



T.C.

**KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**UW (UNİVERSTY OF WINSCONSİN), HTK
(HİSTİDİN-TRİPTOFAN-KETOGLUTARAT) PREZERVASYON
SOLUSYONLARININ ANTIOKSİDAN VE HEPATOPROTEKTİF
ETKİLERİNE E VİTAMİNİNİN KATKISI**

**DR. ONUR PEKER
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. İLHAMİ TANER KALE**

KAHRAMANMARAŞ

2013

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresinde bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, zorda kaldığım zamanlarda yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. İlhami Taner KALE'ye, Prof. Dr. Fikret EZBERCİ'ye, Prof. Dr. Ertan BÜLBÜLOğLU'na ve Doç. Dr. Mehmet Fatih YÜZBAŐIOđLU'na teşekkür ederim.

Gerek asistanlık sürecinde gerekse araştırma çalışmam boyunca bana destek ve özverisini esirgemeyen, değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. İlhami Taner KALE'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Yine bu çalışmam sırasında emeklerini ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Harun ÇIRALIK'a, Yrd. Doç. Dr. Hamide SAYAR'a, Doç. Dr. Ergül Belge KURUTAŐ'a, Malatya İnönü Üniversitesinden Doç. Dr. Mehmet GÜL'e teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca iyi ve kötü günlerimizde birbirimize destek olup sırt verdiğimiz genel cerrahi ekibinin göz ardı edilemez bir parçası olan servis ve ameliyathane hemşire ve personeline de teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarım ve uzmanlık eğitimim süresi boyunca beraber çalıştığımız genel cerrahi asistan grubuma Dr. Serdar YORMAZ'a, Dr. Mustafa GÖKSU'ya, Dr. Nazmi ÖZER'e, Dr. Mehmet SERTKAYA'ya, Dr. Emrah CENGİZ'e teşekkür ederim.

Belki de hayatımın en uzun ve en yorucu dönemi olan asistanlık eğitimi sürecinde desteklerini esirgemeyen babam Selahattin PEKER'e, annem Ayten PEKER'e, kardeşlerim Barış ve Ersin'e, can dostum Nuri Tutar'a ve tüm bu zor zamanlar içerisinde beni hiç yalnız bırakmayan, hayatı benim için daha anlamlı kılan biricik eşim Nihal PEKER'e, çocuklarım Aras, Alp ve Nil'e sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER II

TABLolar DİZİNİ V

ŞEKİLLER DİZİNİ VI

KISALTMA LİSTESİ VII

ÖZET, ANAHTAR KELİMELEr VIII

ABSTRACT, KEYWORDS X

1.GİRİŞ 1

2.GENEL BİLGİLER 2

2.1. Karaciğer 2

2.1.1. Karaciğerin Anatomisi 2

2.1.2. Karaciğerin Başlıca Fonksiyonları 3

2.2. Karaciğer Transplantasyonu 4

2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarı 4

2.4. Karaciğerin İskemi Reperfüzyonu 5

2.5. Serbest Radikaller 6

2.5.1. Reaktif Oksijen Türevleri (ROS) 6

2.5.1.1. Süperoksit Radikalleri (O_2^-) 7

2.5.1.2. Hidroksil Radikalleri (OH \cdot) 7

2.5.1.3. Hidrojen Peroksit (H 2 O 2) 8

2.5.1.4. Singlet O 2 (1O_2) 8

2.5.2. Serbest Radikal Üretim Kaynakları 9

2.5.2.1. Endojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları 9

2.5.2.2. Ekzojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları 9

2.6. Serbest Radikallerin Vücuttaki Etkileri 9

2.6.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri 9

2.6.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri 10

2.6.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri 10

2.6.4. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri 10

2.7. Antioksidan Maddeler	11
2.7.1. E Vitamini	11
2.7.1.1. E Vitamininin Genel Özellikleri	11
2.7.1.2 E Vitamini ve Antioksidan Özelliği	11
2.8. Organ Prezervasyonu	13
2.8.1. Organ Prezervasyon Prensipleri	13
2.8.2. Prezervasyon Hasarı Mekanizması	13
2.8.2.1. Preprezervasyon Hasarı	13
2.8.2.1.1. Donör Karaciğerde Mevcut Olan Hastalık	13
2.8.2.1.2. Beyin Ölümünün Etkileri	14
2.8.2.1.3. Organ Çıkarılması Sırasında Gelişen Hasar	14
2.8.2.2. Soğuk Prezervasyon Hasarı	14
2.8.2.2.1. Soğuk Etkileri	14
2.8.2.2.2. Sinüzoidal Endotelial Hücre Hasarı	15
2.8.2.3. Sıcak İskemi Hasarı	15
2.8.2.4. Reperfüzyon Hasarı	16
2.8.2.4.1. Trombositler	16
2.8.2.4.2. Lökositler	16
2.8.2.4.3. Endotelial Hücre Apoptozisi	17
2.8.2.4.4. Sitokinler	17
2.8.2.4.5. Proteazlar	17
2.8.3 Günümüzde En Sık Kullanılan Prezervasyon Teknikleri	17
2.8.3.1. Statik Hipotermik Koruma	17
2.8.3.2. Devamlı Perfüzyon ile Saklama	18
2.8.4. Prezervasyon Solüsyonları	18
2.8.4.1 HTK Solüsyonu	18
2.8.4.2. UW Solüsyonu	18
2.8.5. Prezervasyon Solüsyonlarının Kullanımı	19
2.8.6. Koruma Süreleri	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Araştırma Yeri ve Ortamı	21
3.2 Araştırma Tipi	21
3.3 Anestezi	21

3.4. Cerrahi Teknik	21
3.5. Deney Tasarımı	22
3.6. Araştırma Grupları	23
3.7. Araştırma Parametreleri	24
3.7.1. Biyokimyasal Parametreler	24
3.7.1.1 ALT ölçümü	24
3.7.1.2 Malondialdehit (MDA) ölçümü	24
3.7.1.3 Süperoksit dismutaz (SOD) ölçümü	25
3.7.1.4 Katalaz ölçümü	27
3.7.2. Patolojik Parametreler	29
3.7.2.1 Caspase-3 immünohistokimyasal boyama	29
3.7.2.2. Apoptozisin değerlendirilmesi	29
3.8. İstatiksel Analizler	30
4. BULGULAR	31
4.1. Biyokimyasal Parametreler	31
4.1.1. ALT Değerlendirmeleri	31
4.1.2. MDA, SOD ve Katalaz Düzeyleri	35
4.2. Patoloji Değerlendirme Sonuçları	47
4.2.1. Caspas-3 ile İmmunhistokimyasal Değerlendirme	47
5.TARTIŞMA	52
6. YORUM	56
KAYNAKLAR	57

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: HTK ve UW solüsyonlarının içerik olarak karşılaştırılması	19
Tablo 2: Organ koruma süreleri	20
Tablo 3: ALT'nin deney gruplarındaki değerleri	31
Tablo 4: ALT ortalamalarının karşılaştırılması	32
Tablo 5: MDA'nın deney gruplarındaki değerleri	35
Tablo 6: MDA ortalamalarının karşılaştırılması	36
Tablo 7: SOD'un deney gruplarındaki değerleri	39
Tablo 8: SOD ortalamalarının karşılaştırılması	40
Tablo 9: Katalaz'ın deney gruplarındaki değerleri	43
Tablo 10: Katalaz ortalamalarının karşılaştırılması	44
Tablo 11: Caspas-3 boyama ile apopitozis saptanan hücre sayıları	48
Tablo 12: Caspas-3 boyama ile apopitozis saptanan hücre sayılarının karşılaştırılması	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Coinaud'a göre karaciğerin segmentasyonu	2
---	---

Şekil 2: E vitaminin kimyasal yapısı	11
Şekil 3: Ratların Cerrahi İçin Hazırlanması	22
Şekil 4: Portal Venin Perfüzyon İçin Hazırlanması	23
Şekil 5: Gruplar arası ALT düzeylerinin karşılaştırılması	33
Şekil 6: ALT'nin, UW ve UW+E gruplarında grafiksel olarak karşılaştırılması	34
Şekil 7: ALT'nin, HTK ve HTK +E gruplarında grafiksel olarak karşılaştırılması	34
Şekil 8: Gruplar arası MDA düzeylerinin karşılaştırılması	37
Şekil 9: MDA'nın, UW ve UW+E gruplarında grafiksel olarak karşılaştırılması	38
Şekil 10: MDA'nın, HTK ve HTK+E gruplarında grafiksel olarak karşılaştırılması	38
Şekil 11: Gruplar arası SOD düzeylerinin karşılaştırılması	41
Şekil 12: SOD'un, UW ve UW+E gruplarında grafiksel olarak karşılaştırılması	42
Şekil 13: SOD'un, HTK ve HTK+E gruplarında grafiksel olarak karşılaştırılması	42
Şekil 14: Gruplar arası katalaz düzeylerinin karşılaştırılması	45
Şekil 15: Katalaz'ın, UW ve UW+E gruplarında grafiksel olarak karşılaştırılması	46
Şekil 16: Katalaz'ın, HTK ve HTK+E gruplarında grafiksel olarak karşılaştırılması	46
Şekil 17: Caspas-3 immünohistokimyasal boyama	47
Şekil 18: Tüm grupların ortalama apoptotik hücre sayısına göre karşılaştırılması	50
Şekil 19: UW ve UW+E gruplarında ortalama apoptotik hücre sayılarının karşılaştırılması	51
Şekil 20: HTK ve HTK+E gruplarında ortalama apoptotik hücre sayılarının karşılaştırılması	51

KISALTIMA LİSTESİ

UW: University of Winconsin

HTK: Histidin Triptofan Ketoglutarat

ALT: Alanin aminotransferaz

SOD: Süperoksid dismutaz

MDA: Malondialdehit

ATP: Adenin trifosfat

NO: Nitrik oksit

NAD: Nikotin amid dinükleotid

İR: İskemi reperfüzyon

SOR: Serbest oksijen radikalleri

ROS: Reaktif oksijen türevleri

DNA: Deoksiribonükleik asit

ADP: Adenozin difosfat

AMP: Adenozin monofosfat

SEC: Sinüzoidal endotelyal hücre

MMP: Matriks metalloproteinaz

vWF: Von willebrand faktör

TBA: Tiyobarbitürik asit

XO: Ksantin Oksidaz

OD: Optik dansite

ÖZET

UW (UNİVERSTY OF WİNSCONSİN), HTK (HİSTİDİN-TRİPTOFAN-KETOGLUTARAT) PREZERVASYON SOLUSYONLARININ ANTIOKSİDAN VE HEPATOPROTEKTİF ETKİLERİNE E VİTAMİNİNİN KATKISI

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 minimale indirmek için birçok koruma solüsyonu tanımlanmıştır. Histidin-Triptofan-Ketoglutarat (HTK) ve University of Wisconsin (UW) solüsyonları klinikte en sık kullanılan prezervasyon solüsyonlarıdır.

E vitamini antioksidan olarak özellikle hücre membranında oksijen radikallerinin yaptığı hasarı önlediği birçok klinik çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada sitoprotektif bir ajan olan E vitamininin HTK ve UW solüsyonları ile birlikte kullanımında karaciğer hücreleri üzerindeki koruyucu etkiyi arttırabilmek amaçlandı.

Çalışmada; her biri 8 rattan oluşan 6 grup kullanıldı. Prezervasyon için 1. gruptaki ratlara UW (UW), 2. gruba UW + E vitamini (UW+E), 3. gruba UW + zeytinyağı (UW+Z), 4. gruba HTK (HTK), 5. gruba HTK + E vitamini (HTK+E) ve 6. gruba HTK + zeytinyağı (HTK+Z) verildi. E vitamininin yağda çözülmüş hali hepatektomiden 60 dakika önce 10 mg dozunda intraperitoneal yolla uygulandı. Perfüzyon sonrası hepatektomi yapıldı ve doku içinde aynı sıvı bulunan torbalara konularak +4 °C de saklandı. 0, 6 ve 12. saatlerde perfüzyon sıvısından ve karaciğerden doku

örnekleri alındı. Bu örneklerden biyokimyasal olarak alanin aminotransferaz (ALT), süperoksid dismutaz (SOD), katalaz ve malondialdehit (MDA), immunhistokimyasal olarak ışık mikroskopu altında caspas-3 yolu kullanılarak apoptozis değerlendirildi.

Hepatositlerdeki hasarı değerlendirebilmek için ALT ölçümleri yapıldı. UW solüsyonuna E vitamini eklenen grupta 0, 6 ve 12. saatteki ALT değerlerinin daha düşük olduğu görüldü ($p=0.012$, $p=0.001$, $p=0.009$). Yine HTK ve HTK+E grubu karşılaştırıldığında E vitamini eklenen gruptaki değerler daha düşük olarak bulundu ($p=0.003$, $p=0.001$, $p=0.001$).

İskemi-reperfüzyon hasarının gösterebilmek için MDA, SOD ve Katalaz aktivitelerine bakıldı. MDA değerleri incelendiğinde UW solüsyonuna E vitamini eklenen gruplardaki azalma 0 ve 6. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p=0.012$, $p=0.009$) HTK solüsyonuna E vitamini eklenen gruplarda da 0 ve 6. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi ($p=0.016$, $p=0.005$). Antioksidan ve sitoprotektif özelliği olan SOD değerleri incelendiğinde; UW ve UW+E grupları arasında 0 ve 6. saatlerde E vitamini eklenen grupta SOD düzeylerinde artış tespit edildi ($p=0.003$, $p=0.021$). HTK ve HTK+E grupları karşılaştırıldığında HTK+E grubunda SOD'un 0 ve 12. saatlerde artmış olduğu görüldü ($p=0.027$, $p=0.001$). Diğer bir antioksidan olan katalaz ölçümlerinde UW ve HTK solüsyonuna E vitamini eklenen grupta eklenmeyene göre sadece 12. saatte artış olduğu saptandı. ($p=0,009$, $p=0,001$).

Hepatositlerdeki apoptozisi gösterebilmek için caspas-3 yolundan faydalanılarak boyama yapıldı. UW grubuna E vitamini eklenen gruptaki apoptotik hücre sayısı 0, 6 ve 12. saatlerde eklenmeyen gruba göre düşük olarak bulundu ($p=0.014$, $p=0.001$, $p=0.001$). HTK+E grubu ile HTK grubu karşılaştırıldığında yine E vitamini eklenen gruptaki apoptotik hücre sayısı anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p=0.040$, $p=0.001$, $p=0.001$).

Sonuç olarak, bu çalışmada E vitamini verilen gruplarda UW ve HTK ile perfüze edilen gruplara göre hepatosit hasarının azaldığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: E Vitamini, İskemi-reperfüzyon hasarı, Karaciğer, UW, HTK

ABSTRACT

The Contribution of Vitamine E For The Hepatoprotective and Antioxidant Effect of UW and HTK Preservation Solution

During all organ transplant programs, as well as liver transplantation whether live or cadaveric, preservation solutions were described such as Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate (HTK) and University of Wisconsin (UW) to protect the obtained organ, to save long-term and to minimize the ischemia-reperfusion injury of hepatocytes in the meantime.

In many studies, it was shown that vitamin E protects the damage from oxygen radicals to the cell membranes as an antioxidant. In this study, we aimed to analyse the cell protective effect of vitamin E, which is a cytoprotective agent, on HTK and UW solutions.

In this study, each of 6 groups of 10 rats were used. UW was administered to group 1 (UW), UW + vitamin E were administered to group 2 (UW+E), UW + olive oil were administered to group 3 (UW+Z), HTK was administered to group 4 (HTK), HTK + vitamin E were administered to group 5 (HTK+E) and HTK + olive oil were administered to group 6

(HTK+Z) for preservation. Fat-soluble form of vitamin E at a dose of 10 mg was administered intraperitoneally 60 minutes before hepatectomy. Hepatectomy was performed after perfusion and the tissue was saved at 4°C in the bags which were contained the same liquid. Zero, six and twelve hours on the perfusion fluid and liver tissue, alanine aminotransferase (ALT), superoxide dismutase (SOD), catalase, and malondialdehyde (MDA) was evaluated by biochemical, apoptosis was evaluated by immunohistochemically with caspase3 ways under light microscope.

ALT levels were measured to assess the damage on hepatocytes. It was found that the ALT values were lower at 0, 6 and 12 hours in the Vitamin E added UW solution group ($p = 0.012$, $p = 0.001$, $p = 0.009$, respectively). It was also lower in HTK+E group compared to the HTK group ($p = 0.003$, $p = 0.001$, $p = 0.001$).

MDA, SOD and catalase activities were measured for showing ischemia-reperfusion injury. When we analyzed MDA levels, it was significantly decreased at 0 and 6 hours in Vitamin E added UW solution group ($p=0.012$, $p=0.009$); there was also statistically significant reduction in vitamin E added HTK solution group at 0 and 6 hours ($p=0.016$, $p=0.005$). When we analyzed antioxidant and cytoprotective SOD, it was increased in UW+E group compared with UW group at 0 and 6 hours ($p=0.003$, $p=0.021$). It was found that SOD values were higher in HTK+E group than HTK group at 0 and 12 hours ($p= 0.027$, $p=0.001$). Another antioxidant catalase levels were higher in an vitamin E added UW and HTK solution group at only 12 hour ($p=0.009$, $p=0.001$).

Caspase-3 staining was used to show the benefit from the path of hepatocytes apoptosis. The number of apoptotic cells in the group of vitamin E added UW were lower at 0, 6 and 12 hours ($p=0.014$, $p=0.001$, $p=0.001$). Apoptotic cell count was also significantly lower in HTK+E group than HTK group at 0, 6 and 12 hours ($p=0.040$, $p=0.001$, $p=0.001$).

In conclusion, the present study showed that hepatocyte injury in vitamin E group was decreased compared to UW and HTK groups.

