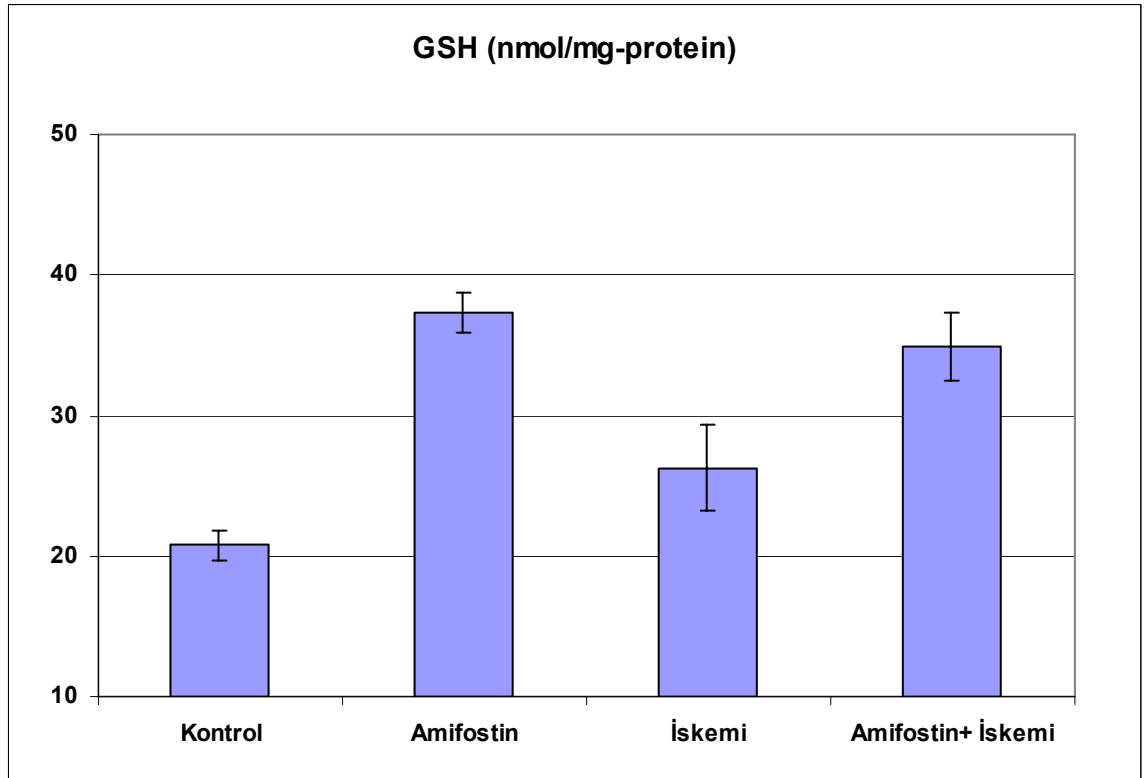


Grafik 7: MDA indeks değerlerinin dağılımı

Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değil.

Tablo 8: GSH için ortalama değerler ve standart hata değerleri

GSH (nmol/ mg-protein)	Ortalama	Standart Hata
Kontrol	20,79	1,096
Amifostin	37,35	1,450
İskemi	26,26	3,029
Amifostin+İskemi	34,92	2,383



Grafik 8: GSH indeks değerlerinin dağılımı

Kontrol grubu istatistiksel olarak diğer tüm gruplardan farklı ($p < 0,01$).

İskemi grubu istatistiksel olarak diğer tüm gruplardan farklı ($p < 0,01$).

Amifostin ve iskemi+amifostin grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değil.

5. TARTIŞMA

Günümüzde, karaciğer transplantasyonu son dönem karaciğer yetmezliği veya akut karaciğer yetmezliği gibi daha önceden sonu mutlak ölüm olan hastalıklarda başarı ile uygulanmaktadır. Transplantasyondaki gelişmeler ve buna bağlı olarak yapılan transplantasyon sayısındaki artma sebebi ile daha önceden görülmeyen komplikasyonlar artık karşımıza daha sık çıkmakta ve önemli derecede morbidite, mortalite ve maliyet artışına sebep olmaktadır.

Bu komplikasyonlar içerisinde sıklıkta görülen vasküler komplikasyonlar genel olarak %9 oranında rapor edilmektedir (12). Hepatik arter stenoz ve trombozları vasküler komplikasyonlar arasında en sık görülenleri olup insidansları seriden seriye değişmekle birlikte %6 ila %11 arasındadır (13). Pediyatrik vakalarda ise hepatic arter çapının daha küçük olmasına bağlı olarak komplikasyon görülme sıklığı daha da artmaktadır.

