



**UW(UNİVERSİTY OF WİSCONSİN) VE HTK(HİSTİDİN-TRİPTOFAN-  
KETOGLUTARAT) PREZERVASYON SOLUSYONLARI ÜZERİNE SİLYBUM  
MARİANUM'UN ETKİLERİ**

**DR. NAZMİ ÖZER**

**K.S.Ü. TIP FAKÜLTESİ**

**GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**UZMANLIK TEZİ**

**KAHRAMANMARAŞ**

**TEMMUZ 2013**

**KSÜ  
TIP FAKÜLTESİ**

**UW(UNİVERSİTY OF WİSCONSİN) VE HTK(HİSTİDİN-TRİPTOFAN-  
KETOGLUTARAT) PREZERVASYON SOLUSYONLARI ÜZERİNE SİLYBUM  
MARİANUM'UN ETKİLERİ**

**DR.NAZMİ ÖZER  
UZMANLIK TEZİ  
GENEL CERRAHİ**

**Bu tez 20/07/2013 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından  
Oy Birliği/Oy Çokluğu ile Kabul Edilmiştir.**

**İmza:.....  
Ertan BÜLBÜLOĞLU  
DANIŞMAN**

**İmza:.....  
İlhami Taner KALE  
ÜYE**

**İmza:.....  
M.Fatih YÜZBAŞIOĞLU  
ÜYE**

**Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.  
Kod No:**

**İmza ve Mühür**

**Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi bilimsel araştırma projeleri  
tarafından desteklenmiştir.**

**Proje No: 2013/3-28D**

**Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan bildirişlerin, çizelge, şekil ve  
fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat eserleri  
Kanunundaki hükümlere tabidir.**

## İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	II
TABLolar .....	IV
GRAFİKLER .....	V
RESİMLER.....	VI
KISALTMALAR .....	VII
TEŞEKKÜR .....	VIII

ÖZET .....	1
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT) .....	2

1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Karaciğer Transplantasyonu.....	4
2.2. İskemi Sırasındaki Hücresel Değişiklikler .....	4
2.3. İskemi ve Serbest Oksijen Radikalleri .....	5
2.4. Antioksidan Maddeler .....	6
2.4.1 Süper Oksit Dismutaz(SOD) .....	7
2.4.2.Katalaz.....	8
2.4.3. Silybum Marianum(Silymarin)(Meryem Ana Dikeni) .....	9
2.4.3.1 Silymarinin Farmokokinetik Özellikleri .....	10
2.4.3.2. Silymarinin Klinik Endikasyonları.....	11
2.4.3.3 Etki Mekanizması.....	11
2.4.3.4. Dozaj/Toksisite.....	13
2.5 Organ Prezervasyonu .....	13
2.5.1 Prezervasyon Prensipleri .....	13
2.5.2 Prezervasyon Hasarı Mekanizması .....	13
2.5.2.1 Preprezervasyon Hasarı .....	13
2.5.2.1.1 Karaciğerin Yapısı .....	14
2.5.2.1.2 Beyin Ölümünün Etkileri .....	14
2.5.2.1.3 Organ Çıkarılması Sırasında Gelişen Hasar .....	14
2.5.2.2 Soğuk Prezervasyon Hasarı .....	14
2.5.2.2.1 Soğukun Etkileri .....	14
2.5.2.2.2 Sinüzoidal Endotelial Hücre Hasarı .....	15
2.5.2.3 Sıcak İskemi Hasarı .....	15
2.5.2.4 Reperfüzyon Hasarı .....	16
2.5.2.4.1 Trombositler .....	16
2.5.2.4.2 Lökositler .....	16
2.5.2.4.3 Endotelial Hücre Apoptozisi.....	16
2.5.2.4.4 Efektör Moleküller .....	17
2.5.2.4.5 Sitokinler .....	17
2.5.2.4.6 Proteazlar .....	17
2.5.3 Günümüzde En Sık Kullanılan Prezervasyon Teknikleri .....	17
2.5.3.1 Statik Hipotermik Koruma .....	17
2.5.3.2 Devamlı Perfüzyon ile Saklama .....	17
2.5.4 Prezervasyon Solüsyonları .....	18
2.5.4.1 Histidin-Triptofan-Ketoglutarat (HTK) Solüsyonu .....	18
2.5.4.2 University of Wisconsin (UW) Solüsyonu .....	19