Keywords: Vitamine E, ischemia reperfusion injury, Liver, UW, HTK

1.GİRİŞ

Kronik karaciğer hastalığı siroz ile sonuçlanan karaciğer hastalıklarının tümünü içine alan genel bir terimdir. Amerika Birleşik Devletlerinde ölüm nedenleri arasında onuncu sırada yer alan siroz hepatoselüler nekroz, damar yatağını bozan fibrozis ve mikro veya makronodüler tipte hepatik parankim dejenerasyonu sonucu gelişir. Birçok faktörlere bağlı olarak hastalığın prognozu değişmektedir. Kronik karaciğer hastalıklarında genellikle palyatif tedavi uygulanmakta olup son döneme girildiğinde tek tedavi seçeneği olarak karaciğer nakli karşımıza çıkmaktadır.

Tüm diğer nakil programlarında olduğu gibi karaciğer naklinde de kadavradan organı çıkardıktan sonra alıcıya nakledilmesine kadar geçen sürede organı en az hasar ile muhafaza edebilmek çok önemlidir. Bu süre içerisinde oluşacak iskemi-reperfüzyon hasarını minimuma indirebilmek için çalışmalar devam etmektedir. Günümüzde bu amaçla organ prezervasyonunda en sık UW ve HTK solüsyonları kullanılmaktadır.

E vitamini başlarda doğanın en etkin lipid-çözünür antioksidanı olarak görülürken günümüzde E vitamininin, fizyolojik içeriğine bağlı olarak çok daha fazla yönü olduğunun farkına varılmıştır. E vitamininin, temel olarak bir antioksidan olarak etkisinin yanısıra, prooksidan, bir gen ifadesi düzenleyicisi, kanser ve aterosklerozun önlenmesinde de bir etken olarak görev aldığı vurgulanmaktadır.⁽¹⁾ Bir antioksidan açısından bakıldığında zaman, E vitamini hücre zarlarında zincir reaksiyon kırıcı birincil antioksidan olarak görünür.^(2, 3)

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda olduğu gibi, gelecekte yapılacak çalışmaların ortak hedefi de organları daha uzun süre minimal hasar ile korumak olacaktır. Literatürde, bir antioksidan olan E vitamininin prezervasyon hasarı üzerine sitoprotektif etkilerini gösteren çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada E vitamini ilavesinin, HTK ve UW solüsyonlarının antioksidan ve sitoprotektif özellikleri üzerine olan etkisinin değerlendirilmesi amaçlandı.

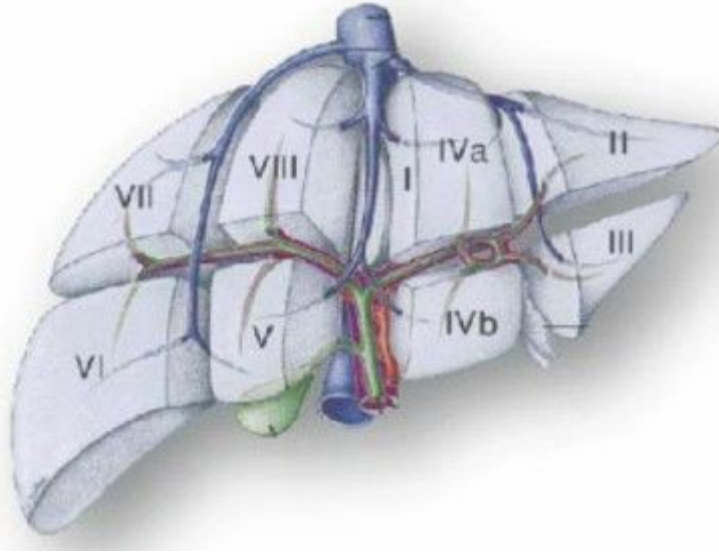
2.GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer

2.1.1. Karaciğerin Anatomisi

Karaciğer karın boşluğundaki en büyük organdır. Normal ağırlığı erişkin erkeklerde ortalama 1400-1600 gram olup erişkin bayanda ortalama 1200-1400 gram civarındadır.⁽⁴⁾ Sağ ile sol karaciğer arasındaki anatomik bölünme çizgisi, önde safra kesesinin sol yanından arkada vena kava inferiorun sol yanına kadar uzanır. Bu çizgiyi ilk Cantlie ileri sürmüştür ve bu çizgiye “Cantlie çizgisi” de denmektedir.^(5, 6) Modern segmenter anatomik ayırım Coinaud, Goldsmith ve Woodburne’ün çalışmaları ile ortaya koyulmuştur. Karaciğerin segmenter anatomisi bir bakıma karaciğerin fonksiyonel anatomisidir. (Şekil-1)

Karaciğerinin tama yakını Glisson kapsülü adı verilen periton tabakası ile kaplıdır. Bu sadece karaciğerin arka-alt kısmındaki küçük bir alanı örtmez. Glisson kapsülü fibroblastlar, vasküler yapılar ve kollajen liflerden oluşmaktadır.^(4, 5) Glisson kapsülü iki yaprak halinde diafragma yapışır. Bu yapraklar anterior ve posterior koroner ligamentler olarak isimlendirilirler. Bu ligamentler önde birleşerek falsiform ligamenti oluştururken, sağda ve solda trianguler ligamentleri oluştururlar. Falsiform ligament içinde, sol umbilikal venin kalıntısı olan ligamentum teres hepatis vardır. Falsiform ve teres hepatis ligamanları karaciğeri karın ön duvarına ve diafragmaya bağlar.



Şekil-1: Couinaud'a göre karaciğerin segmentasyonu

Karaciğerin segmental anatomisi rezeksiyon şeklini belirlemede, vasküler ve bilier devamlılığın sağlanmasında önemlidir. Buna göre sağ portal fissür, sağ karaciğeri anterior ve posterior olarak ikiye ayırır. İçinden sağ hepatik venin geçtiği sağ portal fissür ile karaciğer sağ lobu iki sektöre ayrılır. Her iki sektör kendi içinde de yeniden ikiye ayrılır; anteriorda segment V ve segment VIII, posteriorda segment VI ve segment VII bulunmaktadır.^(5, 7) Karaciğer sol lobu, içinde sol portal venin seyrettiği sol portal fissür ile 2 sektöre ayrılır. Karaciğer sol lobun anterior sektörü, sağ lobun ana portal fissürünün solunda kalan bir kısmı ve sol lobun anterior kısmından oluşur. Posterior sektör, segment II denilen ve sadece sol lobun posteriorundan oluşan tek segmentten oluşur. Anterior sektör, umbilikal fissür ile iki segmente ayrılır. Bunlar, segment IV (kuadrat lob) ve segment III'tür. Kaudat lob ise farklı bir segment olarak değerlendirilip segment 1 olarak isimlendirilmektedir.⁽⁵⁻⁸⁾

2.1.2. Karaciğerin Başlıca Fonksiyonları

Metabolizma ile ilgili fonksiyonları;

Karbonhidrat metabolizması ile ilgili fonksiyonları glikoneogenez ve karbonhidrat metabolizmasının ara ürünlerinden birçok önemli kimyasal maddenin oluşturulması, glukozun pentoz fosfat yolunda yıkımı, glikojen

depolama, galaktoz ve fruktozu glukozu çevirme, glukozun diğer monosakkaritlere ve yağa dönüştürülmesidir. Lipidler üzerinde, yağ asitlerinin sentezi, yağ asitlerinin beta oksidasyonu ve asetoasetik asit oluşumu, yağ asitlerinden trigliserid oluşumu, fosfolipid, lipoprotein, keton cisimleri ve kolesterol sentezi, safra asitlerinin ve tuzlarının oluşturulması, karbonhidrat ve proteinlerin yağlara dönüştürülmesinde etkilidir. Aminoasit metabolizması ile ilgili fonksiyonları, transaminasyon, endojen aminoasitlerin ve plazma proteinlerinin sentezi, vücut sıvılarından amonyağın temizlenerek üre oluşumu, aminoasitlerin deaminasyonu ve değişik aminoasitlerin sentez ve birbirine dönüşümü, ürik asit, kreatinin, porfirin ve safra asidi sentezidir. Bilirubin metabolizması ile ilgili fonksiyonları ise bilirubinin hücreye alınması, konjugasyonu ve atılması şeklindedir.^(9, 10)

Hematolojik ve immünolojik fonksiyonları;

Faktör III, IV ve VIII dışındaki diğer tüm pıhtılaşma faktörlerinin sentezi, hemoglobinin yıkımı, fagositoz ve antikor oluşumundan sorumludur. Protrombin (faktör II) ile faktör VII, IX ve X'un sentezi için K vitaminine gereksinim vardır.

Ekskresyon ve detoksifikasyon fonksiyonları;

Karaciğerde oksidasyon, metilasyon, asetilasyon ve konjugasyon gibi işlemlerle detoksifikasyon yapılmaktadır. Aminoasitler karaciğerde deamine edilirler, açığa çıkan amino grubu amonyağa dönüştürülür, amonyak da üreye çevrilir. Kolesterol değişmeden ya da safra asitlerine dönüştürülerek safraya atılır. Steroid hormonlar karaciğerde metabolize edilirler. Çoğu ilaçlar karaciğerde P450 enzim sistemi tarafından metabolize ve inaktive edilirler.⁽¹¹⁾

2.2. Karaciğer Transplantasyonu

Karaciğer transplantasyonu ilk kez köpekler üzerinde Welch tarafından denenmiştir. Sonrasında Thomas Starzl 1963 yılında insanda ilk karaciğer naklini gerçekleştirilmiştir.⁽¹²⁾ Fakat başarılı sonuçların alınabilmesi ancak immünsupresif ajanların kullanıma girmesiyle sağlanabilmiştir. Günümüzde kronik karaciğer hastalığı, akut fulminant

karaciğer yetmezliği, bilier atrezi gibi son dönem karaciğer hastalıklarının tedavisinde karaciğer transplantasyonu önerilen tek tedavi yöntemi olmakta ve etkin bir şekilde uygulanmaktadır.^(13, 14) Nakil merkezlerinde her geçen gün alıcı listelerindeki sayı artarken bulunabilen kadavra sayısı bu gereksinimi karşılamada yetersiz kalmaktadır.

2.3. İskemi Reperfüzyon (İR) Hasarı

İskemi, arteriyel ya da venöz kan akımının azalmasına bağlı olarak organ ve dokunun yeterli kanlanamaması, bunun sonucunda doku veya organların oksijenden yoksun kalması ve oluşan atık ürünlerin dolaşım sistemi tarafından uzaklaştırılamaması şeklinde tanımlanır.⁽¹⁵⁾ İskemi sonrasında hücrelerdeki enerji depoları boşalır ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümü meydana gelir. İskemik dokuda hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımına gereksinim vardır. Reperfüzyon medikal veya cerrahi müdahaleler ile iskemik dokudaki kan dolaşımının yeniden sağlanmasıdır. Fakat reperfüzyon sırasında dokuda iskemi ile oluşan hasardan çok daha önemli hasarlar meydana gelebilir.^(16, 17) Reperfüzyon hasarında en fazla etkilenen hücresel yapılar, membran lipidleri, proteinler, nükleik asit ve deoksiribonükleik asit molekülleridir.^(17, 18)

İskemi sırasında ortamda yeterli enerji olmadığı için hücre membranında bulunan Na^+/K^+ pompası çalışmaz. Na^+ ve Cl^- iyonları da hücre içine girerken K^+ iyonları hücre dışına çıkar. Ortamda yeterli oksijen bulunmamasından dolayı enerji sağlamak için anaerobik glikoliz devreye girer, bu da laktik asit üretimi ile sonuçlanır. Ortamda karbondioksit birikmesi sonucu karbonik asit (H_2CO_3) üretimi hızlanır ve asidoz artar. Adenin trifosfat (ATP) bağımlı çalışan diğer bir pompa ile hücre içindeki Ca^{+2} hücre dışına verilerek Ca^{+2} dengelenmesi sağlanmaktadır. İskemi durumunda ortamda yeterli miktarda ATP olmadığından intrasellüler Ca^{+2} artışı ile proteolitik enzimler ve fosfolipazlar aktive olurlar. Fosfolipazların aktivasyonu ile araşidonik asit oluşumu artar. Araşidonik asit direkt etkiyle mitokondriyal enzimleri inhibe eder ve serbest radikal oluşumunu arttırır.⁽¹⁹⁾

İskemi ve hipoksi süresi uzadıkça hücre membranlarının iskelet yapısı bozulmakta ve intrasellüler volüm artmaktadır. Bununla birlikte enerji depoları ve prostasiklin gibi bazı biyoaktif maddelerin yapımı azalmakta, nitrik oksit (NO), endotelin ve tromboksan A2 gibi maddelerin yapımı da artmaktadır.⁽²⁰⁾

İskemi reperfüzyon hasarı genellikle transplantasyon, miyokard enfarktüsü, şok ve iskemik serebrovasküler hastalıklarda görülmektedir. İskemi ve hipoksi sonrası dolaşım yeniden başladığında fazla miktardaki nikotin amid dinükleotid (NAD) oksijen ile reaksiyona girerek süperoksit oluşturur. Mitokondrideki NO reaksiyona girerek potent peroksinitrit serbest radikali meydana gelir. Peroksinitrit, mitokondride aerobik solunumda kullanılan bazı enzimleri inhibe ederek enerji üretimini engeller.⁽¹⁹⁾

2.4. Karaciğerin İskemi Reperfüzyonu (İR)

Karaciğerdeki iskemi, kan akımının başlaması ile birlikte hepatosellüler hasara neden olur. Daha önce çalışılan birçok İR modellerinde komplemanın da İR hasarında rol oynadığı gösterilmiştir. Kompleman aktivasyonu sonucu ortaya çıkan anaflatoksinler ve membran attack complex gibi ürünler karaciğerde nötrofil aktivasyonu, vazokonstriksiyon, mikrosirkülasyonda bozulma, vasküler permeabilitede artma ve sonuç olarak hücrede parçalanmaya neden olmaktadır.⁽²¹⁾

Serbest radikaller hücrede ekstrasellüler kollajen matriks, sarkolemma, sarkoplazmik retikulum veya kontraktıl proteinler gibi organellerde kalsiyuma bağlı mekanizmalarda bozukluklar oluşturur. Hücre içindeki serbest kalsiyumun artışı başta protein kinazları ve fosfolipazları olmak üzere diğer parçalayıcı enzimleri de aktive ederek oluşan hasarın daha da artmasına neden olurlar.⁽²²⁾ Hücre membranlarındaki zedelenme hepatositlerin homeostazını bozarak apoptoz veya nekroza neden olmaktadır⁽²³⁾. İR hasarı halen karaciğer transplantasyonlarında greft fonksiyon kaybının en önemli nedenlerinden biridir.⁽²⁴⁾

Karaciğerde meydana gelen İR hasarı sonucu kolestaz artmakta ve bunun sonucu olarak safra sekresyonunda azalma meydana gelmektedir.

Fakat safra akımındaki bu değişikliklerin 1-3 gün içinde geri dönebildiği gösterilmiştir.⁽²³⁾

Karaciğerde meydana gelen İR hasarının 0-2 saat içerisindeki evresine “erken faz” denilmektedir. Bu süreçte intraselüler Ca^{++} artışı ve serbest oksijen radikallerinin (SOR) oluşumu olayı tetikleyen iki önemli etkidir. Hücre içerisindeki Ca^{++} düzeyindeki artış hepatosit hasarını başlatırken aynı zamanda apoptoz ve nekroz yollarını da aktive etmektedir. Hepatositlerdeki hücre içi Ca^{++} miktarındaki artışın iskeminin ardından meydana gelen reperfüzyon sırasında olduğu gösterilmiştir. İskemi boyunca hücrede Ca^{++} artışı saptanmazken daha reperfüzyonun birinci dakikasında Ca^{++} miktarı iki katına çıkmaktadır. “Geç faz” olarak adlandırılan 6-48 saat arasındaki dönemde ise nötrofiller, makrofajlar, lenfositler ve trombositler karaciğere göç ederek inflamatuvar cevap artmaktadır. Geç fazda hepatositlerde oluşan hasar SOR ve ekstrasellüler sitokinler ile meydana gelmektedir.⁽²³⁾

2.5. Serbest Radikaller

Moleküller doğada genellikle çift elektronlu olarak bulunurlar ve kararlı bir yapı sergilerler. Fakat az sayıda molekül tek ve eksik elektron bulundurur. Bu eksik elektron bulunduran moleküller kararsız bir yapı sergiledikleri için herhangi bir molekül ile karşılaştıklarında o moleküle etkileşime girerek elektron alışverişine girerler. İşte bu şekilde moleküllerle elektron alışverişi yapabilen ve moleküllerin yapısında değişikliğe neden olan bu moleküllere serbest radikaller denmektedir.^(25, 26) Sonuç olarak serbest radikaller, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir. Stabil haldeki moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı bu stabiliteyi bozar ve molekülü reaktif hale getirir.^(17, 27) Yapılarındaki anstabil durum nedeniyle diğer moleküllerle kolayca elektron alışverişi yaparak onların yapılarını bozan serbest radikallerin yaşam süreleri de oldukça kısadır.^(25, 28)

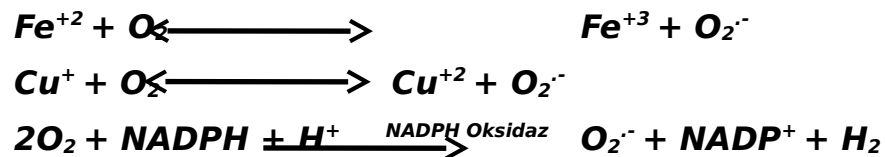
2.5.1. Reaktif Oksijen Türevleri (ROS)

Vücudumuzda bulunan en önemli serbest radikaller oksijen türevi olan serbest radikallerdir. Moleküler oksijenin (O₂) kendisi de bir radikaldır ve iki tane eşlenmemiş elektronu bulmaktadır. Bu özelliği nedeniyle oksijen diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilmektedir. Oksijen kısmi redüksiyona uğrayarak çok sayıda ve yüksek derecede reaktif moleküllerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Sıralı birçok reaksiyondan sonra oksijen hücre içinde en son suya indirgenir. (25, 29, 30)

2.5.1.1. Süperoksit Radikalleri (O₂^{·-})

Moleküler oksijenin dış yörüngesinde iki tane paylaşılmamış elektron bulunmaktadır. Bu dış yörüngelerin her birinde birer elektron için daha yer vardır. Oksijenin bu dış yörüngesine tek elektron alması ile süperoksit radikali (O₂^{·-}), iki elektron alması ile de peroksi radikali (O₂²⁻) oluşur. (31) Gerek çevresel etkenlerle, gerekse vücudumuzdaki çeşitli tepkimelerle en çok oluşan oksijen radikali süperoksit radikalidir. Serbest süperoksit radikali (O₂^{·-}) hemen hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir. (32) Süperoksit radikali (O₂^{·-}) normalde aerobik solunum esnasında mitokondride oluşmaktadır. Mitokondrilerde kullanılan oksijenin % 2'si süperoksit haline gelir. Oksijen mitokondride redükte olduğunda oluşan ürün sudur.