Günümüzde gelişen radyolojik olanaklarla birlikte hepatic arteriyel komplikasyonların erken dönemde tanısı ve tedavisi, ya cerrahi ya da anjiyografik yöntemlerle tedavisi mümkün olabilmektedir. Ancak ne yazık ki bazı vakalarda erken dönemde kan akımının başarılı olarak tekrar sağlanmasına rağmen istenen sonuçlar alınamamakta ve takiben değişik oranlarda biliyer sisteme ait komplikasyonlar (striktürler, biliyomalar, safra kaçakları, sık kolanjit atakları vs.) görülmektedir (16,56). Karaciğer nakli sonrası erken dönemde safra yollarının beslenmesinin yalnızca hepatic arter yolu ile olduğu ve iskemi sonrasında gelişen

hasardan ise primer olarak serbest oksijen radikallerinin sorumlu olduğu bilinmektedir. (16,56,57,58,59). Bunun dışında klinik uygulamada primer ve metastatik karaciğer tümörlerinde uygulanan intraarteriyel kemoembolizasyon özellikle hepatik rezervi azalmış hastalarda hastayı hepatik yetmezliğe sokma korkusu ile rahat uygulanamamakta ve doz azaltımına gidilmektedir (70,71).

Öte yandan literatürde daha önceden yapılmış izole hepatik arter iskemisi ile ilgili in vivo çalışmaların sayısı oldukça azdır (17). Bu yüzden, çalışmamızda klinikte görülen iskemi-reperfüzyon olgularının sonuçlarını ve safra yolundaki iskeminin etkilerini, deneysel olarak gerçekleştirdiğimiz in vivo iskemi-reperfüzyon modeli ile araştırmaya çalıştık.

Ratlarda izole hepatik arteriyel iskeminin, hücresel düzeyde değişiklik yapabilmesi için ne kadar süre devam ettirilmesi gerektiğinin bilinmemesi ve iskemi süresi-sağkalım ilişkisi hakkında daha önceden gerçekleştirilmiş bir modelin olmaması nedeniyle, hücresel değişiklikleri değerlendirmek amacı ile üç farklı iskemi zamanı uygulandığı bir  n çalışma grubu oluşturduk. Bu  n çalışma modelinin verilerinin, elektron mikroskopik ve immünhistokimyasal olarak değerlendirilmesi sonucunda iki saatlik iskeminin, oluşturacağımız in vivo arteriyel iskemi-reperfüzyon modeli için uygun olacağına karar verdik (121).

Amifostin; farmakokinetiğinin, etki ve yan etkilerinin iyi bilinmesi, iskemi-reperfüzyon hasarında etkinliğinin kanıtlanmış olması sebebi ile deneysel araştırmalarda ve klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır (14,15). Farmasötik madde olarak FDA (*Food and Drug Administration*) onayı aldığı 1998 yılından beri onkoloji kliniklerinde anti-kanser kemoterapisi alan hastalarda, kemoterapinin

olumsuz etkilerinden tümör hücreleri dışındaki hücreleri korumak amacı ile uygulanmaktadır (78,80).

Amifostin bu izole sitoprotektif etkisini, serbest radikalleri azaltarak ve hücrede DNA stabilizasyonunu sağlayarak yapar (78,80). Amifostinin selektif koruyucu etki mekanizması, tümoral endotel ve stromal hücrelerde alkalen fosfataz aktivitesinin olmamasından kaynaklanır. Bu nedenle amifostin tümör hücrelerinde aktif metabolitine dönüşmez ve hücreyi kemoterapötiklerin etkisinden korumaz (80,104,105).

Bu nedenle oluşturduğumuz in vivo izole arteriyel iskemi modelinde, oluşacak reperfüzyon hasarının azaltılmasında yararlı olacağını düşündüğümüz amifostini kullandık.

Lazer Doppler Flowmetri (LDF) hareket halindeki bir nesneden yansıyan radyasyonun frekansında oluşan doppler kaymasının kaydedilmesi esasına dayanan yeni bir tekniktir. Bu teknik düşük güçlü monokromatik lazer ışını taşıyan bir optik prob ile doku kan akımının sürekli ve non-invazif ölçümünü mümkün kılmaktadır. Lazer ışını eritrositler üzerinden yansımakta ve proba geri dönmekte, ardından ölçüm bilgisayar eşliğinde LDF değeri olarak yansıtılmaktadır (122,123).