2.5.5. Prezervasyon Solüsyonlarının Kullanımı .....	19
2.5.6. Koruma Süreleri .....	19
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>22</b>
3.1 Araştırma Yeri .....	22
3.2 Araştırma Tipi .....	22
3.3 Anestezi .....	22
3.4 Cerrahi Teknik .....	22
3.5 Deney Tasarımı .....	23
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 Katalaz Ölçümü .....	24
3.7.1.3 SOD(Süper Oksit Dismutaz) Ölçümü .....	26
3.7.1.4 MDA(Malondialdehit) Ölçümü.....	27
3.7.2 Histopatolojik Parametreler.....	28
3.7.2.1. Caspase 3 İmmünohistokimyasal Boyama.....	29
3.7.2.1.1.Caspase-3 Ekspresyonu.....	29
3.7.2.2. Apoptozisin Değerlendirilmesi .....	29
3.7.3. Elektron mikroskobik Parametreler .....	29
<b>4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER .....</b>	<b>31</b>
<b>5. BULGULAR .....</b>	<b>32</b>
5.1 Biyokimya Analiz Sonuçları .....	32
5.1.1 ALT Değerleri .....	32
5.1.2 MDA(Malondialdehit), Cat(Katalaz), SOD(Süperoksit Dismutaz) Sonuçları	36
5.2 Histopatoloji Sonuçları .....	42
5.2.1 Caspase 3 İmmünohistokimyasal Boyama İle Apoptozis Değerlendirilmesi..	42
5.3 Elektron Mikroskopi Sonuçları .....	45
<b>6. TARTIŞMA .....</b>	<b>61</b>
<b>7. SONUÇ .....</b>	<b>66</b>
<b>KAYNAKÇA .....</b>	<b>67</b>

## TABLolar

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

**Tablo-2:** HTK ve UW solüsyonlarının bazı özelliklerinin karşılaştırılması

**Tablo-3:**HTK ve UW solüsyonlarının içerik olarak karşılaştırılması.

**Tablo 4: Grup 1:**UW grubunun 0,6 ve 12 saatlerdeki ALT değerleri, ortalama ve standart sapmaları.

**Tablo 5:Grup 2:**UW+Silymarin grubunun 0,6 ve 12. saatlerdeki ALT değerleri, ortalama ve standart sapmaları

**Tablo 6:Grup 3** HTK grubunun 0,6 ve 12. saatlerdeki ALT değerleri, ortalama ve standart sapmaları.

**Tablo 7:Grup 4** HTK+Silymarin grubunun 0,6 ve 12. saatlerdeki ALT değerleri, ortalama ve standart sapmaları.

**Tablo 8:**MDA(Malondialdehit),CAT(Katalaz),SOD(Süper oksit Dismutaz) 'ın gruplar ve saatlere göre ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri.

**Tablo 9:**Grupların saatlere göre apoptotik hücre sayıları ve grupların kendi arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması.

## GRAFİKLER

**Grafik-1:** Geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz hücre hasarının morfolojik etkileri.

**Grafik-2:** SOR oluşumu ve antioksidan mekanizmaların çalışma

**Grafik 3:**Silymarin yapısındaki bileşenler(Czech academy of science, insitute of microbiology'den alıntıdır)

**Grafik 4:**ALT değerlerine göre grupların kendi aralarında karşılaştırılması. Birimi: IU/L

**Grafik 5:**UW ve UW+S grupları arasındaki MDA(Malondialdehit) değerinin saatlere göre değişimi birim: *nanomol/mg protein*

**Grafik 6:**HTK ve HTK+S grupları arasındaki MDA(Malondialdehit) değerinin saatlere göre değişimi birim: *nanomol/mg protein*

**Grafik 7:**UW ve UW+S grupları arasındaki CAT(Katalaz) değerinin saatlere göre değişimi birim: *ünite/mg protein*

**Grafik 8:**HTK ve HTK+S grupları arasındaki CAT(Katalaz) değerinin saatlere göre değişimi birim: *ünite/mg protein*

**Grafik 9:**UW ve UW+S grupları arasındaki SOD(Süper oksit Dismutaz) değerinin saatlere göre değişimi birim: *ünite/mg protein*