Canlılarda, süperoksit radikallerinin oluşumu başlıca iki şekilde olmaktadır. Bunların birincisi fiziksel ve kimyasal çevresel etkilerdir. Diğeri ise canlı sistemlerdeki enzimatik veya non-enzimatik yollarla olan yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarıdır. (33, 34)

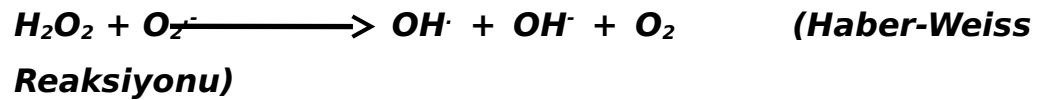


2.5.1.2. Hidroksil Radikalleri (OH[·])

Hemen hemen bütün biyomoleküllerle reaksiyona girebilen hidroksil radikali (OH[·]) serbest radikaller içinde hem en aktif olan hem de en

kuvvetli oksidan özelliği olan radikaldir. Oluştuğu her yerde de büyük hasara neden olur. Non-radikal biyolojik moleküllerle zincirleme reaksiyonları başlatır. Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur. (29, 35, 36)

Hidrojen peroksit serbest radikal olmamasına rağmen, reaktif oksijen türleri içinde yer alır. Süperoksit ile reaksiyon sonucu kolayca yıkılır ve en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturur. Katalizörlü veya katalizörsüz olarak meydana gelebilen bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Bu nedenle de serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar.



Bir hidroksil radikali, yüzlerce yağ asidini ve yan zincirini lipid hidroperokside çevirebilir. Bu oluşan hidroperoksitler birikerek membran bütünlüğünü bozar ve hücrenin kollabe olmasına neden olur. Ayrıca bu hidroperoksitlerden son ürün olarak toksik ve reaktif olan aldehitler de oluşabilir. Bunlardan en önemlilerden biri de malondialdehit (MDA) 'dır. (37, 38)

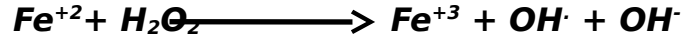
2.5.1.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit hücre membranlarından kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır. Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksitin iki hidrojen atomu ile birleşmesi ile ya da süperoksitlerin enzimatik veya nonenzimatik dismutasyon reaksiyonları sonucunda oluşabilir. Dismutasyon reaksiyonu sonucu radikal olmayan ürünler meydana gelir. (29, 39)



Hidrojen peroksit yapısında serbest elektron bulundurmadığından radikal değildir. Fakat metal iyonları ile etkileşime girerek potent bir süperoksit olan hidroksil radikali oluşturması önemlidir. Hücrelerde H₂O₂'in

ortadan kaldırılmasında katalaz ve peroksidaz gibi antioksidan enzimler rol oynar.⁽²⁹⁾



2.5.1.4. Singlet O₂ (¹O₂)

Radikal ve potent olmayan oksijen radikallerinden birisi de singlet oksijen (¹O₂) 'dir. Serbest radikal reaksiyonları sonucunda oluşabilen singlet oksijen (¹O₂) serbest radikal reaksiyonlarını da başlatabilir. Singlet oksijen kovalent tepkimelere girerek ya da içerdiği enerjiyi diğer moleküllere transfer ederek reaksiyon oluşturur. Bu reaksiyonlar genellikle yapısında çift karbon bağı bulunan moleküllerle olur. Bunlardan moleküllerden bazıları; fenoller, tokoferoller, DNA, bilirubin, karotenler, kolesterol, redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, triptofan, metionin, sistein ve histidindir. Singlet oksijenin doymamış yağ asitleri ile tepkimeye girmesi sonucu peroksi radikali (ROO.) meydana getirilir ve lipid peroksidasyonu başlatabilir.^(39. 40)

2.5.2. Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu, normal metabolik olayların seyri sırasında gelebildiği gibi, organizmada bazı yabancı maddelerin metabolize edilmesi sırasında ve organizmanın radyasyon gibi dış etkenlere maruz bırakılmasıyla da meydana gelebilir.

2.5.2.1. Endojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları

- Mitokondriyal elektron transport sistemi
- Endoplazmik retikulum
- Redoks döngüsü
- Oksidan enzimlerin reaksiyonları
- Oto-oksidasyon
- Fagositoz
- Araşidonik asit metabolizması

2.5.2.2. Ekzojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları

- 1.Çevresel etkenler
- 2.Radyasyon
- 3.Antineoplastik ilaçlar
- 4. Stres

2.6. Serbest Radikallerin Vücuttaki Etkileri

Serbest radikallerin zararlı etkilerinin azaltılmasını sağlayan vücutta birçok savunma sistemleri mevcuttur. Serbest radikal oluşum hızı ile yıkım hızı arasındaki denge devam ettiği sürece organizma bu maddelerden etkilenmemektedir. Serbest radikallerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa denge bozulmakta ve serbest radikallere bağlı hasarlar meydana gelmektedir.^(41, 42)

2.6.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

Serbest oksijen radikallerinin doymamış yağ asitleri ile oksidasyonuna lipid peroksidasyonu denilir. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan membran hasarı geri dönüşsüz bir hasardır. Lipid peroksidasyonu, serbest radikal kaynaklarının tümüyle stimüle olabilir ve metallerin varlığı durumunda artar. Bu metaller redoks katalizatörü gibi çalışırlar ve süperoksid ve hidrojen peroksidin daha güçlü oksidanlara dönüşümünü katalizlerler. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu MDA meydana gelir. Lipid peroksidasyonu bir zincir reaksiyonu şeklinde direkt membran yapısını etkiler, dolaylı olarak ise reaktif aldehidler üretmesi sayesinde hücresel hasar yapar. Böylece doku hasarı ve birçok hastalığa sebep olur.^(29, 43, 44)

2.6.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Serbest radikaller içerdikleri aminoasit oranlarına göre farklı şekillerde etkilerler. Serbest radikallerle aminoasit moleküllerinin sülfidril veya amino gruplarının etkileşmesi nedeniyle proteinlerde meydana gelen bu etkiler; aminoasit modifikasyonu, protein fragmentasyonu, protein agregasyonu veya çapraz bağlar oluşumu ile sonuçlanır.

2.6.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

Karbonhidratların oksidasyonu ile monosakkaritlerden peroksit, hidrojen peroksit ve okzoaldehitler oluşmaktadır. Bu oluşan maddeler diabetin patogenezinde rol oynamaktadır. Koroner arter hastalığı, hipertansiyon, psöriazis ve behçet hastalığı gibi çeşitli deri, kas ve göz hastalıklarında serbest oksijen radikallerinin arttığı ve aynı zamanda antioksidan savunma sistemlerinin de zayıfladığı gösterilmiştir. Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerindeki etkisine bir örnekte gözün vitröz sıvısında bol miktarda bulunan hyalüronik asitin oksidatif hasarı sonrasında katarakt oluşumudur.^(39, 45)

2.6.4. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri

Serbest oksijen radikalleri deoksiribonükleik asitlerde (DNA) mutasyonlara neden olarak etki göstermektedirler. Nükleik asitlerdeki bazı modifikasyonlarına bağlı kromozom değişiklikleri veya DNA'daki diğer değişiklikler hücrelerde sitotoksik etki yapmaktadır. Aktive nötrofiller tarafından oluşturulan hidrojen peroksit hücre membranlarını kolaylıkla geçip hücre çekirdeğine ulaşmakta ve DNA hasarına neden olmaktadır. Bu kolay etkileşimler nedeniyle serbest oksijen radikalleri açısından DNA, önemli ve kolay bir hedeftir.^(29, 35)

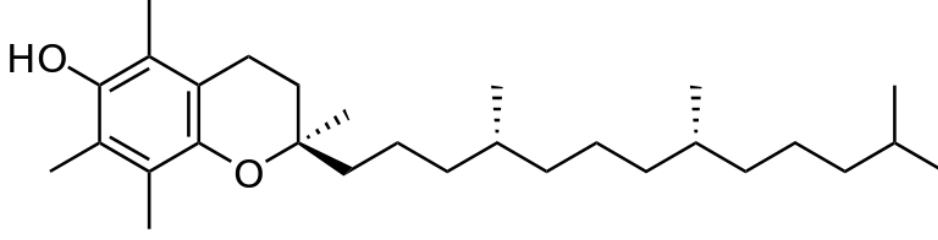
2.7. Antioksidan Maddeler

2.7.1. E Vitamini

2.7.1.1. E Vitamininin Genel Özellikleri

İlk olarak Evans ve Bishop tarafından bulunan bu maddeye Sure 1924 yılında "E vitamini" ismini vermiştir.⁽⁴⁶⁾ Yağda çözünebilen bir madde olan E vitamini vücuda alındıktan sonra öncelikle ince bağırsaktan emilerek kan yoluyla karaciğere gelir.^(47, 48) Karaciğerden aktif formu olan α -tokoferol olarak tekrar kana salınır. Mevcut olan 8 tokoferol formu arasında en aktif olanı α -tokoferoldür.⁽⁴⁹⁾ α -tokoferol plazmadaki E vitamininin %80-90'ını oluşturmaktadır ve dokudaki majör E vitamini formudur.

E vitamini tokoferol yapısındadır ve kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir (Şekil 2).



Şekil 2: E vitaminin kimyasal yapısı

α -tokoferol doğal olarak D izomeri halinde bulunur; sentetik olarak rasemik şekli yapılır ve ilaç olarak bu şekli kullanılır. Fiziksel özellikleri bakımından bir sıvı yağdır. E vitamini hububat tanelerinde, mısır yağı, soya yağı ve diğer bitkisel sıvı yağlarda ve bunlardan yapılan margarinlerde, et, hayvansal yağ, karaciğer, balıketi, tavuk eti ve yumurtada bulunur. Kızartma, kaynatma ve saklama sırasında önemli ölçüde parçalanır. Anne sütünde oldukça fazladır.⁽⁵⁰⁾

α -Tokoferol, dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. En yüksek E vitamini konsantrasyonları, mitokondriyon ve mikrozomlar gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur. Sitozol ve peroksizomda ise daha az bulunur.⁽⁵¹⁾

2.7.1.2 E Vitamini ve Antioksidan Özelliği

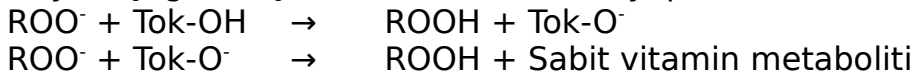
Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri vücut içerisinde toksisiteye neden olmakta, bazen kendileri bir hastalığa neden olurken kimi zaman da hastalıkların seyrini kötü yönde etkilemektedirler. Antioksidanlar ise bu zararlı toksik etkileri ortadan kaldırmaktadırlar. Antioksidanlar başlıca şu mekanizmalar ile çalışır.

- Oluşan serbest radikalleri toplayıp giderici etkileri ile bağlayarak kararlı hale getirmek
- Zincir kırıcı etkisi ile serbest radikal üreten kimyasal reaksiyonları durdurmak
- Baskılayıcı etkileri ile reaksiyon hızını azaltmak
- Onarıcı etkileri ile lipid, protein ve DNA gibi yapılarda oluşan biyolojik hasarı önlemek

- Organizmadaki SOD gibi antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini arttırmaktır.⁽⁵²⁾

E vitamini antioksidan etkinliğini, peroksitleri ve serbest oksijen radikallerini nötralize ederek ortaya çıkarır. Hücrelerde membran fosfolipitlerinin poli-unsatüre yağ asitleri (linoleik asit, araşidonik asit gibi), spontan olarak veya oksidan metabolitlerin etkisi (challenge) sonucu kolayca oksitlenebilirler ve peroksit türevlerine dönüşebilirler. Bu olaya lipid peroksidasyonu adı verilir. Serbest oksijen radikalleri oluşmasının eşlik ettiği bu olay zincirini membranda önleyen ve oluştuğunda nötralize eden en güçlü antioksidan faktör E vitamini dir. Vücudun diğer antioksidan sistemleri (C vitamini, glutatyon peroksidaz ve β-karoten gibi) E vitamini kadar etkili değildirler. E vitamini hücre ve subselüler yapıların membran lipitleri üzerindeki bu etkisi nedeniyle membranları oksidatif zedelenmeye karşı korur. Böylece eritrosit membranının sabitliğini artırır. Aynı etkiyi diğer hücrelerde de gösterir.⁽⁵⁰⁾

E vitamini (tok-OH), peroksitler üzerindeki nötralize edici etkisini, kendinin bir fenolik hidrojen atomunu peroksil radikale (ROO⁻) taşımak suretiyle aşağıdaki şekilde iki basamakta yapar;



Sonuçta, oluşan tokoferoksil metaboliti nispeten sabittir ve lipid peroksidasyonunu başlatmak için yeterince reaktif değildir. Bu oksidasyon ürünü, glukuronik asit ile konjugasyona uğrayarak safra yolu ile atılır. Tokoferolün antioksidan etkisi, yüksek oksijen konsantrasyonlarında etkilidir. En yüksek oksijen kısmi basıncına eritrosit membranları ve solunum sistemi membranlarında yoğunlaşarak gösterir.⁽⁵³⁾ İnsan eritrositlerinin hidrojen peroksit ile in vitro ortamda hemolizi, E vitamini tarafından önlenir. Eritrositlerin hidrojen perokside duyarlılığının ölçülmesi esasına dayanan testler, insanda E vitamini eksikliği olup olmadığını ortaya koymak için kullanılırlar.⁽⁵⁰⁾

Farmakolojik dozlarda α-tokoferol trombositlerin adezyon ve agregasyonunu azaltır, K vitaminine bağımlı pıhtılaşma faktörlerini

baskılar ve oksitlenmiş LDL'nin damar endotelinden endotelin'in saliverilmesinde yaptığı uyarıyı ve NO üretimindeki baskılayıcı etkisini azaltır.⁽⁵⁰⁾

2.8. Organ Prezervasyonu

2.8.1. Organ Prezervasyon Prensipleri

Organ prezervasyonu prensipleri genelde tüm organlar için uygulanabilir olsa da başarılı bir prezervasyon için her organın farklı gereksinimleri olduğunu bilmek gerekir. Organ kanlanması kesilmesi sonucu ortaya çıkacak olan iskeminin neden olduğu hücre hasarını azaltabilmek için öncelikle metabolizmanın yavaşlatılması gerekmektedir. 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.⁽⁵⁴⁾ Fakat bu yararlı etkisinin yanında, ATP pompa aktivitesinin bozulmasına da neden olmaktadır. Bozulan ATP pompa aktivitesinin sonucunda, sodyum hücre içine geçerken, potasyum hücre dışına çıkar. Hücre içindeki onkotik basınç artması sonucu hücre içine aşırı su girer ve hücre şişer. Sonuç olarak hücre ölümü meydana gelir.^(54, 55)

2.8.2. Prezervasyon Hasarı Mekanizması

2.8.2.1. 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.