Çalışmamızda selektif olarak uyguladığımız arteriyel mikro-klempin hepatik perfüzyon üzerindeki değişimlerini ardışık olarak uyguladığımız LDF ölçümleri ile değerlendirdik.

Ayrıca yapılan LDF ölçümleri bize arteriyel oklüzyon sonrası perfüzyonun tekrar yerine gelip gelmediği ve ratların izlendiği 5. günün sonundaki perfüzyonun ilk güne göre değişip değişmediği hakkında da bilgi verdi.

Tüm bu değerli verilere karşın LDF ile değerlendirebildiğimiz perfüzyon transhepatik kan akımı ölçümü ile hesaplanan, hepatik arter ve portal ven tarafından birlikte oluşturulan perfüzyondu. Selektif olarak hepatik arterin perfüzyona olan net etkisi rat hepatik arterinin oldukça ince olması ve ölçüm esnasında arterin solunum ve kalp vuruları ile hareket etmesi sebebiyle değerlendiremedik. Bu durum izole hepatik arteriskemi-reperfüzyon modelinde LDF'nin dezavantajı olarak yorumlanabilir.

Perfüzyonun değerlendirilmesinde kullanılmak üzere ölçülen kan basınçlarında gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. İlaç alan ve almayan gruplar arasında fark oluşmaması Amifostin'in hipotansif etkisinin subkutan uygulamada oluşmadığını düşündürmektedir.

Deneysel modelimizdeki LDF sonuçları, iskemi yapılan grupların her ikisinde de perfüzyonun iskemi öncesine göre yaklaşık üçte bir oranında azaldığını ve klempin kaldırılmasını takiben eski haline döndüğünü göstermektedir. Ratların iskemi öncesi ve sakrifikasyon öncesi yapılan LDF'lerin de gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bu sonuçlar bize hepatik artere uygulanan mikro klembin kaldırılması ile birlikte perfüzyonun tekrar düzeldiğini ve izlem süresi boyunca herhangi bir arteriyel tıkanıklık oluşmadığını düşündürmektedir.

Elektron mikroskopik incelemede kontrol grubu ve yalnızca Amifostin alan grupların değerlendirilmesinde hücrelerde ultrastrüktürel olarak her hangi bir değişiklik saptanmadı. Apoptoz elektron mikroskopik olarak gösterilememekle birlikte iskeminin ultrastrüktürel bulguları olan kromatin yoğunlaşması, çekirdek zarında derin invajasyonların meydana gelmesi, GER dilatasyonu, mitokondriyonlarda kristalların silinmesi ve ödem hali belirgin olarak yalnızca iskemi yapılan grupta görüldü. Amifostin+İskemi grubunda da benzer iskemik değişiklikler görülmekle birlikte meydana gelen değişiklikler iskemi grubuna göre sayı ve şiddet olarak azalmış olarak saptandı.

Bu sonuçlar kullandığımız ilacın safra yolu epitelinde ultrastrüktürel olarak iskemik değişiklikleri azalttığını yada bir miktar engellediğini düşündürmektedir.

Apoptozun değerlendirildiği TUNEL boyamalarında tüm gruplar arasında anlamlı fark bulundu. İskemi grubuna göre Amifostin+İskemi grubundaki apoptoz yüzdesindeki anlamlı düşüklük kullanılan ilacın apoptoz üzerinde olumlu etkisinin olduğunu düşündürmektedir.

PCNA boyamalarında yalnızca İskemi grubunda anlamlı bir yükseklik saptanması oluşan iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası hücrelerdeki rejenerasyon yanıtı olarak değerlendirilebilir. PCNA'nın diğer gruplarda daha düşük görülmesi ise iskemi-reperfüzyon hasarının olmaması (Kontrol ve Amifostin gruplarında) yada oluşan iskemi-reperfüzyon hasarının engellenmesi (İskemi grubunda) olarak yorumlanabilir.

Karaciğer dokusunda değerlendirilen MDA, iskemi-reperfüzyon sonrası dokularda oluşan serbest oksijen radikallerine bağlı lipid peroksidasyonu varlığını ve dolayısı ile hücre hasarını göstermektedir (59-64). MDA sonuçlarının değerlendirilmesinde gruplar arasında farklılık saptanmaması oluşturulan iskeminin yalnızca safra yolları ile sınırlı kaldığını, karaciğer dokusunu etkilemediğini düşündürmektedir.