**Grafik 10:**Grupların saatlere göre apopitotik hücre sayıları ve grupların kendi arasında karşılaştırılması.

## RESİMLER

**Resim 1:** Silybum marianum (Meryem ana dikenini) (St. Mary's thistle) .

**Resim 2:** Deney hayvanının hazırlanması

**Resim 3 :** Portal ven kanülasyonu ve perfüzyonu

**Resim 4:**HTK 12.saat grubuna ait caspase 3 immunohistokimyasal boyanma x 400 büyütme.

**Resim 5:** UW 12.saat grubuna ait caspase 3 immunohistokimyasal boyanma x 400 büyütme

**Resim 6:** UW+S 6.saat grubuna ait caspase 3 immunohistokimyasal boyanma x 400 büyütme

**Resim 7:**HTK+S 0.saat grubuna ait caspase 3 immunohistokimyasal boyanma x 400 büyütme

**Resim 8:** Perinuklear aralıkta dilatasyon (ok başları), mitokondriyonlarda dilatasyon ve krista kaybı (oklar). (Mikron bar = 2  $\mu$ m)

**Resim 9:** Hepatosit sitoplazmasında lipid vakuelleri (kısa oklar), hidropik vakuol (yıldız) ve sekonder lizozomlar (uzun oklar). (Mikron bar = 2  $\mu$ m)

**Resim 10:** Hepatosit sitoplazmasında çok sayıda, değişik çaplarda lipid vakuelleri (oklar). (Mikron bar = 2  $\mu$ m)

**Resim 11:** Kupffer hücre sitoplazmasında sekonder lizozomlar (oklar). (Mikron bar = 2  $\mu$ m).

**Resim 12:** Hepatositlerde (oklar) ve sinuzoid endotelinde (yıldız) nekrotik dejenerasyon. (Mikron bar = 3  $\mu$ m).

**Resim 13:** Hepatositlerde minimal düzeyde intrasellüler ödem (yıldızlar). (Mikron bar = 2  $\mu$ m)

**Resim 14:** Hepatositlerde minimal düzeyde intrasellüler ödem (yıldızlar) ve dilate bir mitokondriyon (ok). (Mikron bar = 2  $\mu$ m).

**Resim 15:** Normal ultrastrüktürde hepatosit ve safra kanalikülü (ok). (Mikron bar = 2  $\mu$ m).

**Resim 16:** Normal ultrastrüktürel yapıda hepatosit. (Mikron bar = 2  $\mu$ m).

**Resim 17:** Normal ultrastrüktürel yapıdaki hepatositlerin sitoplazmasında küçük lizozomlar (oklar). (Mikron bar = 2  $\mu$ m).

**Resim 18:** Normal ultrastrüktürel yapıdaki hepatositlerin sitoplazmasında küçük lizozomlar (oklar). (Mikron bar = 3  $\mu$ m).

**Resim 19:** Hepatosit sitoplazmasında lipid vakuelleri (oklar). (Mikron bar = 2  $\mu$ m).

**Resim 20:** Normal ultrastrüktürel yapıda hepatosit. (Mikron bar = 2  $\mu$ m).

**Resim 21:** Hepatosit sitoplazmasında perinuklear alanda minimal düzeyde intrasitoplazmik ödem (yıldızlar). (Mikron bar = 2  $\mu$ m).

**Resim 22:** Normal ultrastrüktürel yapıda hepatosit, Disse aralığı (yıldızlar) ve sinuzoid endotel hücresi (ok). (Mikron bar = 2  $\mu$ m).

## KISALTMALAR

**UW:** University of Wisconsin  
**HTK:** Histidin-Triptofan-Ketoglutarat  
**UW+S:** University of Wisconsin+Silymarin  
**HTK+S:** Histidin-Triptofan-Ketoglutarat+Silymarin  
**ADP:** Adenosin difosfat  
**AMP:** Adenosin monofosfat  
**PNF:** Primer non-fonksiyon  
**NAD:** Nikotinamid adenin dinükleotit  
**NO:** Nitrik oksit  
**Na:** Sodyum  
**K:** Potasyum  
**Ca:** Kalsiyum  
**Zn:** Çinko  
**Cu:** Bakır  
**SMA:** Süperior mezenterik arter  
**VCI:** Vena kava inferior  
**SOR:** Serbest Oksijen Radikalleri  
**SOD:** Süperoksit Dismutaz  
**NADPH:** Nikotinamid-adenosin dinükleotid fosfat  
**KCFT:** Karaciğer fonksiyon testi  
**SEC:** Sinüzoidal endotelial hücre  
**MMP:** Matriks metalloproteinazlar  
**TNF- $\alpha$ :** tümör nekroz faktör- $\alpha$   
**TGF:** Tümör growth faktör  
**ICAM-1:** İntrasellüler adezyon molekül  
**IL:** İnterlökin  
**ALT:** Alanin aminotransferaz  
**AST:** Aspartat aminotransferaz  
**ALP:** Alkalen fosfataz  
**GGT:** Gama glutamil transferaz  
**SOD:** Süper oksit dismutaz  
**MDA:** Malondialdehit  
**CAT:** Katalaz