2.8.2.1.1. Donör Karaciğerde Mevcut Olan Hastalık

En sık görülen nedenler obesiteye bağlı steatoz ve alkol ve/veya ilaç kullanımına bağlı hepatitin karaciğerde meydana getirdiği hasarlardır. Hepatosteatoz, hepatositlerde ve sinüzoidal hücrelerde soğuk prezervasyon hasarını artırırken ilaç veya çok miktarda alkol kullanımı rejeksiyon ve ölüm nedeni olabilir. Bu nedenlerle potansiyel toksik karaciğer hasarı her zaman 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.^(56, 57)

2.8.2.1.2. Beyin Ölümünün Etkileri

Travma sonucu gelişen beyin ölümlerinde genellikle hipotansiyon ve hipoksi görülmektedir. Bu şekilde hipotansif ve hipoksik kalan travma hastalarında karaciğerde sıcak iskemi meydana gelmektedir. Yine uzun süre yoğun bakımda kalmış beyin ölümü olan potansiyel donörlerde malnutrisyon da, hepatik hasara neden olabilen faktörler arasındadır. Bu hastalarda hepatik glukojenasyon nedeni ile karaciğerdeki glikojen depoları tükenir ve karaciğer dokusunun sıcak iskemiyeye olan toleransı azalır.⁽⁵⁸⁾

2.8.2.1.3. Organ Çıkarılması Sırasında Gelişen Hasar

Organ çıkarılması sürecinde gelişen hasarın en önemli nedeni hipotansiyondur. Nadir olarak teknik nedenlere bağlı da organ hasarı gelişebilmektedir. Donörlerin yaklaşık üçte birinde, organ çıkarılması sırasında alınan karaciğer biyopsilerinde, sinüzoidal endotelial hücrelere yapışmış trombositlerin neden olduğu pre-prezervasyon hasarı olduğu görülmüştür. Bu tip hasarın derecesiyle, implantasyon sonrası gelişen organ disfonksiyonu arasında ilişki olduğu gösterilmiştir.^(58, 59)

2.8.2.2. Soğuk Prezervasyon Hasarı

Günümüzde organların korunması amacıyla kullanılan yöntem soğuk prezervasyondur. Alınan donör karaciğerin metabolizmasını azaltabilmek için solüsyonun ısısı 0-4 °C arasında tutulur. Sıcaklıktaki her 10 °C azalma organın metabolik aktivitesini yarı yarıya azaltır. Soğüğün enzimlerdeki etkisi ise değişkendir. Na-K ATP-az ve Ca-ATP-az gibi bazı enzimlerin aktivitesi 20 °C'nin altında tamamen dururken, bazı proteazlar 1 °C'de bile aktivitelerini sürdürebilmektedirler.⁽⁶⁰⁾

2.8.2.2.1. Soğüğün Etkileri

Organı soğütmanın amacı metabolik ihtiyacı en aza indirmektir. Soğuk ile birlikte metabolizma yavaşlar fakat tamamen durmaz. Hücrenin

enerji ihtiyacı anaerobik glikolizle sağlanmaya çalışılsa da ATP kullanımını daha fazla olduğu için ortamdaki ATP tükenir. ADP ve AMP ortamda ATP sentezleyecek gerekli enerji olmadığı için adenezine yıkılır. Bu yıkılma esnasında ksantin ve hipoksantin açığa çıkar. Ksantin ve hipoksantin, ksantin oksidaz varlığında oksijenle birleşerek hücre membranına toksik olan oksijen serbest radikallerinin oluşmasına neden olurlar.⁽⁶¹⁾

Na-K ATP-az pompası Na molekülünü hücre içinden dışarıya çıkarırken, K molekülünü ise hücre içine alır. Amaç hücre içinde yüksek, ekstrasellüler sıvıda ise düşük K konsantrasyonu oluşturmaktır. Na için ise tam tersi bir durum söz konusudur. Pompa elektrokimyasal bir gradient oluşturur ve hücre içi, hücre dışına göre negatif hale geçer. Pompanın diğer etkisi de, hücre içine geçmeyen moleküllerin osmotik etkisini dengelemektir. 20 °C'nin altındaki sıcaklıklarda bu pompa fonksiyon gösteremez. Pompanın kaybıyla, hücre membranı boyunca Na/K dengesi bozulur ve gradient kaybolur. Hücre zarından geçmeyen intrasellüler moleküller istenmeyen bir osmotik etki oluşturarak hücrenin şişmesine ve sonrasında hücrenin ölmesine neden olurlar. Prezervasyon solüsyonlarının içeriği, bu istenmeyen etkileri engellemek üzere düzenlenmeye çalışılmıştır.⁽⁶¹⁾

2.8.2.2.2. Sinüzoidal Endotelyal Hücre Hasarı

Prezervasyon sonrası oluşan karaciğer hasarının, temelde sinüzoidal endotelyal hücre (SEC) hasarına bağlı olduğuna dair ikna edici kanıtlar elde edilmiştir.⁽⁶²⁾ Yapılan çalışmalarda, SEC hücrelerinde gelişen hasarın önemli nedenlerinden birinin proteazlar olduğu gösterilmiştir. Kalsiyum bağımlı intrasellüler bir enzim olan kalpain ve matriks metalloproteinazları (MMP-2 ve MMP-9) bu şekilde etki gösteren proteazlardır.^(63, 64) Soğuk, Ca-ATP az'ı inhibe ederek intrasellüler kalsiyum seviyesini ve buna bağlı kalpain aktivitesini artırır. Kalpain aktivitesinin artması aktin stres fiberlerinin parçalanmasına neden olur. Aktin stres fiberlerinin parçalanması ise SEC'den MMP salgılanması ile sonlanır. Sonuç olarak Von Willebrand faktör (vWF) ekspresyonu artar ve SEC yüzeylerine trombosit adezyonu olur.^(62, 65) Organın reperfüzyonu ile hiperakut vasküler rejeksiyon fenomenine benzer

bir tablo oluşur. MMP sekresyonunun, SEC aktivasyon mekanizmasında ve soğuk prezervasyon hasarında ana rol üstlendiği görülmüştür.⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾ UW ve HTK gibi prezervasyon solüsyonlarında laktobiyonat ve histidin gibi MMP inhibitörleri bulunmaktadır.

2.8.2.3. Sıcak İskemi Hasarı

Transplante edilecek karaciğerin soğuk prezervasyon solüsyonundan çıkarılarak ameliyat sahasına getirilmesi ile sıcak iskemi dönemi başlar. Bu sırada karaciğer gittikçe ısınır ve yeterince perfüze olamaz. Yaklaşık 40 dakika sonunda karaciğerin sıcaklığı 20 °C'ye kadar yükselir. Bununla beraber enzim aktivitesi ve metabolik hız artar. Karaciğerdeki mevcut glikojen depoları da hızlı bir şekilde tükenir. Sıcak iskemi daha çok hepatositlere zararlıdır. Sıcak iskeminin 120 dakikadan uzun sürmesi tek başına organ yetmezliğine neden olabilmektedir.⁽⁶⁹⁾

2.8.2.4. Reperfüzyon Hasarı

Karaciğerde iskemi sonrası gelişen reperfüzyon, karaciğer hasarına neden olmaktadır. Karaciğerde oluşan bu hasarın nedeni inaktif halde olan lökosit ve trombositlerin aktive olarak endotelyuma yapışması ve inflamatuvar mediatörlerin yayılmasıdır. Reperfüzyon sırasında olaylar soğuk prezervasyon ve soğuk depolamanın aksine saniyeler ve dakikalar içinde gelişir. Soğuk prezervasyonun uzadığı durumlarda, yaygın trombosit ve beyaz küre adezyonu ve intravasküler tromboz sonucu hiperakut rejeksiyona benzer bir tablo meydana gelir.⁽⁷⁰⁾

2.8.2.4.1. Trombositler

Sinüzoidal hücrelerde artmış von willebrand faktör (vWF) ekspresyonu sonucu endotelial duvarın aktive olarak trombosit adezyon ve aktivasyonuna neden olur. Trombositler vWF'e yapışarak endotel hücrelerine yapışır ve aktive hale geçerler.⁽⁷¹⁾ Trombositlerden üretilen nitrik oksit reoksijene olmuş karaciğerde peroksinitrit oluşmasına neden olur. Peroksinitrit ise endotel hücrelerinde apoptozise yol açar.⁽⁷²⁻⁷⁴⁾

2.8.2.4.2. Lökositler

Reperfüzyon ile birlikte lökositler intrasellüler adezyon molekül-1 (ICAM-1) aracılığı ile hızlı bir şekilde sinüzoidlere yapışır ve hasara neden olur. Reperfüzyon başladığında aktive olan kupffer hücrelerinden TNF- α ve interlökin-1 (IL-1) salınır. Buna bağlı olarak lökositlerde CD11-b ekspresyonu artar ve lökositlerin sinüzoidlerde toplanmasını sağlar. Yapılan çalışmalarda, lökositlerin ve trombositlerin sinerjistik olarak SEC apoptozisini indüklediği ve SEC hasarını artırdığı gösterilmiştir.⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾

2.8.2.4.3. Endotelial Hücre Apoptozisi

SEC 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.^(75, 78)

2.8.2.4.4. Sitokinler

Sitokinlerin aracılığı ile oluşan hasar diğer mediatörler ile kıyaslandığında daha önemlidir. Sitokinler, karaciğer hücreleri tarafından, en çok kupffer ve SEC'lerden üretilir. Sitokinlerden TNF- α , IL-1 ve IL-6 en önemlileridir. Colletti ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, iskemi döneminin uzamasının sitokinlerin aşırı salınımına neden olduğu ve TNF- α 'nın hepatosit ve SEC apoptozisini başlattığı görülmüştür. Kupffer hücrelerinden TNF- α salınımının engellenmesi ile soğuk ve sıcak iskemi modellerinde reperfüzyon hasarının azaldığı gösterilmiştir.⁽⁷⁹⁾

2.8.2.4.5. Proteazlar

Kalpein ve kaspaz gibi birçok sistin proteazlarının, prezervasyon ve perfüzyon hasarına mediatörlük yaptığı gösterilmiştir. Kalpeinler,

sitoskeletal ve membran proteinlerinin proteolizine katılan 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 hemde hepatositlerde doku hasarını azaltır ve sonunda greft fonksiyonu belirgin olarak korunur. Birçok soğuk ve sıcak iskemi modelinde, hepatik iskemi ve reperfüzyon sırasında kaspaz inhibisyonunun koruyucu etkisi gösterilmiştir. (80)

2.8.3 Günümüzde En Sık Kullanılan Prezervasyon Teknikleri

2.8.3.1. Statik Hipotermik Koruma

Organlar çıkartıldıktan sonra soğuk prezervasyon solusyonları ile perfüze edilir ve solüsyon ile birlikte steril torbalara paketlenildikten sonra buz kalıpları arasına yerleştirilerek 0 ile + 4 °C derece arasında saklanır.

2.8.3.2. Devamlı Perfüzyon ile Saklama

Makine perfüzyon sistemleri, greftte gerekli esansiyel substratları (glukoz, aminoasit, nükleotid, oksijen gibi) sürekli sağlayan bir yöntemdir. (81-83) St. Peter ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 24 saatlik soğuk prezervasyon sonrası sıcak oksijenize makine perfüzyonunun karaciğer fonksiyonlarını iyileştirdiğini göstermişlerdir. Aksine UW veya HTK solusyonları ile 24 saatin sonunda karaciğer canlılığını büyük ölçüde kaybeder. (84-86)

Günümüzde devamlı perfüzyon prezervasyonu sadece böbrek transplantasyonunda ve birkaç merkezde kullanılmaktadır. Makine perfüzyonunun greft kalitesini arttırdığı ve daha uzun prezervasyon sağladığı bilinmesine rağmen, bugün standart uygulanan yöntem asellüler perfüzyon sıvıları ile organın perfüzyonu, 0-4 °C derecede saklanması ve en kısa sürede transplantasyonun gerçekleştirilmesidir. Bu şartlarda elde edilen klinik sonuçlar kabul edilebilir sınırlar içindedir. (86)

2.8.4. Prezervasyon Solüsyonları

2.8.4.1 HTK Solüsyonu

HTK solüsyonu, ilk olarak kardiyoplejik bir ajan olarak klinik kullanıma girmiş, sonraları prezervasyon solüsyonu olarak yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. İçinde asidozu engelleyen histidin, membran hasarını önleyen triptofan ve enerji metabolizması için substrat olarak kullanılan keto-glutarat bulunur. Karaciğer prezervasyonunda, UW kadar etkin olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. (87-89)

2.8.4.2. UW Solüsyonu

UW solüsyonu izotonik bir solüsyondur. Yüksek oranda potasyum içerir ve tamponlayıcı ajanı fosfattır. Farklı olarak, glukozun yerine rafinoz kullanılmış ve sodyum laktobiyonat eklenmiştir. Onkotik basıncı ayarlayıp, hücresel şişmeyi engellemek için hidroksietil nişasta, ATP sentezi için adenzin, hücre membran stabilizatörü olarak deksametazon, serbest oksijen radikallerini yakalamak ve ksantin oksidaz inhibitörü olarak Allupurinol ve Glutasyon içerir. (90, 91) İçindeki laktobiyonat hücre şişmesini engelleyen önemli bir maddedir. Laktobiyonatin ve glutasyonun güçlü birer MMP inhibitörü olduğu da gösterilmiştir. (92, 93)

Tablo-1: HTK ve UW solüsyonlarının içerik olarak karşılaştırılması

İÇERİKLER	UW	HTK	ÖZELLİKLER
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	
Laktobiyonat (mmol/L)	100	-	Hücresel şişliği engeller, geçirgen olmayan anyon
Sülfat (mmol/L)	5	-	
Fosfat (mmol/L)	25	-	Tampon-pH düzenler
Rafinoz (mmol/L)	30	-	Hücresel şişliği engeller

Adenosin (mmol/L)	5	-	ATP prekürsörü, radikal temizleyici, Vazodilatatör
Glutasyon (mmol/L)	3	-	Antioksidan-radikal temizleyici
Allopurinol (mmol/L)	1	-	Ksantin oksidaz inhibitörü, radikal Temizleyici
Histidin (mmol/L)	-	198	Antioksidan
Triptofan (mmol/L)	-	2	Membranoprotektif etki
Starch(g/L)	50	-	İntertisyel ödemi azaltır+kolloid
Mannitol (mmol/L)	-	30	Antiödem+Antioksidan
Ketogluterat (mmol/L)	-	1	Membranoprotektif etki

2.8.5. Prezervasyon Solüsyonlarının Kullanımı

Karaciğer, primer olarak UW solüsyonu ile korunur, UW ile 24 saate kadar güvenli prezervasyon sağlanır. Son zamanlarda HTK'nında UW kadar etkin olduğu gösterilmiştir. Ancak, prezervasyonda sağlanan gelişmelere rağmen greft disfonksiyon oranı %5 ile %20 civarındadır.⁽⁹⁴⁾

2.8.6. 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 oluşturulan solüsyonlarla hücre hasarı ve belli bir süre sonra da hücre ölümü gerçekleşmesi önlenememektedir.⁽⁹⁵⁾ Hücre hasarı ve ölümünün maksimum süreleri her organ için farklılık göstermekte olup bazıları tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: Organ koruma süreleri

Organ	Süre
Kalp / Akciğer	6 saat
İnce Barsak	6 saat

Karaciğer	24 saat
Pankreas	48 saat
Böbrek	72 saat
Kornea	1 hafta

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Yeri ve Ortamı

Bu çalışma, Sütçü İmam Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında yapıldı. Çalışmada, ortalama ağırlıkları 300-350 gr olan 48 adet Wistar albino ırkı, erişkin erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar, optimum laboratuvar koşullarında, (20 ± 2 °C oda sıcaklığı, 50 ± 10 nemli ortam, 12 saatlik aydınlık / karanlık periyodu) polikarbon kafeslerde tutulup, standart kuru peletler halindeki sıçan yemi (Purina®) ile beslendi. Ayrıca 3. ve 6. gruplardaki ratlara saf zeytinyağı, 2. ve 5. gruplardaki ratlara ise saf zeytinyağı içerisinde çözeltisi hazırlanan E vitamini (D- α -tocopherol acetate, Evigen®, Aksu Farma, İstanbul, Türkiye) hepatektomi yapılmadan 60 dakika önce intraperitoneal yoldan verildi.

3.2 Araştırma Tipi

Deneyisel çalışma protokolü Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneyisel Araştırma Kurulu tarafından etik ve bilimsel yönden onaylandıktan sonra “National Institute of Health Guide For the Care and Use of Laboratory Animals” kurallarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Deneyde kullanılan ratlar Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Araştırma Merkezine bağlı Deney Hayvanları Üretim Merkezi’nden temin edilmiştir.

3.3 Anestezi

Bütün hayvanların anestezisi, 60 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar® Eczacıbaşı Warner-Lambert ilaç sanayi, Levent, İstanbul) ve 10 mg/kg xylazine hidrokloritin (Rompun® Bayer, Şişli, İstanbul) aseptik şartlarda intraperitoneal verilmesi ile sağlandı.