GSH'nın reperfüzyon hasarı sırasında konjugasyona uğrayarak tüketilmesi, hücre GSH derişiminin düşmesi nedenleri arasında yer almaktadır. GSH miktarındaki bu azalma, hepatositlerdeki biyosentez ya da eksojen GSH alınımı ile karşılanır. Hücre içi GSH'nın düşmesi erken dönemde hücrede adaptif yanıt oluşturarak GSH biyosentezini arttırmaktadır (97,98,100). Yüksek GSH derişimi hücre fonksiyon ve canlılığının bir göstergesi, GSH derişiminin düşmesi ise hücre içi savunma sisteminin zayıflaması ve mitokondriyal hasarın belirteci olarak kabul edilir (95, 102).

Glutatyon'un serbest formu indirgenmiş yada oksitlenmiş tiyol halkası olarak bulunur. Oluşturduğumuz bu in vivo modelde kullandığımız Amifostin endotel hücrelerindeki membran alkalin fosforilazları tarafından defosforile edilerek serbest tiyol halkası haline dönüşür (14,15). Karaciğer dokusundaki GSH ölçümlerinin iskemi grubunda yüksek bulunması hücrenin oksidatif stres'e adaptif yanıtı, Amifostin+İskemi grubunda yüksek bulunması ise eksojen tiyol halkası kazanımı ile birlikte hücrenin iskemiye adaptif yanıtı olarak değerlendirilebilir.

Sonuç olarak Amifostin'in iskemi-reperfüzyon hasarında kolanjiyositlerde koruyucu rolü var gibi görülmekle birlikte yalnızca ultrastrüktürel olarak

değerlendirilmiştir. Bunun kliniğe yansımalarının değerlendirilmesi için daha uzun süreli oluşturulan iskemi modellerinde reperfüzyon sonrası gelişen safra yolu komplikasyonlarının, biyokimyasal değişimlerin değerlendirilmesi ve gösterilmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Greif F, Bronsther OL, Van Thiel DH. The incidence, timing, and management of biliary tract complications after orthotopic liver transplantation. *Ann Surg.* 1994; 219: 40-45
2. Verran DJ, Asfar SK, Ghent CN. Biliary reconstruction without T tubes or stents in liver transplantation: report of 502 consecutive cases. *Liver Transplant Surg.* 1997; 3: 365-373
3. Lemmer ER, Spearman CW, Krige JE. The management of biliary complications following orthotopic liver transplantation. *S Afr J Surg.* 1977; 35: 77-81
4. Rabkin JM, Orloff SL, Reed MH. Biliary tract complications of side-to-side without T tube versus end-to-end with or without T tube choledochocholedochostomy in liver transplant recipients. *Transplantation.* 1998; 65: 193-199
5. Egawa H, Uemoto S, Inomata Y. Biliary complications in pediatric living related liver transplantation. *Surgery.* 1998; 124: 901-910
6. Sawyer RG, Punch JD. Incidence and management of biliary complications after 291 liver transplants following the introduction of transcystic stenting. *Transplantation.* 1998; 66: 1201-1207
7. Lopez-Santamaria M, Martinez L, Hierro L. Late biliary complications in pediatric liver transplantation. *J Pediatr Surg.* 1999; 34: 316-320
8. Piecuch J, Witkowski K. Biliary tract complications following 52 consecutive orthotopic liver transplants. *Ann Transplant.* 2001; 6: 36-38

9. Nemec P, Ondrasek J, Studenik P. Biliary complications in liver transplantation. *Ann Transplant.* 2001; 6: 24-28
10. Fleck A, Zanutelli ML. Biliary tract complications after orthotopic liver transplantation in adult patients. *Transplant Proc.* 2002; 34: 519-520
11. Heffron TG, Pillen T, Welch D. Biliary complications after pediatric liver transplantation revisited. *Transplant Proc.* 2003; 35: 1461-1462
12. Langnas AN, Marujo W, Stratta RJ. Vascular complications after orthotopic liver transplantation. *Am J Surg.* 1991; 161: 76-82
13. Brancatelli G, Katyal S, Federle MP. Three-dimensional multislice helical computed tomography with the volume rendering technique in the detection of vascular complications after liver transplantation. *Transplantation.* 2002; 73: 237-242
14. Marujo WC, Langnas AN, Wood RP. Vascular complications following orthotopic liver transplantation: outcome and role of urgent revascularization. *Transplant Proc.* 1991; 23: 1484-1486
15. Stange BJ, Glanemann M, Nuessler NC. Imaging findings of post-OLT complications thrombosis after adult liver transplantation. *Liver Transplant.* 2003; 9: 612-620
16. Marzi I, Knee J, Buhren V, Menger M, Trentz O. Reduction by superoxide dismutase of leukocyte-endothelial adherence after liver transplantation. *Surgery* 1992; 111: 9.
17. Cruz R J, Ribeiro E A , Poli de Figueiredo L F. Hepatic Arteriyel Buffer Response Fails to Restore Hepatic Oxygenation After Temporary Liver Dearteriyelization in Canines. *Transplantation Proceedings.* 2005; 37: 4560-4562