## **TEŞEKKÜR...**

Asistanlık eğitimim süresince her zaman bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve sıkıntıya düştüğüm durumlarda yardımlarını esirgemeyen sevgili hocalarım , sayın üstadlarım Prof. Dr. İlhami Taner KALE'ye , Prof. Dr. Fikret EZBERCİ'ye , Prof. Dr. Ertan BÜLBÜLOĞLU'na ve Doç. Dr. Mehmet Fatih YÜZBAŞIOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Araştırma çalışmam boyunca bana destek ve özverisini esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım Prof.Dr. Ertan BÜLBÜLOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim. Yine bu çalışmam sırasında emeklerini ve yardımlarını bir an olsun esirgemeyen Doç. Dr. Harun ÇIRALIK ,Yard.Doç.Dr. Hamide SAYAR,Doç.Dr. Ergül Belge KURUTAŞ'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 boyunca beraber çalıştığımız genel cerrahi asistan grubuma ve Dr. Onur PEKER'e teşekkür ederim.

Karanlık ve sıkıntılı günlerin ardından aydınlık ve güzel şafakların geleceğini, ülkemin yarınlarındaki karanlıkları aydınlatan bir sağlık neferi olmamı hayatı boyunca tavsiye ve temenni eden, bugünleri gelmemin en büyük sebepleri olan babam Bestami ÖZER, sevgili annem Zeynep ÖZER'e ayrıca bana her türlü sıkıntıda sırt verip ,zor günlerimde sığınak olan sevgili eşim Dr. Tuğba ÖZER' e teşekkür ederim

**Dr.Nazmi ÖZER**

## **ÖZET**

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

Yapacak olduğumuz çalışmada hepatoprotektif,antioksidan,kologog,antidepresan ve daha birçok yararlı etkileri olan silybum marianum(Meryem ana dikenini) 'un prezervasyon solüsyonları üzerine olan etkilerini inceledik.

Çalışmada, ortalama ağırlıkları 300–350 gram ağırlığında, 32 adet Wistar albino ırkı, erişkin erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar, optimum laboratuvar koşullarında, (22±2°C oda sıcaklığı,12 saatlik aydınlık / karanlık periyodu) polikarbon kafeslerde tutulup, standart kuru peletler halindeki sıçan yemi (Purina®) ile beslendi.Ratlar her biri 8 tane hayvan içeren 4 gruba ayrıldı.Grup 1:UW grubu,Grup 2:UW+Silymarin grubu Grup 3:HTK grubu,Grup 4:HTK+Silymarin grubu olarak belirlendi. 2. ve 4. gruptaki ratlar hepatektomi öncesi,1 hafta boyunca orogastrik tüp ile 200 mg/kg Silybum marianum(silymarin)( Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), ile beslendi.

Operasyon öncesi hayvanların anestezisi için, 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar® Eczacıbaşı Warner-Lambert ilaç sanayi, Levent, İstanbul) ve 10 mg/kg xylazine hidroklorit (Rompon® Bayer, Şişli, İstanbul) aseptik şartlarda intraperitoneal olarak verildi.