3.4. 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. Orta hat insizyonu tercih edildi. Laparotomi sonrası ince barsaklar karın dışına alındı, portal pedikül tanımlandı. (Şekil 3)

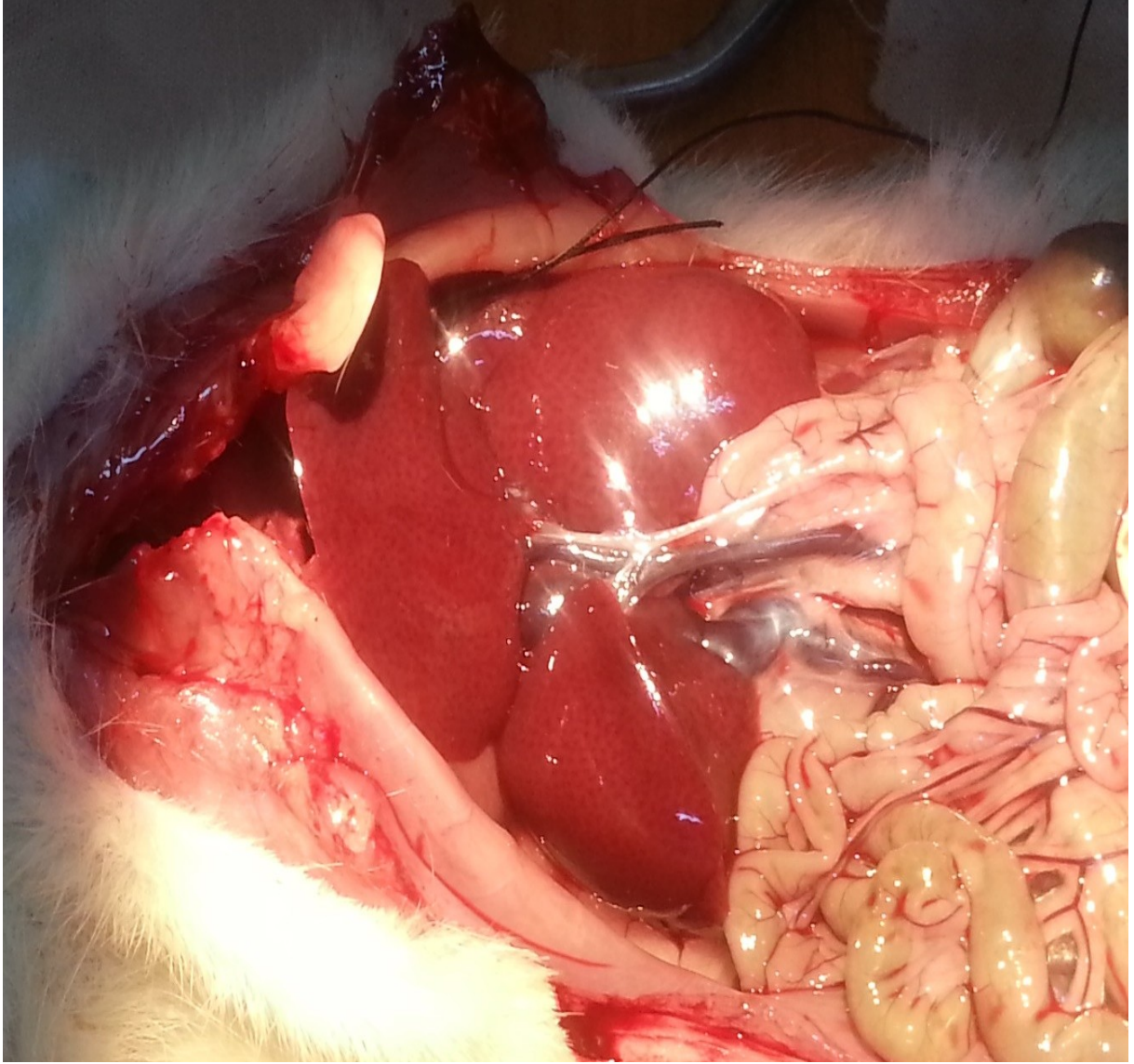


Şekil 3: Ratların Cerrahi İçin Hazırlanması

3.5. Deney Tasarımı

Abdominal aorta trunkus çölyakus'un üstünden ve süperior mezenterik arterin altından bağlandı. Vena cava inferior hepatic ven ile birleştiği yerin hemen altından bağlanarak, arteriyel ve venöz dolaşım kesildi. Hepatik ven kesildikten sonra portal ven kanülize edilerek +4 °C'deki UW ve HTK solüsyonları ile hepatic venden berrak sıvı gelene kadar karaciğer perfüze edildi ve ardından hepatektomi yapıldı. (Şekil 4)

Hepatektomi yapıldıktan sonra alınan karaciğer dokusu, içinde UW ve HTK bulunan torbalara konuldu. Torbalar +4 °C'deki içi buz dolu saklama kaplarına yerleştirildi.



Şekil 4: Portal Venin Perfüzyon İçin Hazırlanması

3.6. Araştırma Grupları

Deneysel çalışma, her biri randomize seçilmiş 8 rattan oluşan 4 grup üzerinden yapıldı. Her bir hayvan yer alacağı gruba göre işaretlendi.

- Grup 1: UW grubu
- Grup 2: UW + E vitamini grubu (UW+E)
- Grup 3: UW + Zeytinyağı grubu (UW+Z)
- Grup 4: HTK grubu
- Grup 5: HTK + E vitamini grubu (HTK+E)
- Grup 6: HTK + Zeytinyağı grubu (HTK+Z)

3.7. Araştırma Parametreleri

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

3.7.1. Biyokimyasal Parametreler

Karaciğer spesmeninin içinde saklandığı koruma solüsyonundan ve karaciğerden 0, 6 ve 12.saatlerde alınan örnekler laboratuvar koşullarında -22 °C'de saklandı. Serumdan ALT, dokudan standardize bir metoda uyarlanan UV testi ile Katalaz, SOD ve MDA değerleri çalışıldı.

3.7.1.1 ALT ölçümü

ALT değerleri; Kahramanmaraş Necip Fazıl Şehir Devlet Hastanesi biyokimya laboratuvarında, Roche Cobas C-501 marka biyokimya otoanalizatöründe, Roche marka ALT kiti ile spektrofotometrik (İFCC) yöntemle çalışıldı.

3.7.1.2 Malondialdehit (MDA) ölçümü

Yöntemin amacı; lipit peroksidasyonu son ürünlerinden bir tanesi olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği renk reaksiyonuna dayanmaktadır.⁽⁹⁶⁾

Homojenat Hazırlanması:

1. Örnek sayısı kadar tüp alınarak numaralandı.
2. Yaklaşık 0,4 gram ağırlığında karaciğer doku örnekleri alındı.
3. Alınan örnekler serum fizyolojik (SF) ile yıkandı.
4. Buz dolu bir kap içinde tüpe geçirildi.
5. Tüp içindeki örnekler daha sonra %1 KCl çözeltisi kullanılarak homojenize edildi.
6. Buz dolu bir kap içindeki tüpte bulunan örnek, homojenizatör cihazında 8000 devirde 10 vuru da homojenize edildi.
7. Daha sonra soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.
8. Üstte toplanan süpernatant kısmı ayrı bir vial e alınarak ölçümde kullanıldı.

Örnekler aynı gün içinde ölçüm yapılacaksa +4 °C'de, daha sonra ölçüm yapılacaksa -70 °C derin dondurucuda saklandı.

Çözeltiler:

% 1 Fosforik asit çözeltisi: 1 ml fosforik asit, distile su ile 100 ml ye tamamlandı.

% 0.6 Tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi: 6 g TBA 1000 ml suda çözündürüldü.

Spektrofotometrede Ölçüm:

1. Her ölçümde bir blank ve örnek tüpleri hazırlandı.
2. Blank tüpüne; 0.5 ml distile su, 3 ml fosforik asit çözeltisi, 1 ml TBA çözeltisi, örnek tüpüne; 0.5 ml hemolizat, 3 ml fosforik asit çözeltisi, 1 ml TBA çözeltisi ilave edildi.
3. Blank ve örnek tüpleri bir beherde su içinde 45 dakika kaynatıldı.
4. Tüpler soğuduktan sonra içlerine 4 ml butanol ilave edildi.
5. 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
6. Ölçüm için süpernatant alındı.
7. Spektrofotometre 532 nm'ye getirildikten sonra, distile su ile sıfırlanarak, blank ve örnek tüplerinin absorbanları okundu.

Sonucun Hesaplanması:

Konsantrasyonların belirlenebilmesi için; lipit peroksit standart (1.1.3.3. tetraetoksipropan) 1, 2, 4, 6, 8, 10 nmol/ml'de hazırlandı. Ölçülen MDA düzeyi nmol/mg protein olarak verilmiştir.

$$MDA \text{ Düzeyi (nmol/mg protein)} = \frac{MDA \text{ Değeri (nmol/ml)}}{Protein (mg/ml)}$$

3.7.1.3 Süperoksit dismutaz (SOD) ölçümü

Süperoksit dismutaz, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin H₂O₂ ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz (XO) kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride (p-iodonitrotetrazolium violet: INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazan boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği

optik dansite (OD) okunması esasına dayanmaktadır. Örnekte bulunan SOD, süperoksit radikallerini ortamdan uzaklaştırarak 2 numaralı formazan reaksiyonunu inhibe eder. Sonuçta oluşan kırmızı rengin OD'si SOD yokluğunda oluşan renge göre azalır. Bu aradaki farkın belirlenmesiyle SOD aktivitesi ölçülür.

Ayıracılar:

1. CAPS (3-(sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit) Tamponu (pH=10,2):

- 50.00 mM CAPS'dan 1,1065 gr
- 0.94 mM EDTA'0,035 gr
- Doymuş NaOH'11,1µl

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

2. Substrat karışımı:

- 0.05 mM Ksantin'den 0.00152 gr
- 0.025 mM INT'den 0.00253 gr

CAPS tamponuyla 10 ml'ye tamamlanır.

3. 80 Ü/L Ksantin oksidaz

- 50 Ü Ksantin oksidaz 3.04 µl

Saf su ile 1 ml'ye tamamlanır.

4. 0.01 M Fosfat tamponu (pH=7,0):

- Na₂PO₄'den 54.91 mg
- NaH₂PO₄'den 3.58 mg

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

5. Standart (S6):

5,6 Ü/ml SOD içeren Ransod kitinin standardıdır.

Lyofilize olarak hazırlanmış SOD standardı 10 ml bidistile su ile sulandırılır. Standart eğri çiziminde kullanılacak olan diğer SOD derişimleri fosfat tamponuyla hazırlanır. 2-8 °C'de saklandığında 2 hafta süreyle dayanıklıdır.

3.7.1.4 Katalaz ölçümü

Katalaz aktivitesi, amonyum molibdatla stabil bir kompleks oluşturan hidrojen peroksitin spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi temeline dayanan ölçümler sonucu belirlendi.⁽⁹⁷⁾

Homojenat Hazırlanması

1. Örnek sayısı kadar tüp alınarak numaralandı.
2. Yaklaşık 0,4 gr ağırlığında karaciğer doku örnekleri alındı.
3. Alınan örnekler SF ile yıkandı.
4. Buz dolu bir kap içinde tüpe geçirildi.
5. Daha sonra tüp içindeki örnekler, sodyum-potasyum-fosfat tamponu ile homojenize edildi.

Sodyum-Potasyum-Fosfat Tamponu

- 1) KH_2PO_4 'den 9,08 gr alındı ve 1 litre distile su içinde çözüldü (A).
- 2) Na_2HPO_4 'den 11.88 g alındı ve 1 litre distile su içinde çözüldü (B).
- 3) Daha sonra 3,3 ml A çözeltisinden alınarak B çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlandı ve pH=8 olacak şekilde pH metrede ayarlandı.
- 4) Buz dolu bir kap içindeki tüpte bulunan örnek, homojenizatör cihazında 8000 devirde 10 vuru da homojenize edildi.
- 5) Daha sonra soğutmalı santrifüjde +4 °C'de, 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.
- 6) Üstte toplanan süpernatant ayrı bir vialle alınarak ölçümde kullanıldı.

Aynı gün içinde ölçüm yapılacaksa, +4 °C'de daha sonra ölçüm yapılacaksa -70 °C'de derin dondurucuda saklandı.

Çözeltiler

1. Substrat çözeltisi:
%30 H_2O_2 'den 8,11 ml alınıp, fosfat tamponu ile 1000 ml ye tamamlanıp pH=7,4'e ayarlandı.
2. 32,4 mmol/l amonyum molibdat $((\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7 \text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ çözeltisi:
Bunun için, 8 gram amonyum molibdat 200 ml distile suda çözülerek hazırlandı. Her zaman taze olarak kullanıldı ve kısa süreli beklemelemlerde çökelti oluşmuşsa ölçüm yapılmadan önce çözelti vortekslendi.
3. Tampon çözeltileri:

A tampon çözeltisi: 4,08 g KH_2PO_4 alınarak 500 ml distile suda çözüldü.

B tampon çözeltisi: 8,04 g Na_2HPO_4 alınarak 500 ml distile suda çözüldü.

Daha sonra A çözeltisinden 3,3 ml alınarak B çözeltisi ile 100 ml ye tamamlandı ve $\text{pH}=7,4$ 'e ayarlandı.

Spektrofotometrede Ölçüm

1. Her bir örnek tüpü için bir blank tüpü (blank 1, B1) hazırlandı ve tüpler numaralandı.
2. Blank (B1) tüplerine; 37 °C'de su banyosu içinde 1 ml substrat ve 0,2 ml hemolizat ilave edilerek başlatılan reaksiyon, anında 1 ml amonyum molibdat çözeltisi ilavesiyle reaksiyon durduruldu.
3. Örnek tüplerine ise; 1 ml substrat ve 0,2 ml hemolizat konarak, 37 °C'de 60 saniyelik inkübasyon süresince devam eden reaksiyon yine 1 ml amonyum molibdat çözeltisi ilavesiyle durduruldu.
4. Örnek tüplerinin inkübasyonu için 60 saniyelik bekleme süresi içinde blank 2 (B2) ve blank 3 (B3) tüpleri hazırlandı.
5. Blank 2 tüpüne; 1 ml substrat, 1 ml molibdat ve 0,2 ml tampon ilave edildi.
6. Blank 3 tüpüne; 1 ml tampon, 1 ml molibdat ve 0,2 ml tampon, ilave edildi.
7. Spektrofotometre 405 nm de distile suyla sıfırlandıktan sonra B2 ve B3 tüplerindeki çözeltilerin absorbans değerleri okundu, sonra blank (B1) tüpleri ve arkasından örnek tüplerinin absorbansları okundu.

Sonucun Hesaplanması

Spektrofotometrede okunan değerler, aşağıdaki formüle uygulandı ve sonuçlar homojenatta U/mg protein olarak bulundu.

$$\text{Katalaz Aktivitesi} = \frac{\text{Örnek} - \text{Blank1}(B1)}{\text{Blank2}(B2) - \text{Blank3}(B3)} \times 271$$

3.7.2. 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 3 mikron kalınlığında kesitler alındı, kesitler etüvde 37 °C'de bir gece bekletilerek deparafinize edildi.

3.7.2.1 Caspase-3 immünohistokimyasal boyama

Formol fiske parafin bloklardan kesitler polilizinli lama alınarak, 0,4 mikron kalınlığında ince kesitler alındı ve 37 °C'lik etüvde bir gece bekletildi. Ardından 10 dakika ksilende bekletilerek deparafinizasyon yapıldı. Daha sonra, 5 dakika absolu alkolde, hemen ardından, 5 dakika %96'lık alkolde bekletilerek dehidratasyon işlemi yapıldı. İşlem sonrası 3 dakika kadar distile su ile yıkandı. Kesitler, antijen alımı için citrate buffer tamponu pH:6,00 içinde 98 °C'de 20 dakika boyunca ısıtıldı ve yine aynı tampon içinde 20 dakika oda ısısında soğutuldu. Distile sudan geçirilen kesitlere %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) damlatılarak 20 dakika inkübasyon yapıldı. Fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanarak, Ultra V blok (*Labvision-TA-125-UB*) ile blocking yapılan kesitlere 5 dakika inkübasyon yapıldı. Bu işlem sonrası kesitler yıkanmadan, üstündeki blocking solüsyonu silkelenerek üzerine primary antibody damlatıldı. *Caspase 3*, 1/50 dilüsyon, (*Leica Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody CPP32*) antikoruyla 30 dakika inkübe edildi. Yapılan işlemler sonrası PBS'de 3 dakika süreyle yıkanan kesitlere Biotinylated Goat Ant-Polyvalent damlatılarak 20 dakika süreyle inkübasyon uygulandı ve PBS'de tekrar yıkandı. Large Volume Streptavidin Peroxidase damlatıldıktan sonra 20 dakika süreyle inkübasyon yapıldı ve bir daha PBS'de yıkandı. DAB Chromogen damlatılan kesitlere 15 dakika kadar inkübasyon yapıldı ve ardından distile suda 3 dakika süreyle yıkandı. Zıt boyama için hematoksilin ile kesitler 1 dakika boyandı ve ardından distile suda 3 dakika süreyle yıkandı. Yıkama işlemleri tamamlanan preparatlar %96'lık alkolden geçirilerek havada kurutuldu. Son olarak ksilene konulan preparatlar Entelan ile kapatıldı.

3.7.2.2. Apoptozisin değerlendirilmesi

Boyanan kesitlerde, her örnekte 400 büyütmede 10 ayrı saha tarandı ve en az 1000 hepatositte boyanmış olan hepatosit stoplazmaları sayıldı.

3.8. İstatiksel Analizler

Veriler SPSS 17 paket programına girilerek analizler yapıldı. Sayısal değişkenler ortalama \pm standart sapma şeklinde sunuldu. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi sırasında gruplar arasındaki farkların incelenmesinde; değişkenler arasındaki farklılıklar incelenirken, iki gruplu karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel analiz sonucunda, $p < 0,05$ olarak hesaplanan testler anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Parametreler

4.1.1. ALT Değerlendirmeleri

Prezervasyon solüsyonlarından 0, 6 ve 12. Saatlerde örnekler alınarak ALT düzeyleri çalışıldı. Genel olarak E vitamini eklenen gruplarda ALT düzeyleri daha düşük çıktı. ALT düzeyleri ile ayrıntılı bilgi tablo 3-4 ve şekil 5-6-7'de verilmiştir.

Tablo 3: ALT'nin, deney gruplarındaki değerleri

Enzim	Solüsyon	N	Saat	Ortalama	Standart Sapma	En Küçük	En Büyük
ALT	UW	8	0.saat	99,50	64,55	44	251
			6.saat	688,25	28,00	640	728
			12.saat	1033,13	282,70	672	1329
	UW+Z	8	0.saat	91,12	46,14	37	144
			6.saat	600,88	244,57	257	849
			12.saat	801,38	302,69	446	1142
	UW+E	8	0.saat	44,75	24,01	21	72
			6.saat	389,13	123,04	231	579
			12.saat	548,63	198,27	284	773
	HTK	8	0.saat	258,00	140,41	99	471
			6.saat	1164,75	169,09	879	1333
			12.saat	1424,88	221,53	1139	1654
	HTK+Z	8	0.saat	228,75	47,33	172	305

			6.saat	804,38	254,79	425	1148
			12.saat	1251,00	237,22	953	1476
	HTK+E	8	0.saat	77,37	33,76	32	121
			6.saat	338,50	76,79	256	461
			12.saat	590,25	216,02	379	842

Tablo 4: ALT ortalamalarının karşılaştırılması

ALT						
	0. Saat Ortalama ±SD	p*	6. Saat Ortalama ±SD	p*	12. Saat Ortalama ±SD	p*
UW UW+E	99,50±64,55 44,75±24,01	<u>0,012</u>	688,25±28,00 389,13±123,04	<u>0,001</u>	1033,13±282,70 548,63±198,27	<u>0,009</u>
UW UW+ Z	99,50±64,55 91,12±46,14	0,999	688,25±28,00 600,88±244,57	0,999	1033,13±282,70 801,38±302,69	0,093
UW+E UW+Z	44,75±24,01 91,12±46,14	0,059	389,13±123,04 600,88±244,57	0,074	548,63±198,27 801,38±302,69	0,093
HTK HTK+E	258,00±140,41 77,37±33,76	<u>0,003</u>	1164,75±169,09 338,50±76,79	<u>0,001</u>	1424,88±221,53 590,25±216,02	<u>0,001</u>
HTK HTK+Z	258,00±140,41 228,75±47,33	0,834	1164,75±169,09 804,38±254,79	<u>0,009</u>	1424,88±221,53 1251,0±237,22	0,208
HTK+E HTK+Z	77,37±33,76 228,75±47,33	<u>0,001</u>	338,50±76,79 804,38±254,79	<u>0,002</u>	590,25±216,02 1251,0±237,22	<u>0,001</u>

*Mann Whitney U testi

UW ve UW+E gruplarında, ALT'nin 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; p=0.012,

$p=0.001$, $p=0.009$ olarak hesaplandı. ALT'nin 0-6-12. saatlerde UW+E grubundaki değerleri UW grubundaki değerlerinden daha düşüktü ve aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıydı.