18. Tietz PS, LaRusso NF. Cholangiocyte biology. *Curr Opin Gastroenterol.* 2005; 21: 337-343
19. Kato T, Sato T, Kurokawa T. Efficacy of continuous infusion of prostaglandin E1 through the superior mesenteric artery against ischemic liver cell necrosis after hepatic artery occlusion. *Transplantation* 2003;76: 1340
20. Demetris AJ. Participation of cytokines and growth factors in biliary cell proliferation and mitotic-inhibition during ductular reaction. In: Alpini G, Alvaro D, LeSage G, Marziani M, LaRusso NF. *Pathophysiology of the Bile Duct System.* Georgetown, Texas, USA: Landes Biosciences. 2004; 167-182
21. Strazzabosco M, Fabris L, Spirli C. Pathophysiology of cholangiopathies. *J Clin Gastroenterol.* 39; 2005: 90-102
22. Ohtani O, Kikuta A, Ohtsuka A, Taguchi T, Murakami T. Microvasculature as studied by the microvascular corrosion casting/scanning electron microscope method. I. Endocrine and digestive system. *Arch Histol Jpn.* 1983; 46: 1-42
23. Yamamoto K, Phillips MJ, Hitherto A. Unrecognized bile ductular plexus in normal rat liver. *Hepatology.* 1984; 4: 381-385
24. Gaudio E, Pannarale L, Ripani M, Onori P, Riggio O. The hepatic microcirculation in experimental cirrhosis. A scanning electron microscopy study of microcorrosion casts. *Scanning Microsc.* 1991; 5: 495-503
25. Gaudio E, Pannarale L, Onori P, Riggio O. A scanning electron microscopic study of liver microcirculation disarrangement in experimental rat cirrhosis. *Hepatology.* 1993; 17; 477-485
26. Gaudio E, Onori P, Pannarale L, Alvaro D. Hepatic Microcirculation and peribiliary plexus in experimental biliary cirrhosis: a Morphological study. *Gastroenterology.* 1996; 111: 1118-1124

27. Malpighi M. De hepate. Bologna. 1666
28. Rappaport AM, Borowy ZJ, Loughheed WM, Lotto WN. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit role in hepatic physiology and pathology. *Anat Rec.* 1954; 119: 11-33
29. Ohtani O, Murakami T. Peribiliary portal system in the rat liver as studied by the injection replica scanning electron microscopic method. *Scanning Microsc.* 1978: 241-244
30. Gaudio E, Pannarale L, Carpino F, Marinozzi G. Microcorrosion casting in normal and pathological biliary tree morphology. *Scanning Microsc.* 1988; 2: 471-475
31. Elias H, Petty D. Terminal distribution of the hepatic artery. *Anat Rec.* 1953; 116: 9-17
32. Hase T, Brim J. Observation on the microcirculatory architecture of the rat liver. *Anat Rec.* 1966; 156: 157-173
33. Del rio Lozano I, Andrews WH. A study by means of vascular casts of small vessels related to the mammalian portal vein. *J Anat.* 1966; 100: 665-673
34. Michels NA. Newer anatomy of the liver and its variant blood supply and collateral circulation. *Am J Surg.* 1966; 112: 337-347
35. Mitra SK. The terminal distribution of the hepatic artery with special reference to arterio-portal anastomosis. *J Anat.* 1966; 100: 651-663
36. Matsumoto T, Komori R, Magara T, Ui T, Kawakami M, Tokuda T, Takasaki S. A study on the normal structure of the human liver, with special reference to angioarchitecture. *Jikeikai Med. J* 1979; 26: 1-40