6 saat açlık sonrası,anestezi alan ratların, insizyon sahası traşlanarak. Povidon iyot ile cilt antisepsisi sağlandıktan sonra orta hat insizyonu tercih edilerek, laparotomi yapıldı, ince barsaklar karın dışına alınıp, portal pedikül tanımlandı.Abdominal aorta trunkus çölyakusun üstü ve SMA altından bağlanıp,VCI'da hepatik ven dallarının öncesinden bağlanarak,karaciğerin arteriyel ve venöz dolaşımı kesildi.Daha sonra karaciğer perfüzyonu amacı ile portal ven kanülize edilerek Grup 1 ve 2, +4°C'deki UW solüsyonu ile,grup 3 ve 4 ise +4°C'deki HTK solüsyonu ile hepatik venden berrak sıvı gelene kadar yıkandı, ardından hepatektomi yapıldı. Hepatektomi sonrası ratlar yüksek doz anesteziklerle sakrifiye edildi. Hepatektomi yapıldıktan sonra karaciğer dokuları, içinde yıkandığı prezervasyon solüsyonu(UW ve HTK) bulunan torbalara konulup, torbalar içi buz dolu saklama kaplarına yerleştirildi.

Perfüze edilen karaciğerlerden,biyokimyasal inceleme için 0, 6 ve 12. saatlerde karaciğer biopsileri ve karaciğer dokusunun içinde saklandığı solüsyonlardan biyokimya tüpüne sıvı örnekleri, histopatolojik inceleme için 0, 6 ve 12. saatlerde karaciğer biopsileri ve elektron mikroskopik değerlendirme için 6.saatte karaciğer biopsileri alındı.

Bu bilgiler ışığında Biyokimyasal,immunohistokimyasal(histopatolojik),elektron mikroskopik incelemeler sonucunda HTK ve UW solüsyonlarına silymarin eklenmesi ile hücresel hasarın azaldığı ve incelenen gruplar arasında en etkin grubun HTK+Silymarin grubu olduğu saptandı.

**Anahtar Kelimeler:**Silybum Marianum,HTK,UW.

## **ABSTRACT**

In all organ transplant programs ,as well as liver transplantation, either live or cadaveric organ preservation,described the preservation solutions such as Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate (HTK) and University. of. Wisconsin (UW),it's used for the long term storage and decreased the meantime hepatocytes ischemia-reperfusion injury.

In this study, which will be hepatoprotective, antioxidant, cologog, antidepressants and many more beneficial effects of Silybum marianum (Virgin Mary thistle) 's examined the effects of preservation solution.

In this study, the average weight of 300-350 grams, 32 Wistar albino adult male rats were used. Animals optimal laboratory conditions ( $22 \pm 2$  ° C room temperature, 12-hour light / dark cycle) kept in polycarbonate cages and feeding standard dry rat chow pellets (Purina ®).Rats divided into 4 groups, each containing 8 animal. Group 1: UW group, Group 2: UW + Silymarin group, Group 3: HTK group, Group 4: HTK + silymarin group, respectively. 2 and 4 Rats in groups before partial hepatectomy, fed by orogastric tube, for 1 week with 200 mg / kg of Silybum marianum (silymarin) (Sigma Chemical Co. St.Louis, MO, USA).

Anesthetize the animals before the operation, 50 mg / kg ketamine hydrochloride (Ketalar ® Eczacıbaşı Warner-Lambert pharmaceutical industry, Levent, Istanbul) and 10 mg / kg xylazine hydrochloride (Bayer ® Rompo, Şişli, Istanbul) was administered intraperitoneally under aseptic conditions.

6 hours after a fasting period, the rats were anesthetized,trimming the incision area. After obtaining skin antisepsis with povidone-iodine midline incision is preferred laparotomy was performed, and small intestines taken out of the abdomen,after that define the portal pedicle.Abdominal aorta looping the top of the trunkus celiacus and bottom of the SMA, VCI looping before connecting the branches of the hepatic vein, close down the hepatic arterial and venous circulation.Cannulising of portal vein for the liver perfusion .After that group 1 and 2 with UW solution at  $+4$  ° C,groups 3 and 4 with HTK solution at  $+4$  ° C washed to the hepatic vein,until coming to the clear liquid, and then hepatectomy was performed.Rats were sacrificed with high dose anesthetics after hepatectomy. After hepatectomy liver tissues, bathed in the preservation solution (UW and HTK) placed and the bags, bags full of ice placed in storage containers.

In perfused liver, giving the liver biopsies and solutions in 0,6 and 12.hours for biochemical examination,giving the liver biopsies in 0,6 and 12.hours for Histopathological examination,and giving in 6.hours, liver biopsies for electron microscopic examination

In light of this biochemical and immunohistochemical (histopathological), electron microscopic studies;cellular damage decreased as a result of addition silymarin of HTK and UW solutions, and in all groups HTK + Silymarin group was found to be the most active group.