UW ve UW+Z gruplarında, ALT'nin 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.999$, $p=0.999$, $p=0.093$ olarak hesaplandı ve aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

UW+E ve UW+Z gruplarında, ALT'nin 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.059$, $p=0.074$, $p=0.093$ olarak hesaplandı aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

HTK ve HTK+E gruplarında, ALT'nin 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.003$, $p=0.001$, $p=0.001$ olarak hesaplandı. ALT'nin 0-6-12. saatlerde HTK+E grubundaki değerleri HTK grubundaki değerlerinden daha düşüktü ve aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıydı.

HTK ve HTK+Z gruplarında, ALT'nin 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.834$, $p=0.009$, $p=0.208$ olarak hesaplandı. ALT'nin 6. saatte HTK+Z grubundaki değeri, HTK grubundaki değerinden daha düşüktü ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı.

HTK+E ve HTK+Z gruplarında, ALT'nin 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.001$, $p=0.002$, $p=0.001$ olarak hesaplandı. ALT'nin 0-6-12. saatlerde HTK+E grubundaki değerleri HTK+Z grubundaki değerlerinden daha düşüktü ve aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıydı.

Şekil 5: *Gruplar arası ALT düzeylerinin karşılaştırılması*

Şekil 6: *ALT'nin, UW ve UW+E gruplarında grafiksel olarak karşılaştırılması*

Şekil 7: ALT'nin, HTK ve HTK +E gruplarında grafiksel olarak karşılaştırılması

4.1.2. MDA, SOD ve Katalaz Düzeyleri

Perfüze edilen karaciğer dokusundan 0, 6 ve 12. saatlerde alınan doku örneklerinden MDA, SOD ve Katalaz düzeyleri hesaplandı.

Tablo 5: MDA'nın deney gruplarındaki değerleri

Enzim	Solüsyon	N	Saat	Ortalama	Standart Sapma	En Küçük	En Büyük
MDA	UW	8	0.saat	3,11	0,89	2,07	4,86
			6.saat	3,58	1,28	2,44	5,81
			12.saat	3,38	0,90	2,42	5,20
	UW+Z	8	0.saat	2,56	1,22	,00	4,25
			6.saat	3,00	0,46	1,99	3,53
			12.saat	3,24	0,62	2,39	4,40
	UW+E	8	0.saat	1,73	0,92	0,30	3,09
			6.saat	1,89	0,88	0,96	3,71
			12.saat	3,75	0,77	2,68	4,84
	HTK	8	0.saat	4,96	1,17	3,49	6,23
			6.saat	4,57	1,83	2,32	6,99
			12.saat	3,92	2,21	2,42	8,29
	HTK+Z	8	0.saat	5,07	1,25	3,77	7,12
			6.saat	4,11	0,84	3,22	5,32
			12.saat	4,15	0,72	3,35	5,70

	HTK+E	8	0.saat	3,36	0,97	2,27	4,75
6.saat			2,24	0,69	1,62	3,73	
12.saat			4,07	0,59	2,96	4,97	

Tablo 6: MDA ortalamalarının karşılaştırılması

MDA						
	0.Saat Ortalama ±SD	p*	6.Saat Ortalama± SD	p*	12.Saat Ortalama± SD	p*
UW UW+E	3,11 ± 0,89 1,73 ± 0,92	<u>0,01</u> 2	3,58 ± 1,28 1,89 ± 0,88	<u>0,00</u> 9	3,38 ± 0,90 3,75 ± 0,77	0,34 5
UW UW+ Z	3,11 ± 0,89 2,56 ± 1,22	0,40 1	3,58 ± 1,28 3,00 ± 0,46	0,99 9	3,38 ± 0,90 3,24 ± 0,62	0,83 4
UW+E UW+Z	1,73 ± 0,92 2,56 ± 1,22	0,07 4	1,89 ± 0,88 3,00 ± 0,46	<u>0,02</u> 1	3,75 ± 0,77 3,24 ± 0,62	0,17 2
HTK HTK+E	4,96 ± 1,17 3,36 ± 0,97	<u>0,01</u> 6	4,57 ± 1,83 2,24 ± 0,69	<u>0,00</u> 5	3,92 ± 2,21 4,07 ± 0,59	0,11 5
HTK HTK+Z	4,96 ± 1,17 5,07 ± 1,25	0,75 3	4,57 ± 1,83 4,11 ± 0,84	0,91 6	3,92 ± 2,21 4,15 ± 0,72	0,09 3
HTK+E HTK+Z	3,36 ± 0,97 5,07 ± 1,25	<u>0,01</u> 2	2,24 ± 0,69 4,11 ± 0,84	<u>0,00</u> 5	4,07 ± 0,59 4,15 ± 0,72	0,67 4

*Mann Whitney U testi

UW ve UW+E gruplarında, MDA'nın 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; p=0.012, p=0.009, p=0.345 olarak hesaplandı. MDA'nın 0 ve 6. saatte UW+E grubundaki değerleri, UW grubundaki değerlerinden daha düşüktü ve aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlıydı.

UW ve UW+Z gruplarında, MDA'nın 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.401$, $p=0.999$, $p=0.834$ olarak hesaplandı ve aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

UW+E ve UW+Z solüsyonlarında, MDA'nın 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.074$, $p=0.021$, $p=0.172$ olarak hesaplandı. MDA'nın 6. saatte UW+E grubundaki değeri, UW grubundaki değerinden daha düşüktü ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı.

HTK ve HTK+E gruplarında, MDA'nın 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.016$, $p=0.005$, $p=0.115$ olarak hesaplandı. MDA'nın 0 ve 6. saatte HTK+E grubundaki değerleri, HTK grubundaki değerlerinden daha düşüktü ve aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlıydı.

HTK ve HTK+Z gruplarında, MDA'nın 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.753$, $p=0.916$, $p=0.093$ olarak hesaplandı ve aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

HTK+E ve HTK+Z gruplarında, MDA'nın 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.012$, $p=0.005$, $p=0.674$ olarak hesaplandı. MDA'nın 0 ve 6. saatte HTK+E grubundaki değerleri, HTK+Z grubundaki değerlerinden daha düşüktü ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı.

Şekil 8: Gruplar arası MDA düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 9: MDA'nın, UW ve UW+E gruplarında grafiksel olarak karşılaştırılması

Şekil 10: MDA'nın, HTK ve HTK+E gruplarında grafiksel olarak karşılaştırılması

Tablo 7: SOD'un deney gruplarındaki değerleri

Enzim	Solüsyon	N	Saat	Ortalama	Standart Sapma	En Küçük	En Büyük
SOD	UW	8	0.saat	1,33	0,50	0,97	2,54
			6.saat	1,13	0,58	0,76	2,53
			12.saat	1,29	0,99	0,63	3,67
	UW+Z	8	0.saat	1,48	0,64	0,82	2,70
			6.saat	1,32	0,29	1,04	2,00
			12.saat	1,27	0,30	0,90	1,82
	UW+E	8	0.saat	2,64	0,87	1,49	3,71
			6.saat	1,43	0,19	1,13	1,76
			12.saat	1,64	0,76	0,80	2,99
	HTK	8	0.saat	2,22	1,20	0,94	4,34
			6.saat	1,33	0,35	0,82	1,92
			12.saat	1,19	0,22	0,75	1,49
	HTK+Z	8	0.saat	1,89	0,58	1,23	3,05
			6.saat	1,80	0,45	1,09	2,30
			12.saat	2,04	1,08	1,15	4,47
	HTK+E	8	0.saat	3,67	0,22	3,37	4,06
			6.saat	1,85	0,77	1,11	3,22

			12.sa at	2,01	0,60	1,42	2,99
--	--	--	-------------	------	------	------	------

Tablo 8: SOD ortalamalarının karşılaştırılması

SOD								
	0.Saat Ortalama ±SD		p*	6.Saat Ortalama ±SD		p*	12.Saat Ortalama ±SD	
UW UW+E	1,33 0,50	±	<u>0,00</u>	1,13 0,58	±	<u>0,02</u>	1,29 0,99	±
	2,64 0,87	±	<u>3</u>	1,43 0,19	±	<u>1</u>	1,64 0,76	±
UW UW+ Z	1,33 0,50	±	0,75	1,13 0,58	±	0,07	1,29 0,99	±
	1,48 0,64	±	3	1,32 0,29	±	4	1,27 0,30	±
UW+E UW+Z	2,64 0,87	±	<u>0,01</u>	1,43 0,19	±	0,17	1,64 0,76	±
	1,48 0,64	±	<u>6</u>	1,32 0,29	±	2	1,27 0,30	±
HTK HTK+E	2,22 1,20	±	<u>0,02</u>	1,33 0,35	±	0,17	1,19 0,22	±
	3,67 0,22	±	<u>7</u>	1,85 0,77	±	2	2,01 0,60	±
HTK HTK+Z	2,22 1,20	±	0,83	1,33 0,35	±	0,05	1,19 0,22	±
	1,89 0,58	±	4	1,80 0,45	±	9	2,04 1,08	±
HTK+E HTK+Z	3,67 0,22	±	<u>0,00</u>	1,85 0,77	±	0,91	2,01 0,60	±
	1,89 0,58	±	<u>1</u>	1,80 0,45	±	6	2,04 1,08	±

*Mann Whitney U testi

UW ve UW+E gruplarında, SOD'un 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.003$, $p=0.021$, $p=0.172$ olarak hesaplandı. SOD'un 0. saatte ve 6. saatte UW+E

grubundaki değerleri, UW grubundaki değerlerinden daha yüksekti ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı.

UW ve UW+Z gruplarında, SOD'un 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.753$, $p=0.074$, $p=0.172$ olarak hesaplandı ve aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

UW+E ve UW+Z gruplarında, SOD'un 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.016$, $p=0.172$, $p=0.400$ olarak hesaplandı. SOD'un 0. saatte UW+E grubundaki değeri, UW+Z grubundaki değerinden daha yüksekti ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı.

HTK ve HTK+E gruplarında, SOD'un 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.027$, $p=0.172$, $p=0.001$ olarak hesaplandı. SOD'un 0 ve 12. saatte HTK+E grubundaki değerleri, HTK solüsyonundaki değerlerinden daha yüksekti ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı.

HTK ve HTK+Z gruplarında, SOD'un 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.834$, $p=0.059$, $p=0.027$ olarak hesaplandı. SOD'un 12.saatte HTK+Z grubundaki değeri, HTK solüsyonundaki değerinden daha yüksekti ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı.

HTK+E ve HTK+Z gruplarında, SOD'un 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.001$, $p=0.916$, $p=0.600$ olarak hesaplandı. SOD'un 0. saatte HTK+E grubundaki değeri, HTK+Z grubundaki değerinden daha yüksekti ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı.

şekil 11: *Gruplar arası SOD düzeylerinin karşılaştırılması*

şekil 12: *SOD'un, UW ve UW+E gruplarında grafiksel olarak karşılaştırılması*

Şekil 13: SOD'un, HTK ve HTK+E gruplarında grafiksel olarak karşılaştırılması

Tablo 9: Katalaz'ın deney gruplarındaki değerleri

Enzim	Solüsyon	N	Saat	Ortalama	Standart Sapma	En Küçük	En Büyük
Katalaz	UW	8	0.saat	69,6	17,41	41,54	94,54
			6.saat	62,7	25,38	21,47	81,18
			12.saat	83,6	28,65	45,53	134,32
	UW+Z	8	0.saat	90,8	40,43	45,20	168,82
			6.saat	83,7	51,92	44,20	186,73
			12.saat	122,7	55,43	32,26	207,79
	UW+E	8	0.saat	78,2	25,67	44,83	122,99
			6.saat	110,2	49,84	43,09	186,04
			12.saat	133,3	36,83	84,83	189,40
	HTK	8	0.saat	49,5	23,30	20,24	86,21
			6.saat	82,7	11,27	67,03	99,26
			12.saat	49,1	18,57	26,02	85,70
	HTK+Z	8	0.saat	84,6	42,52	16,55	167,83
			6.saat	84,1	33,26	40,56	152,99
			12.saat	69,0	32,12	27,78	108,63
	HTK+E	8	0.saat	59,7	17,78	27,78	83,13
			6.saat	87,5	40,67	39,78	154,69
			12.saat	128,9	32,78	86,47	175,26

Tablo 10: Katalaz ortalamalarının karşılaştırılması

Katalaz						
	0.Saat Ortalama ±SD	p*	6.Saat Ortalama± SD	p*	12.Saat Ortalama± SD	P*
UW UW+E	69,62 ± 17,41 78,25 ± 25,67	0,52 9	62,71 ± 25,38 110,25 ± 49,84	0,05 9	83,67 ± 28,65 133,33 ± 36,83	<u>0,00</u> 9
UW UW+Z	69,62 ± 17,41 90,89 ± 40,43	0,24 8	62,71 ± 25,38 83,76 ± 51,92	0,75 3	62,71 ± 25,38 122,78 ± 55,43	0,07 4
UW+E UW+Z	78,25 ± 25,67 90,89 ± 40,43	0,60 0	78,25 ± 25,67 83,76 ± 51,92	0,34 5	78,25 ± 25,67 122,78 ± 55,43	0,75 3
HTK HTK+E	49,54 ± 23,30 59,70 ± 17,78	0,24 8	82,77 ± 11,27 87,53 ± 40,67	0,99 9	49,16 ± 18,57 128,97 ± 32,78	<u>0,00</u> 1
HTK HTK+Z	49,54 ± 23,30 84,62 ± 42,52	<u>0,04</u> 6	82,77 ± 11,27 84,16 ± 33,26	0,83 4	49,16 ± 18,57 69,06 ± 32,12	0,24 8
HTK+E HTK+Z	59,70 ± 17,78 84,62 ± 42,52	0,05 9	87,53 ± 40,67 84,16 ± 33,26	0,91 6	128,97 ± 32,78 69,06 ± 32,12	<u>0,00</u> 5

*Mann Whitney U testi

UW ve UW+E gruplarında, katalazın 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; p=0.529, p=0.059, p=0.009 olarak hesaplandı. Katalazın 12. saatte UW+E grubundaki değeri, UW grubundaki değerinden daha yüksekti ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı.

UW ve UW+Z gruplarında, katalazın 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; p=0.248,

$p=0.753$, $p=0.074$ olarak hesaplandı ve aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

UW+E ve UW+Z gruplarında, katalazın 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.600$, $p=0.345$, $p=0.753$ olarak hesaplandı ve aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

HTK ve HTK+E gruplarında, katalazın 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.248$, $p=0.999$, $p=0.001$ olarak hesaplandı. Katalazın 12. saatte HTK+E grubundaki değeri, HTK grubundaki değerinden daha yüksekti ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı.

HTK ve HTK+Z gruplarında, katalazın 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.834$, $p=0.248$ olarak hesaplandı. Katalazın 0. saatte HTK+Z grubundaki değeri, HTK grubundaki değerinden daha yüksekti ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı.

HTK+E ve HTK+Z gruplarında, katalazın 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.059$, $p=0.916$, $p=0.005$ olarak hesaplandı. Katalazın 12. saatte HTK+E grubundaki değeri, HTK+Z grubundaki değerinden daha yüksekti ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı.