37. Kardon RH, Kessel RG. Three-dimensional organization of the hepatic microcirculation in the rodent as observed by scanning electron microscopy of corrosion casts. *Gastroenterology*. 1980; 79: 72-81
38. Testa G, Malago M, Broelseh CE. Complications of biliary tract in liver transplantation. *World J Surg*. 2001; 25: 1296
39. Yamamoto K, Sherman I, Phillips MJ, Fisher MM. Three dimensional observations of the hepatic arterial terminations in rat, hamster and human liver by scanning electron microscopy of microvascular casts. *Hepatology*. 1985; 5: 452-456
40. Gaudio E, Onori P, Bassi A, Feliciani E, Pannarale L. Liver microcirculation and peribiliary plexus as seen by SEM in normal liver and in bile duct ligated rats. In: Motta PM: *Advances in Microscopy of Cells, Tissues and Organs*. Delfino Ed., Roma, Italy, 1997: 449-455
41. Ohtani O. The microvascularization of the liver, the bile duct and the gallbladder. In: LJA DiDio, PM Motta, DJ Allen: *Biopathology of the liver*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1988: 83-88
42. Murakami T, Itoshima T, Shimada Y. Peribiliary portal system in the monkey liver as evidenced by the injection replica scanning electron microscope method. *Arch Histol Jpn*. 1974; 37: 245-260
43. Ekataksin W, Wake K. New concepts in biliary and vascular anatomy of the liver. *Prog Liv Dis*. 1997; 15: 1-30
44. McCuskey RS. A dynamic and static study of hepatic arterioles and hepatic sphincters. *Am J Anat*. 1966; 119: 455-477

45. Nakata K, Kanbe A. The terminal distribution of the hepatic artery and its relationship to the development of focal liver necrosis following interruption of the portal blood supply. *Acta Pathol Jpn.* 1966; 16: 313-321
46. Gaudio E, Onori P, Pannarale L, Marinozzi G. Microcirculation of the extrahepatic biliary tree: a scanning electron microscopy study of corrosion casts. *J Anat.* 1993; 182: 37-44
47. Polimeno L, Azzarone A, Zeng QH, Panella C, Subbotin V, Carr B, Bouzahzah B, Francavilla A, Starzl TE. Cell proliferation and oncogene expression after bile duct ligation in the rat: evidence of a specific growth effect on bile duct cells. *Hepatology.* 1995; 21: 1070-1078
48. Pannarale L, Borghese F, Conte D, Gaudio E. Terminal Branches of the hepatic artery (where does the hepatic artery flow into?). A scanning electron microscopic study of vascular corrosion casts of rat liver. *It J Anat Embryol.* 2004; 109: 157
49. Hodde KC, Steeber DA, Albrecht RM. Advances in corrosion casting methods. *Scanning Microsc.* 1990; 4: 693-704
50. Ekataksin W. The isolated artery: an intrahepatic arterial pathway that can bypass the lobular parenchyma in mammalian livers. *Hepatology.* 2000; 31: 269-279
51. Lametschwandtner A, Lametschwandtner U, Weiger T. Scanning electron microscopy of vascular corrosion casts technique and applications: updated review. *Scanning Microsc.* 1990; 4: 889-941
52. Miodonski AJ, Kuss J, Tyrankiewicz R. SEM blood vessels cast analysis. In: Di Dio L.J.A., Motta P.M., Allen D.J. *Three-dimensional microanatomy of cells and tissue surfaces.* Amsterdam, The Netherland Elsevier, 1981; 71-87

53. Konerding MA. Scanning electron microscopy of corrosion casting in medicine. *Scanning Microsc.* 1991; 5: 851-865
54. Carpino F, Gaudio E, Marinozzi G, Melis M, Motta PM. A scanning and transmission electron microscopic study of experimental extrahepatic cholestasis in the rat. *J Submicrosc Cytol.* 1981; 13: 581-598
55. Gaudio E, Onori P, Franchitto A, Pannarale L, Alpini G, Alvaro D. Hepatic microcirculation and Cholangiocyte physiopathology. *Ital J Anat Embryol.* 2005; 110: 71-75
56. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation.* 1992; 53: 957-78
57. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology.* 2000; 32: 169-73
58. Paloma C, Enrique C, Javier D.C. Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer. *Cancer Causes Control.* 2004; 15: 707-719
59. Backmann K.B. and Ames B.N. The free radical theory of aging matures, *Physiol Rev.* 78: 547-581
60. Kuhn H, Borchert A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: The interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33: 154-172
61. Aliakbarpour H.R, Kalavi K. Relationship between malondialdehyde level and glutathione peroxidase activity in diabetics rats. *Clin Chim Acta.* 2004; 340: 79-83