**Key Words:** Silybum Marianum, HTK, UW.

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

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

Amaç, alınan organın nakil(transplantasyon) işlemi gerçekleşene kadar fonksiyonlarının ve hücre bütünlüğünün korunmasını sağlamaktır[1, 2]. Prezervasyon kadavra kaynaklı organlarda beyin ölümü tanısının konulması, canlı donör kaynaklı organlarda ise donörün ameliyatı esnasında başlar ve alıcıda vasküler anastomozlar tamamlanıp organın fonksiyon görmeye başladığı ana kadar devam eder . Organ prezervasyonundaki 3 temel amaç;

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

Hücresel iskemi ile mitokondri, nükleus, endoplazmik retikulum, lizozom ve stoplazmik membran gibi organellerde yapısal değişiklikler meydana gelir. Bu değişikliklerin geri dönüşümlü olup olmadığının saptanması oldukça güç olmakla birlikte, mitokondri ve hücre zarındaki zedelenmelerin genellikle geri dönüşümsüz olduğu bildirilmektedir. Transplante karaciğerde primer nonfonksiyon (PNF) gelişimi üzerine en önemli faktör prezervasyon hasarıdır [3]

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

*Silybum marianum* (deve diken) günümüzde karaciğer hastalığı tedavisinde en çok araştırılmış bitkidir. Bu bitkinin aktif bileşenlerinin tümüne silymarin adı verilmektedir. Silymarinin bileşenlerinin yapısı 1960'lı yıllarda tanımlanmıştır. Silymarini % 70-80 flavonolignanlar ve % 20-30 oranında tanımlanmamış polifenolik bileşenler oluşturur. Silymarinin doğal bileşenlerinden olan silybin en etkili olandır ve silymarinin % 80'ini oluşturur. Bunun dışında isosilybin, silychristin ve silydianin diğer bileşenlerdir [4]. Silybum tohumları kanıtlanmış hepatoprotektif etkinliğe sahiptir[4]

Bu çalışmada; UW ve HTK'nın prezervasyon etkisine, hepatoprotektif bir ajan olan silymarin'in katkısı değerlendirildi.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Karaciğer Transplantasyonu

İlk olarak Welch tarafından köpekler üzerinde yapılmış ve ardından, T.Starzl tarafından 1963 yılında ,insanda, ilk karaciğer nakli gerçekleştirilmiştir. Fakat başarılı sonuçların alınabilmesi ancak siklosporin gibi immünsupresif ajanların kullanıma girmesiyle sağlanabilmiştir.Türkiye’de ilk kadavradan ortotopik karaciğer transplantasyonu 1988 yılında, Prof.Dr. M.Haberal tarafından yapılmıştır[2]. Günümüzde kronik karaciğer hastalığı başta olmak üzere, akut karaciğer yetmezliği, karaciğer tümörleri, metabolik karaciğer hastalıkları ve bazı parazitik hastalıkların tedavisinde karaciğer transplantasyonu etkin bir tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır. Transplantasyon endikasyonları belirlenirken çeşitli prognostik sistemlerden yararlanılır[5]

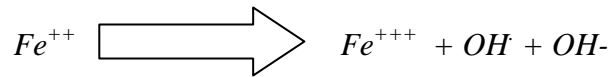
### 2.2. İskemi Sırasındaki Hücresel Değişiklikler

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

1. Hücrenin iyon dengesini koruyan  $Na^{++}-K^{+}$  ATP’az ve  $Ca^{++}-Mg^{++}$  ATP’az pompalarının çok yavaşlamasına neden olur. $Na^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $H_2O$  ve  $Cl^{-}$  hücre içine girerken,  $K^{+}$  ve  $Mg^{++}$  hücre dışına çıkar. Sonuçta **hücre sel şişme** başlar ve membranolitik bir enzim olan fosfolipaz A enzimi aktive olur.

2. Anaerobik glikolizin artışına bağlı olarak hücre içi laktat düzeyi artar ve hücre içi pH düzeyi düşer. Bu durumda, lizozomal membranların dayanıklılığı azalır ve litik enzimler sitoplâzmaya boşalarak yıkıma neden olur.