Şekil 14: *Gruplar arası katalaz düzeylerinin karşılaştırılması*

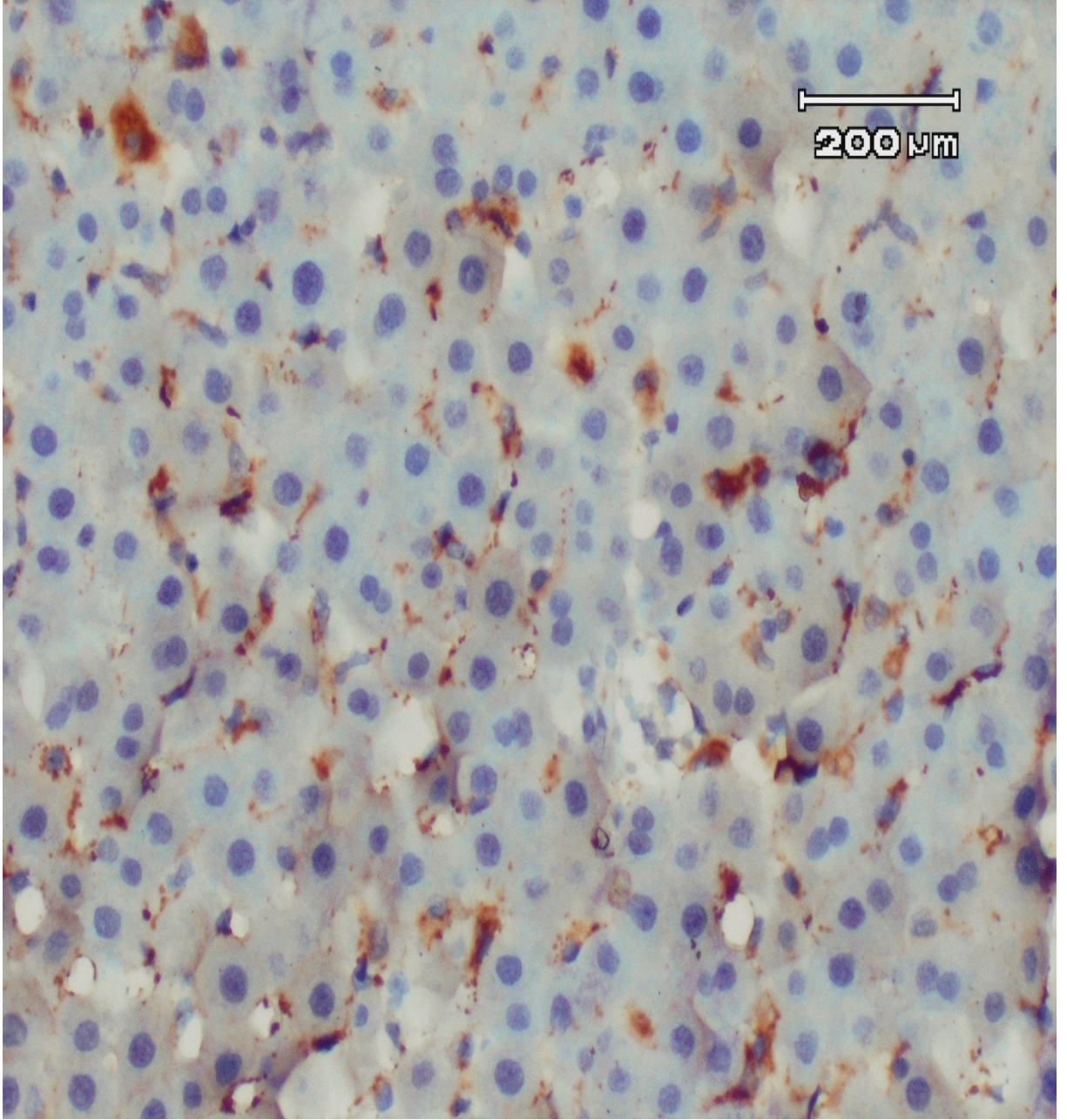
Şekil 15: *Katalaz'ın, UW ve UW+E gruplarında grafiksel olarak karşılaştırılması*

Şekil 16: *Katalaz'ın, HTK ve HTK+E gruplarında grafiksel olarak karşılaştırılması*

4.2. Patoloji Değerlendirme Sonuçları

4.2.1. Caspas-3 ile İmmunhistokimyasal Değerlendirme

Perfüze edilen karaciğer dokusundan 0, 6 ve 12. saatlerde örnekler alınarak caspas-3 immünohistokimyasal boyama tekniği ile boyandıktan sonra apoptotik cisimcikler sayıldı. Apoptotik cisimcikler şekil 17’de gösterilmiştir.



Şekil 17: Caspas-3 immünohistokimyasal boyama: Boyanma sonrasında karaciğer hücrelerindeki apoptotik cisimler kahverengi olarak boyanmıştır.

Tablo 11: Caspas-3 boyama ile apoptozis saptanan hücre sayıları

Solüsyon	N	Saat	Ortalama	Standart Sapma	En Küçük	En Büyük
UW	8	0.saat	128,00	12,10	111	145
		6.saat	149,75	11,39	134	167
		12.saat	172,63	16,29	153	196
UW+Z	8	0.saat	117,75	13,71	93	137
		6.saat	141,00	7,42	131	153
		12.saat	168,63	5,92	163	178
UW+E	8	0.saat	111,88	9,26	98	126
		6.saat	123,25	7,64	114	134
		12.saat	137,25	5,36	129	145
HTK	8	0.saat	123,50	5,09	114	131
		6.saat	149,00	7,61	134	158
		12.saat	192,00	11,48	177	208
HTK+Z	8	0.saat	123,00	9,47	109	138
		6.saat	144,00	10,92	130	158
		12.saat	198,00	18,52	177	239
HTK+E	8	0.saat	115,50	7,81	104	126
		6.saat	126,00	7,27	115	139
		12.saat	154,00	12,02	140	173

Tablo 12: Caspas-3 boyama ile apopitozis saptanan hücre sayılarının karşılaştırılması

Caspas-3 boyama ile apopitozis saptanan hücreler									
Gruplar	0. Saat Ortalama ±SD		p*	6. Saat Ortalama ±SD		p*	12. Saat Ortalama ±SD		p*
UW UW+E	128,0 12,10	±	<u>0,01</u>	149,7 11,39	±	<u>0,00</u>	172,6 16,29	±	<u>0,001</u>
	111,8 9,26	±	<u>4</u>	123,2 7,64	±	<u>1</u>	137,2 5,36	±	
UW UW+Z	128,0 12,10	±	0,14	149,7 11,39	±	0,09	172,6 16,29	±	0,833
	117,7 13,71	±	1	141,0 7,42	±	2	168,6 5,92	±	
UW+E UW+Z	111,8 9,26	±	0,31	123,2 7,64	±	<u>0,00</u>	137,2 5,36	±	<u>0,001</u>
	117,7 13,71	±	8	141,0 7,42	±	<u>1</u>	168,6 5,92	±	
HTK HTK+E	123,5 5,09	±	<u>0,04</u>	149,0 7,61	±	<u>0,00</u>	192,0 11,48	±	<u>0,001</u>
	115,5 7,81	±	<u>0</u>	126,0 7,27	±	<u>1</u>	154,0 12,02	±	
HTK HTK+Z	123,5 5,09	±	0,75	149,0 7,61	±	0,34	192,0 11,48	±	0,752
	123,0 9,47	±	2	144,0 10,92	±	3	198,0 18,52	±	
HTK+E HTK+Z	115,5 7,81	±	0,14	126,0 7,27	±	<u>0,00</u>	154,0 12,02	±	<u>0,001</u>
	123,0 9,47	±	1	144,0 10,92	±	<u>3</u>	198,0 18,52	±	

*Mann Whitney U testi

UW ve UW+E gruplarında, apopitozis saptanan hücre sayılarının 0-6-12. saatteki ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; p=0.014, p=0.001, p=0.001 olarak hesaplandı. Apopitozis saptanan hücre sayılarının 0.6.12. saatlerde UW+E grubundaki ortalamaları UW solüsyonundaki ortalamalarından daha düşüktü ve aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıydı.

UW ve UW+Z gruplarında, apopitozis saptanan hücre sayılarının 0-6-12. saatteki ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; p=0.141, p=0.092, p=0.833 olarak hesaplandı ve aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

UW+E ve UW+Z gruplarında, apopitozis saptanan hücre sayılarının 0-6-12. saatteki ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.318$, $p=0.001$, $p=0.001$ olarak hesaplandı. Apopitozis saptanan hücre sayılarının 6. ve 12. saatte UW+E grubundaki ortalamaları, UW+Z grubundaki ortalamalarından daha düşüktü ve aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıydı.

HTK ve HTK+E gruplarında, apopitozis saptanan hücre sayılarının 0-6-12. saatteki ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.040$, $p=0.001$, $p=0.001$ olarak hesaplandı. Apopitozis saptanan hücre sayılarının 0-6-12. saatlerde HTK+E grubundaki ortalamaları HTK solüsyonundaki ortalamalarından daha düşüktü ve aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıydı.

HTK ve HTK+Z gruplarında, apopitozis saptanan hücre sayılarının 0-6-12. saatteki ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.752$, $p=0.343$, $p=0.752$ olarak hesaplandı ve aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

HTK+E ve HTK+Z gruplarında, apopitozis saptanan hücre sayılarının 0-6-12. saatteki değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında p değerleri sırasıyla; $p=0.141$, $p=0.003$, $p=0.001$ olarak hesaplandı. Apopitozis saptanan hücre sayılarının 6. ve 12. saatte HTK+E grubundaki ortalamaları, HTK+Z grubundaki ortalamalarından daha düşüktü ve aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıydı.

Şekil18: *Tüm grupların ortalama apopitotik hücre sayısına göre karşılaştırılması*

Şekil 19: *UW ve UW+E gruplarında ortalama apopitotik hücre sayılarının karşılaştırılması*

Şekil 20: HTK ve HTK+E gruplarında ortalama apoptotik hücre sayılarının karşılaştırılması

5.TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı prezervasyon solüsyonlarından günümüzde en çok kullanılan iki tanesi olan UW ve HTK solüsyonlarına karaciğer üzerinde koruyucu etkisi olduğu bilenen E vitaminini ekleyerek hepatositlerdeki iskemi-reperfüzyon hasarını değerlendirmektir. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda hem UW solüsyonuna hem de HTK solüsyonuna E vitamini eklemek hepatositlerdeki hasarın azalmasını sağlamıştır.

Günümüzde kronik karaciğer hastalığı, akut fulminant karaciğer yetmezliği, bilier atrezi gibi son dönem karaciğer hastalıklarının tedavisinde karaciğer transplantasyonu önerilen tek tedavi yöntemi olmakta ve etkin bir şekilde uygulanmaktadır.^(13, 14) Nakil merkezlerinde her geçen gün alıcı listelerindeki sayı artarken bulunabilen kadavra sayısı bu gereksinimi karşılamada yetersiz kalmaktadır. Bulunabilen kadavra organ sayısı son derece sınırlı olduğu için elimize geçen bu organları alıcı kişiye ulaştırana kadar en iyi şekilde korumamız gerekmektedir. Organları korumak amacıyla geliştirilmiş birçok prezervasyon solüsyonu tanımlanmıştır. Bunlar arasında UW ve HTK solüsyonları en sık kullanılan iki tanesidir. Özellikle karaciğer primer olarak UW solüsyonu ile korunur. UW ile 24 saate kadar güvenli prezervasyon sağlanır. Son zamanlarda HTK'nında UW kadar etkin olduğu gösterilmiştir. Ancak, prezervasyonda sağlanan gelişmelere rağmen greft disfonksiyon oranı %5 ile %20 civarındadır.⁽⁹⁴⁾

İskemi reperfüzyon hasarı genellikle transplantasyon, miyokard enfarktüsü, şok ve iskemik serebrovasküler hastalıklarda görülmektedir. İskemi ve hipoksi sonrası dolaşım yeniden başladığında fazla miktardaki nikotin amid dinükleotid (NADH) oksijen ile reaksiyona girerek süperoksit oluşturur. Mitokondrideki NO reaksiyona girerek potent peroksinitrit serbest radikali meydana gelir. Peroksinitrit, mitokondride aerobik solunumda kullanılan bazı enzimleri inhibe ederek enerji üretimini engeller.⁽¹⁹⁾ İşte tam bu aşamada gerek oksijen radikallerinin oluşumunu

engellemek, gerekse oluşan serbest oksijen radikallerinin etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla antioksidan maddeler devreye girmektedir. E vitamini de antioksidan etkinliği kanıtlanmış maddelerden biridir. E vitamini hububat tanelerinde, mısır yağı, soya yağı ve diğer bitkisel sıvı yağlarda ve bunlardan yapılan margarinlerde, et, hayvansal yağ, karaciğer, balıketi, tavuk eti ve yumurtada bulunur. Kızartma, kaynatma ve saklama sırasında önemli ölçüde parçalanır. Anne sütünde oldukça fazladır.⁽⁵⁰⁾ Yağda çözünebilen bir madde olan E vitamini vücuda alındıktan sonra öncelikle ince bağırsaktan emilerek kan yoluyla karaciğere gelir.^(47, 48) Karaciğerden aktif formu olan α -tokoferol olarak tekrar kana salınır. E vitamini antioksidan etkinliğini, peroksitleri ve serbest oksijen radikallerini nötralize ederek ortaya çıkarır. Serbest oksijen radikalleri oluşmasının eşlik ettiği lipid peroksidasyonunu hücre membranında önleyen ve oluştuğunda nötralize eden en güçlü antioksidan faktör E vitaminidir.

Karaciğerde sentezlenen transaminazlardan birisi olan ALT normalde karaciğer hücresi içerisinde bulunmaktadır. ALT düzeylerinin artması karaciğerdeki hücre harabiyetinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.

Bu yıl içerisinde yayınlanan Pioglitazone vs. Vitamin E vs. Placebo in Non-alcoholic Steatohepatitis (PIVENS) çalışmasının yeniden değerlendirilmesinde non-alkolik steatohepatitis (NASH) tanısı olan 247 kişi üzerinde yaptıkları bir çalışmada pioglitazon, E vitamini ve plasebonun ALT düzeyindeki etkileri karşılaştırılmış. E vitamini verilen grupta plaseboya göre ilk aydan başlayarak ALT değerlerinde anlamlı düşüş olduğu saptanmış.⁽⁹⁸⁾ Yine yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada 24 prepubertal obez çocuğa 600 mg/gün E vitamini verilmiş. 6 aylık izlem sonrasında ALT değerlerinde, lipit profilinde ve insülin rezistansında anlamlı düşüş olduğu bulunmuş. Çalışmanın sonucunda non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) olan obez çocukların tedavisinde E vitamini takviyesinin etkili bir tedavi olabileceği vurgulanmış.⁽⁹⁹⁾

Bizim çalışmamızda prezervasyon solüsyonlarının ve solüsyonlara ek olarak E vitamini verilen grupların 0, 6 ve 12. saatlerde solüsyon içerisindeki ALT değerleri ölçüldü. Hem UW hem de HTK solüsyonuna E vitamini eklenen gruplarda ALT değerlerinin anlamlı derecede düşük olduğu bulundu. ALT'nin her iki koruma solüsyonuna E vitamini eklenen

gruplarda daha düşük bulunması E vitamininin karaciğer harabiyetinin daha az olmasına katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. Obeziteye bağlı yağlı karaciğer ve NASH gibi değişik karaciğer patolojilerinde yapılmış çalışmalar da E vitamininin karaciğer hasarını azalttığını destekler niteliktedir. (98, 99)

Karaciğerdeki IR hasarının göstergeleri olarak kullanılan parametrelerden bazıları MDA, SOD ve Katalaz düzeyleridir. Bunlardan MDA IR sırasında lipid peroksidasyonuna bağlı oluşan ürünlerden biri olup hasarın derecesi ile doğru orantılı olarak artış gösterir. SOD ve katalaz ise lipid peroksidasyonu sırasında membranda koruyucu etki gösteren antioksidan enzimlerdendir. E vitamini ve aprotininin rat karaciğerinde iskemi-reperfüzyon hasarındaki koruyucu etkisi üzerine yapılan bir çalışmada intraperitoneal verilen E vitamini sonrasında karaciğerde IR hasarı oluşturularak karaciğer dokusundan SOD, MDA ve Katalaz aktiviteleri ölçülmüş. Sonuçta SOD ve Katalazda anlamlı artış saptanırken MDA'da kontrol grubuna göre belirgin bir azalma olduğu bulunmuştur. (100)

2002 yılında ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada ratlara yüksek doz ve çok yüksek doz E vitamini verilerek karaciğerde iskemi reperfüzyon üzerine etkileri incelenmiş. Ratların karaciğerinde 60 dakika iskemi ve 120 dakika reperfüzyon oluşturulduktan sonra alınan karaciğer örneklerinden MDA düzeyleri çalışılmış. Çalışmanın sonucunda E vitamininin yüksek doz ve çok yüksek doz verildiği ratlarda MDA düzeyinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu saptanmış. Yine aynı çalışmada çok yüksek doz E vitamini verilen gruptaki ratlardaki MDA düzeyinin yüksek doz E vitamini verilen gruba göre de daha düşük olduğu görülmüş. (101)

Bizim çalışmamızda da UW ve HTK solüsyonlarına E vitamini eklenen gruplarda 0 ve 6. saatlerde MDA düzeylerinde anlamlı bir düşüş olurken 12. saatte istatistiksel olarak farklılık saptanmadığını gördük. Buradan E vitamini eklemenin membranlarda lipid peroksidasyonunu azaltarak son ürün olan MDA düzeylerini düşürdüğü ve karaciğer üzerinde koruyucu etkisi olduğu kanısına vardık. Yapılan diğer bir çalışmada gram negatif basil olan E. coli'nin endotoksini ile karaciğerde hasar oluşturulmuş ve bu ratlara E vitamini verilmesi ile karaciğerde oluşan değişiklikler incelenmiş. Çalışmada tahmin edildiği üzere endotoksinin karaciğer hücrelerindeki lipid peroksidasyonunu arttırdığı ve

lipid peroksidasyonu sırasında oluşan ürünlerden biri olan MDA düzeyinde de artış tespit edilmiş. E vitamini verilen ratlar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında MDA düzeyleri arasında fark tespit edilmezken endotoksin verilen ratlar ile E vitamini takviyesi sonrası endotoksin verilen ratlar karşılaştırıldığında E vitamini verilen grupta MDA düzeyinin daha düşük olduğu bulunmuş. Yine aynı çalışmada endotoksin sonrası karaciğerde lipid peroksidasyonu sırasında antioksidan olarak görev yapan enzimlerden SOD ve katalaz düzeyleri araştırılmış. Endotoksin verilen grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında hem SOD değerlerinde hem de katalaz değerlerinde azalma olduğu görülmüş. Sadece E vitamini verilen grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında ise anlamlı fark tespit edilmemiş. Bununla birlikte endotoksin verilmeden önce E vitamini takviyesi grupla endotoksin verilen grup karşılaştırıldığında hem SOD değerlerinde hem de katalaz değerlerinde artış olduğu tespit edilmiş.⁽¹⁰²⁾ SOD düzeylerine bakıldığında UW+E grubunda UW grubuna göre 0 ve 6. saatlerde artış saptanırken 12. saatte anlamlı bir artış olmadığı görüldü. Yine SOD düzeylerinin HTK+E grubu ve HTK grubu arasındaki artışları değerlendirildiğinde 0 ve 12. saatte artış saptanırken 6. saatte artış olmadığı görüldü. Antioksidan enzimlerden bir diğeri olan katalaz ölçümleri incelendiğinde gerek UW gerekse HTK gruplarına E vitamini eklenmesi ile sadece 12. saatteki artışın anlamlı olduğu görüldü. E vitamini ile yapılmış diğer çalışmalarda ve bizim çalışmamızda bulduğumuz değerler genel olarak benzerlik göstermekte olup, lipid peroksidasyonu sırasında görev yapan SOD ve katalaz enzimlerinin her ikisinde de artış olması ve lipid peroksidasyonu son ürünü olan MDA değerlerindeki azalma E vitamininin koruyucu etkisinin antioksidan mekanizmalarla olduğunu desteklemektedir.