62. Cirak B, Inci S, Paloglu S. Lipid peroksidation in cerebral tumours. *Clin Chim Acta*. 2003; 327: 103-107
63. Halliwell B, Gutteridge M.C. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford Science Publications, Third Edition. 2002: 246-350
64. Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *Am J Med*. 2000; 108: 567-74
65. Chalmers- Redman R, Franser A.D, Ju W. Mechanisms of nerve cell death: Apoptosis or necrosis after cerebral ischemia, Neuroprotective agents and cerebral ischemia. *Academia Press Lmt*. 1997; 2-25
66. Clarke, P.G. Developmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol*.1990; 181: 195-213
67. Majno G. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol*. 1995; 146: 3-15
68. Gautam P.Y, Yoshihito T, George T, Kaye R. Blockade of the L-Arginine/NO Synthase Pathway Worsens Hepatic Apoptosis and Liver Transplant Preservation Injury. 2002; 36: 573-581
69. Polyak K. A model for p53- induced apoptozis. *Nature*. 1997; 389: 300-305
70. Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *Am J Med*. 2000; 108: 567-574
71. Strasser A. DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53- independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell*. 1994; 79: 189-192
72. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and the treatment of disease. *Science*. 1995; 267: 1456-62

73. Ankarcrona M, Dybukt M, Bonfoco E. Glutamate- induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptozis depending on mitochondrial function. *Neuron*. 1995; 15. 961-973
74. Sastry P S, Subba KR. Apoptosis and the Nervous System. *J.Neurochem*. 2000; 74: 1-20
75. Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology*. 1995; 21: 1725-1741
76. Hwang WYK, Koh LP, Ng HJ, Tan PHC, Chuah CTH, Fook SC, Chow H, Tan KW. A randomized trial of amifostine as a cytoprotectant for patients receiving myeloablative therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Hepatology*. 1986; 5: 388-395
77. Nagano T, Yamamoto K, Matsumoto S, Okamoto R, Tagashira M, Ibuki N, Matsumura S, Yabushita K, Okano N, Tsuji T. Cytokine profile in the liver of primary biliary cirrhosis. *J Clin Immunol*. 1999;19: 422-427
78. Micha L, James A, William D, Susan J, Chunzhi D, Susan M, Heather S, Leslie M. Regional Pharmacokinetics Of Amifostine in Anesthetized Dogs: Role Of The Liver, Gastrointestinal Tract, Lungs, And Kidneys. *Anti- cancer Drugs*. 2002; 13: 181-209.
79. Preisler HD, Li B, Yang R. Supression of telomerase activity and cytokine messenger RNA levels, in acute myelogenous leukemia cell in vivo in patients by amifostine and interleukin 4. *J Clin Invest*. 2001; 101:746-754
80. Zvi Symon, M.D., Micha Levi, M. Sc., William D. Ensminger, M. D., Selective Radioprotection Of Hepatocytes By Systemic And Portal Vein Infusions Of Amifostine In A Liver Tumor Model. *Virchows Arch*. 1997; 431: 119-124

81. Ansari B. In situ end- labelling detects DNA strand breaks in apoptozis and other physiological states. *J Pathol.* 1993; 170: 1-8
82. Davoli M, Fourtounis J, Tam S, Xanthoudakis S, Nicholson D, Robertson GS. Immunohistochemical assesment of caspase-3 activation and DNA Fragmentation Following Transient Focal Ischemia In Rat. *Neuroscience.* 2002; 115: 125-136
83. Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis caspases or mitochondria? *Trends cell biol.* 1998; 8: 267-271
84. Tsuyama H, Shimizu K, Yoshimoto K, Nezuka H, Ito H, Yamamoto S, Hasebe K. Protective Effect of Ischemic Preconditioning on Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Mice: *Transplantation Proceedings.* 2000; 32: 2310-2313
85. Natori S, Selzner M, Valantino KL, Fritz LC, Srinivasan A, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation.* 1999; 68: 89-96
86. Surinder SY, David S, David KP, Piere AC. Ischemic Preconditioning Protects the Mouse Liver by Inhibition of Apoptosis Through a Caspase-Dependent Pathway. *Hepatology.* 1999; 30: 1223-1231
87. Gavrielli Y. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmantation. *J. Cell. Biol.* 1992; 119: 493-501
88. Gold R. Differentiation between cellular apoptosis and necrozis by combined use of insitu tailing and nick translation techniques. *Lab. Invest.* 1994; 71: 219-225
89. Loo DT, Rillema JR. Measurement Of Cell Death. *Methods Cell Bhiol.* 1998; 31: 1-9
90. Elman GL. Tissue sulphydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959; 82: 70-77

91. Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;204: 263-73
92. Bayramiçli M. Deneysel Mikrocerrahi Temel Araştırma, Doku ve Organ Nakli Modelleri; 2005: 227-228
93. Ault J G, Lawrance D A. Glutathione distubation in normal and oxidatively stressed cells. *Exp Cell.* 2003; 285: 9-14
94. Dickinson D A, Forman H J. Cellular glutathione and thiol metabolism. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64: 1019-1026
95. Ballotori N, Hammond C L, Krance S M. Molecular mechanism of reduced glutathione transport: Role of the MRP/ CFTR / ABCC and OATP / SCL21A families of membrane proteins, *Toxicol App Pharmacol.*, 2005, 204: 238-255
96. Iles K E, Liu R M. Mechanisms of glutamate cysteine ligase induction by 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med.* 2005; 38: 547-556
97. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003; 125: 917-36
98. Terada T, Nakanuma Y. Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile duct development. *Am J Pathol.* 1995; 146: 67-74
99. Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology.* 1995; 21: 1725-1741
100. Ronen R L, Esther S. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms. *Neuroprotective opportunities.* 2002; 39: 55-73
101. Bluege J A, Aust S D. Microsomal lipid peroksidation. *Methodts Enzymol.* 1978; 52: 302-310

102. Shaw L. A-phase Study Comparing Bioavailability of intra-venous and Subcutaneous Administration of Amifostine. Proc Am Soc Clin Oncol. 1997; 16: 250
103. Yagmurdur M C, Yuceturk H, Gur G, Bilezikci B, Demirbilek M, Karakayali H, Haberal M. The role of heparin on cytokine release after partial hepatic resection. ASA Congress Abstract Book. September 19-25 Philadelphia.
104. Gaudio E, Onori P, Franchitto A, Pannarale L, Alpini G, Alvaro D. Hepatic microcirculation and cholangiocyte physiopathology. Ital J Anat Embryol. 2005; 110: 71-75
105. El-Ghissassi F. Modulation of wild-type p53 protein activity by the aminothiol amifostine. Proc Am Soc Clin Oncol. 1996; 23: 2-17
106. Grdina DJ. Thiol and disulfide metabolites of the radiation protector and potential chemopreventive agent WR-2721 are linked to both its anticytotoxic and mutagenic mechanisms of action. J Carcinogenesis. 1995; 16: 767-774
107. Shaw LM. Metabolic pathway of WR-2721 in the balb/c mouse. Drug Metab Dispos. 1994; 22: 895-902
108. Tretter L, Ronai E, Szabados Gy, Hermann R, Ando A. The effect of the radioprotector WR-2721 and WR-1065 on mitochondrial lipid peroxidation. Int J Radiat Biol. 1990; 57: 467-478
109. Bhanumathi P, Uma Devi P. Modulation of glutathione depletion and lipid peroxidation by WR-77913 and 2- mercaptopropionylglycine in cyclophosphamide chemotherapy. Indian Journal of Experimental Biology. 1994; 32: 562-564
110. Shaw LM. Human pharmacokinetics of WR-2721. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1986; 12: 1501-1504

111. Gao W, Washington MK, Bentley RC, Clavien PA. Antiangiogenic agents protect liver sinusoidal cells from cold preservation injury in rat liver transplantation. *Gastroenterology*. 1997; 113: 1692
112. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003; 125: 917-936
113. Van der Vijgh WJF, Peters GJ. Protection of normal tissues from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by amifostine (ethyol): preclinical aspects. *Se&n Oncol*. 1994; 21: 2-7
114. Beuge JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978; 52: 302-310
115. Elman GL. Tissue sulphydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82: 70-77
116. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-275
117. Gianfranco A, Yoshiyuki U. Increased susceptibility of cholangiocytes to tumor necrosis factor- α cytotoxicity after bile duct ligation. *AJP-Cell Physiol*. 2003; 285: 183-193
118. Kenichi H, Satoru O. Enhanced Apoptosis Relates to Bile Duct Loss in Primary Biliary Cirrhosis. *Hepatology*. 1997; 26: 1399-1405
119. When-Hui X, Qui-Fa Y. Apoptosis and proliferation of intrahepatic bile duct after ischemia-reperfusion injury. *Hepatobiliary Pancreatic Dis Int*. 2004; 3: 428-432
120. Boraschi P, Donati F. Complications of orthotopic liver transplantation: imaging findings. *Abdom Imaging*. 2004; 2:189-202

121. Hall B.K, Newman S. Cartilage: Molecular Aspects. Boca Raton. CRC Press; 1991, 268.
122. Ances B.M, Greenberg J.H, Detre J.A.. Laser Doppler imaging of activation-flow coupling in the rat somatosensory cortex. NeuroImage 1999; 10:716–723.
123. Briers J.D. Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. Physiol. Meas. 2001; 22: 35-66.