Karaciğerdeki iskemi-reperfüzyon hasarını histopatolojik olarak değerlendirme amacıyla apopitozisi gösterebilmek için Caspas-3 antijen-antikor boyama tekniğinden yararlanıldı. Yapılan bir çalışmada karaciğerde iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan ratlarda E vitamini derivesi kullanılmış ve Caspas 3/7 aktivitesi bakılarak apopitotik hücreler sayılmış. E vitamini derivesi verildikten sonra iskemi-reperfüzyon oluşturulan grupta sadece iskemi-reperfüzyon oluşturulan gruba göre

apoptozun belirgin düzeyde az olduğu görülmüş.⁽¹⁰³⁾ Yine yapılmış olan başka bir çalışmada arsenikle karaciğerde oluşturulan toksisitede askorbik asit ve E vitaminin apoptoz üzerine etkileri araştırılmış. TUNNEL boyama ile karaciğerdeki apoptotik hücreler sayılmış. Araştırmada E vitamini ve arsenik verilen grupta sadece arsenik verilen gruba göre apoptozisin belirgin olarak azaldığı bulunmuş.⁽¹⁰⁴⁾ Bizim çalışmamızda ise caspas-3 yolu kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyama ile prezervasyon solüsyonlarına E vitamini eklenen gruplarda sayılan apoptotik hücre sayılarının eklenmeyen gruplara göre belirgin olarak düşük olduğu bulundu. Hücre membranındaki lipid peroksidasyonu üzerine antioksidan mekanizmalarla etki gösteren E vitamininin karaciğerdeki IR'a bağlı apoptozisi azaltması da karaciğer üzerinde koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir.

6. YORUM

E vitamini antioksidan bir madde olup etkisini özellikle hücre membranındaki lipid peroksidasyonunu engelleyerek göstermektedir. Bizim çalışmamızda bulduğumuz sonuçlar incelendiğinde IR hasarı sürecinde lipid peroksidasyonu ürünlerinden biri olan MDA değerlerinin düşük bulunması, yine lipid peroksidasyonu sürecinde koruyucu olduğu bilinen SOD ve katalaz enzim değerlerinin yüksek çıkması ve bunların sonucunda karaciğerdeki hücrelerdeki apoptozisin immünohistokimyasal boyama ile

düşük bulunması E vitamininin prezervasyon solüsyonları ile birlikte kullanılmasının karaciğerdeki hasarı azaltacağı yönündedir.

7.KAYNAKLAR

1. Schneider, C. Chemistry and biology of vitamin. Mol.Nutr. Food Res. 2005; 49,7-30.
2. Burton GW and Ingold, KU. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. Annals of the New York Academy of Sciences, 1989; 570, 7-22.
3. Janero DR. Therapeutic potential of vitamin E against myocardial ischemic-reperfusion injury. Free Radical Biology and Medicine, 1991; 10, 315-324.
4. Dere F. Karaciğer anatomisi.1994; 3: 633-635.
5. Blumgart L H, Fong Y. Surgery of the liver and biliary tract. Edinburgh: Churchill Livingstone. 2000;3: 5.
6. Carter D S, Russel R C G, Pitt H A, Bismuth H. Hepatobiliary and pancreatic Surgery. Cahpman- Hall Med. 1996;5: 688.
7. İ.Ü Tıp Fakültesi Genel Cerrahi cilt 2,İstanbul, 2002,1083-1090.

8. Schwartz S I. Principles of Surgery. Mc Graw-Hill Co, 1999; 7:1395-1433.
9. Coppel JA, Brown SA, Perry DJ. Veno-occlusive disease: cytokines, genetics, and haemostasis. Blood Reviews 2003;17:63-70.
10. Townsend MC, Beauchamp RD, Evers BM. Liver. In: Meyers WC, Chan RS (Eds). Sabiston Textbook of Surgery 16 th. WB Saunders Company, Philadelphia 2001; pp 997-1059.
11. Guyton AC. Liver. In: Guyton AC (Ed.). Textbook of medical physiology (7th ed.). WB Saunders, Philadelphia 1986; pp.1203-1208.
12. 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.
13. Penko, M., E. At all. "An Overview of Liver Transplantation", American Association of Critical-Care Nurses, 1999; Volume:10, Issue:2, May page:176-184.
14. 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.
15. Carden D. L., Granger D. N. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. J. Pathology 2000;190:255-66.
16. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. Surg Clin North Am. 1992; 72: 65-83.
17. ŞenerG, YeğenBÇ, İskemi Reperfüzyon Hasarı. Klinik Gelişim. 5.
18. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. Acta Univ Carol Med Monogr. 1990; 137:1-53.
19. The Cryonics Institute.(2008) Ischemia and reperfusion injury in cryonics. The web site: <http://www.benbest.com/cryonicsischemia.html>.
20. Carden D,Grander D. Pahtophysiology of ischemia-reperfusion injury. J Pathol, 2000;190:255-66.
21. Heijnen B,Straatsburg I,Padilla N, Van Mierlo G et al. Inhibition of classical complement activation attenuates liver ischaemia and reperfusion injury in a rat model. British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology, 2005;143:15-23
22. Birincioğlu M. Türk Farmakoloji Derneği.(2004) İskemi-reperfüzyon tekniklerine genel giriş. <http://www.tfd.org.tr/gaziantep.html>.
23. Nieuwenhuijs V,De Bruijn M,Padbury R,Barritt G. Hepatic ischemia-reperfusion injury: roles of Ca²⁺ and other intracellular mediators of impaired bile flow and hepatocyte damage. Digestive Diseases and Sciences, 2006;51:1087-102 .
24. Peralta C,Prats N,Xaus C,Gelprı´ E et al. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. Hepatology, 1999;30:1481-9.
25. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Basford RE, Futrell JW. Free radicals: basic concepts concerning their chemistry, pathophysiology, and relevance to plastic surgery. Plast Reconstr Surg. 1987;79:990-997.
26. McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. Clin Biochem. 1993;26:351-357.
27. Acworth IN, Bailey B. Reactive Oxygen Species. The handbook of oxidative metabolism. Massachusetts.ESA Inc. 1997; 1-4.
28. Williams AT, Burk RF. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of free radical-mediated injury. Semin Liver Dis. 1990; 10: 4. 279-284.
29. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull. 1993;49:481-493.
30. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. Am J Med. 1991;9:14-22.

31. Fridovich, I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1975; 44:147-59.
32. Jialal, I., Fuller, CJ. Oxidized LDL and antioxidants. *Clin Cardiol.* Apr. 1993; 16(4 Suppl 1):16-9.
33. Kılınc, K. Serbest oksijen radikallerinin biyokimyasal etkileri ve metabolizması. *Biyokimya Dergisi.* Sayı 2. 1985; 60-89.
34. Klug, D., Rabani, J., Fridovich, I. A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J Biol Chem.* Aug 10. 1972; 247(15):4839-42.
35. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* 1994; 344:721-724.
36. Shayevitz JR, Varani J, Ward PA. Halothane and isoflurane increase pulmonary artery endothelial cell sensitivity to oxidant-mediated injury. *Anesthesiology.* 1991;74: 1067-1077.
37. Uysal, M. Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim.* 1998; 11:336-341.
38. Girotti, AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 1998; 39(8):1529-42.
39. Akkuş İ: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimosza Yayınları. Konya, 1995; 157.
40. Sies H. Oxidative stress. From basic research to clinical application. *Am J Med.* 1991; 91: 31-38.
41. Erden M. Serbest radikaller. *T Klin Tıp Bilimleri.* 1992; 12: 201-207.
42. Ward A, McBurney A, Lunec J. Evidence for the involvement of oxygen-derived free radicals in ischaemia-reperfusion injury, *Free Radic Res.* 1994; 20: 21-28.
43. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol.* 1996; 46: 15-32.
44. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993; 57:724-725.
45. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 1991; 40: 405-412.
46. Bucher RL. Regeneration of Mammalian Liver. *Cancer Commission of Harvard University* 1995; 1081.
47. Ŗwatsuki S, Shaw BW Jr, Starzi TE. Experience with 150 liver resections. *Ann Surg* 1983;197:247-252.
48. Ratych RE, Smith GW. Anatomy and Physiology of the Liver. In: Zuidema GD, Orringer MB, Ritchie WB, et al (Eds). *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract* (4 th). WB Saunders, Philadelphia 1996; pp. 357-373.
49. Anderson RW, Zieve L, Lindblad S. Ultrastructural Study of Hepatic Regeneration Following One-Lobe, Two-Lobe and Subtotal Hepatectomy in the Rat *Ex Pathol* 1990; 38:61- 72.
50. Kayaalp O. *Tıbbi Farmakoloji. Vitaminler.* Cilt 2, 9. Baskı, Hacettepe Taş Kitabevi 2000; 1541-1575.
51. Kazanç MB. Antioksidan vitaminler. *Sendrom.* 1997 Temmuz; 14-23.
52. Tuczek HV, and Rabes H. Loss of proliferation capacity of hepatocytes following subtotal hepatectomy. *Experientia* 1971 ;27: 26-530.
53. Mayes PA. Structure and Function of the Water-soluble Vitamins. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA - Rodwell VW. *Harper's Biochemistry.* 23. ed. Lange Medical Publication, London 1993; 573-87.
54. Pienaar BH, Lindell SL, Gulik TV, et all. 72 hour preservation of the canine liver by machine perfusion. *Transplantation* 49(2):258-260, 1990.

55. 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.
56. Markin RS, Wisecarver JL, Radio SJ, et al: Frozen section evaluation of donor livers before transplantation. *Transplantation* 56:1403-1409, 1993.
57. Briceno J, Marchal T, Padillo J, et al. Influence of marginal donors on liver preservation injury. *Transplantation* 74:522-526, 2002.
58. Compagnon p, Wang H, Lindell SL, et al. Brain death does not affect hepatic allograft function and survival after orthotopic transplantation in a canine model. *Transplantation* 73:1218-1227, 2002.
59. Cywes R, Mullen JB, Stratis MA, et al. Prediction of the outcome of transplantation in man by platelet adherence in donor liver allografts. Evidence of the importance of prepreservation injury. *Transplantation* 56:316-323, 1993.
60. Upadhyga GA, Topp SA, Hotchkiss RS, et al. Effect of cold preservation on intracellular calcium concentration and calpain activity in rat sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 37:313-323, 2003.
61. Arnault I, Bao YM, Dimicoli JL, et al. combined effect of fasting and alanine on liver function recovery after cold ischemia. *Transplant Int* 15:89-95, 2002.
62. Upadhyga 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* 31:115-1122, 2000.
63. Aguilar HI, Steers JL, Wiesner RH, et al. Enhanced liver calpain protease activity is a risk factor for dysfunction of human liver allografts. *Transplantation* 63:612-614, 1997.
64. Upadhyga 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* 26:922-928, 1997.
65. Topp SA, Upadhyga GA, Strasberg SM. Leukocyte adhesion to cold - preserved rat sinusoidal endothelial cells (SEC): Role of actin disassembly and ICAM-1. *Liver transpl* 9:1286-1294, 2003.
66. Imamura H, Sutto F, Brault A, et al. Role of Kupffer cells in cold ischemia/reperfusion injury of rat liver. *Gastroenterology*. 109:189-197, 1995.
67. Urata K, Imamura h, Brault A, et al. Effects of extended cold preservation and transplantation on the rat liver microcirculation. *Hepatology* 25:664-671, 1997.
68. Urata K, Brault A, Huet PM. Effects of portal vein clamping time on rat liver microcirculation following extended cold preservation and transplantation. *Transpl Int* 12:408-414, 1999.
69. 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* 66:737-747, 1998.
70. 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* 13:420-427, 2000.
71. Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, et al. Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. *Gastroenterology* 118:183-191, 2000.
72. Cywes R, Packham MA, Tietze L, et al. Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat. *Hepatology* 18:635-647, 1993.

73. 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* 272:1694-1702, 1997.
74. Gow AJ, Thom SR, Ischiropoulos H. Nitric oxide and peroxynitrite-mediated pulmonary cell death. *Am J Physiol* 274:L112-L118, 1998.
75. Takei Y, Marzi I, Gao WS, et al. Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 51:959-965, 1991.
76. Jaeschke H, Smith CW. Mechanism of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol* 61:647-653, 1997.
77. Bajt ML, Farhood A, Jaeschke H. Effects of CXC chemokines on neutrophil activation and sequestration in hepatic vasculature. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:G1188-G1195, 2001.
78. Clavien PA, Rudiger HA, Selzner M. Mechanism of hepatocyte death after ischemia: Apoptosis versus necrosis. *Hepatology* 33:1555-1557, 2001.
79. Vajdova K, Smrekova R, Kukan M, et al. Endotoxin-induced aggravation of preservation-reperfusion injury of rat liver and its modulation. *J Hepatol* 32:112-120, 2000.
80. Sindram D, Kohli V, Madden JF, Clavien PA: Calpain inhibition prevents sinusoidal endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver. *Transplantation* 68:136-140, 1999.
81. Bessems M, Doorschodt BM, Dinant S, et al. Machine perfusion Preservation of the Pig Liver Using a New preservation solution, Polysol. *Transplantation Proceedings*, 38, 1238-1242, 2006.
82. Pedotti P, Cardillo M, Rigotti P, et al. A comparative prospective study of two available solutions for kidney and liver preservation. *Transplantation* 77:1540, 2004.
83. Lauschke H, Olschewski P, Tolba R, et al. Oxygenated Machine perfusion mitigates surface antigen expression and improves preservation of predamaged donor livers. *Cryobiology* 46:53, 2003.
84. Butlr AJ, Rees MA, Wight DG, et al. Successful extracorporeal porcine liver perfusion for 72 hr. *Transplantation* 73:1212-1218, 2002.
85. St Peter SD, Imber CJ, Lopez I, et al. Extended preservation of non-heart-beating donor livers with normothermic machine perfusion. *Br J Surg* 89:609-616, 2002.
86. Neuhaus R, Blumhart G. Applications of an improved model for experimental studies of the liver. *Int J Artif Organs* 16:729-739, 1993.
87. Moray G, Sevmis S, Karakayali F, et al. Comparison of Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate Solution (HTK) and University of Wisconsin Solution (UW) in Livingdonor Liver Transplantation. *Transplant Proc.* Dec;38(10):3572-5, 2006.
88. 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* 32:142-147, 2000.
89. 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* 71:1268-1276, 2001.
90. 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* 7:540-545, 2001.
91. 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* 32:821-828, 2000.
92. Richard S. Mangus, Josef Tector A, et al. Comparison of Histidine-Tryptophan-Ketoglutarat Solution (HTK) and University of Wisconsin Solution (UW) in Adult Liver Transplantation. *Liver transplantation* 12:226-230, 2006.
 93. Avolio A, Agnes S, Nure E, et al. Comparative Evaluation of Two Perfusion Solutions for Liver Preservation and Transplantation. *Transplantation Proceedings*, 38, 1066-1067: 2006.
 94. Selzner N, Rudiger HA, Graf R, et al. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 125:917-936, 2003.
 95. 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* 97:412-417, 1981.
 96. Uchiyama M, Mihara M. Determination Of Malonaldehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test. *Anal Biochem*, 1978;86: 279-286.
 97. Goth L, A Simple Method for Determination of Serum Catalase Activity and Revision of Reference Range, *Clinical Chemical Acta* 196. 1991: p. 143-152.
 98. Hoofnagle, J. H., et al. "Vitamin E and changes in serum alanine aminotransferase levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis." *Alimentary pharmacology & therapeutics* (2013).
 99. D'Adamo, Ebe, et al. "Improved oxidative stress and cardio-metabolic status in obese prepubertal children with liver steatosis treated with lifestyle combined with Vitamin E." *Free radical research* 47.3 (2013): 146-153.
 100. Polat, K. Y., et al. "The protective effect of aprotinin and α -tocopherol on ischemia-reperfusion injury of the rat liver." *Transplantation proceedings*. Vol. 40. No. 1. Elsevier, 2008.
 101. Giakoustidis D., et al. "Intramuscular administration of very high dose of α -tocopherol protects liver from severe ischemia/reperfusion injury." *World journal of surgery* 26.7 (2002): 872-877.
 102. Bharrhan S., Kanwaljit C., and Praveen R. "Vitamin E supplementation modulates endotoxin-induced liver damage in a rat model." *Am J Biomed Sci* 2.1 (2010): 51-62.
 103. Oishi, Kazushige, et al. "The Vitamin E Derivative, EPC-K1, Suppresses Inflammation During Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury and Exerts Hepatoprotective Effects in Rats." *Journal of Surgical Research* 176.1 (2012): 164-170.
 104. Ramanathan, Kadirvel, et al. "Ascorbic acid and α -tocopherol as potent modulators of apoptosis on arsenic induced toxicity in rats." *Toxicology letters* 156.2 (2005): 297-306.