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

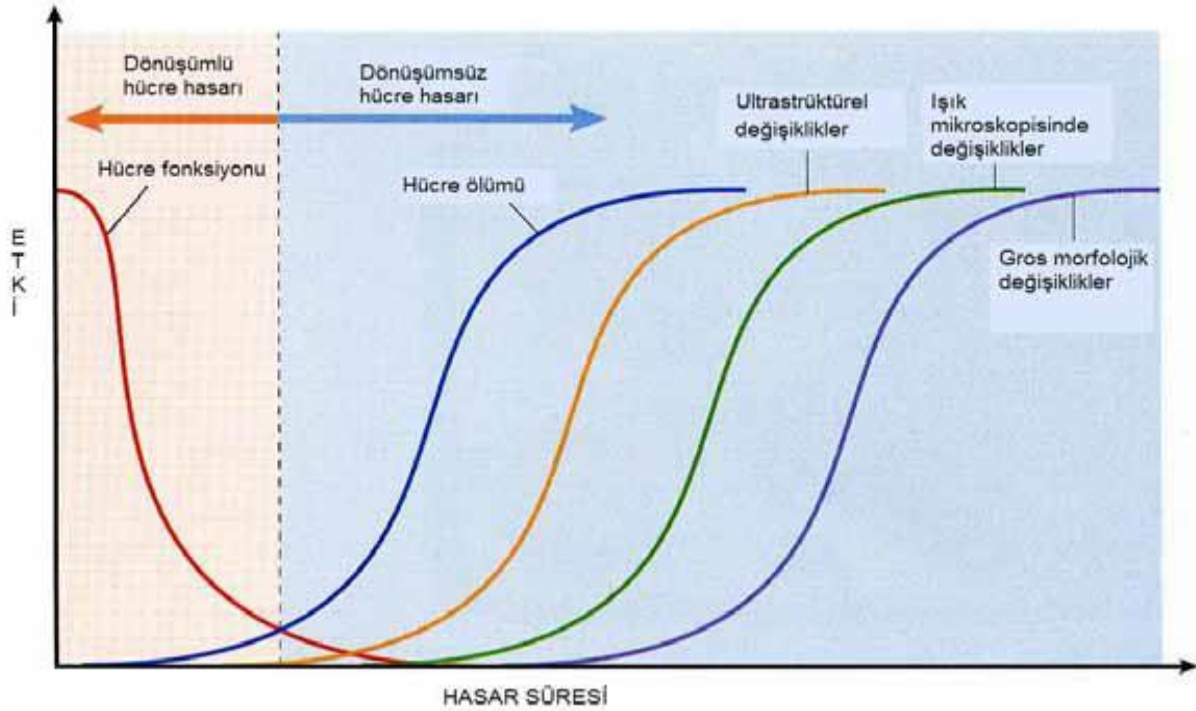


İskemi döneminde, ATP’nin fazla oranda katabolize olması sonucu hücrede hipoksantin miktarı artmaktadır. Normalde ksantin oksidoredüktaz enzimi, hipoksantin ksantine ve daha sonra ürik aside dönüşümünü katalizler. Ksantin oksidoredüktaz, normal şartlarda dehidrogenaz formundadır ve enzimatik aktivitesinde, kofaktör olarak okside nikotinamid adenin dinükleotit ( $NAD^{+}$ ) yer alır. Hipoksik koşullarda, enzimin dehidrogenaz formu oksidaz formuna dönüşmektedir. Enzimin oksidaz formu, aktivitesi sırasında elektron alıcısı olarak  $NAD^{+}$  yerine moleküler oksijeni kullanmakta, bunun sonucu olarak da süperoksit anyon radikali ve hidrojen peroksit üretimine yol açmaktadır. [6, 7]. Bu enzimatik değişim, “serbest oksijen radikallerine (SOR) bağlı reperfüzyon hasarı” hipotezinin temelidir. Bu safhada oluşan

SOR'leri hücre membran lipidlerinde peroksidasyonlara yol açarak, başta malondialdehit olmak üzere birçok sitotoksik ürün oluşumuna neden olur.

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

Hücrede hasarı, elektron mikroskopunda, ışık mikroskopuna göre daha erken saptanabilir. Örneğin, miyokard hücresinin öldüğü, elektron mikroskopu ile 2-3 saatte belli olurken, ışık mikroskopu ile ancak 6-12 saatte görülebilir (**Grafik-1**).



**Grafik-1:** Geridönüşümlü ve geridönüşümsüz hücre hasarının morfolojik etkileri.

Ultrastrüktürel değişimlerin (elektron mikroskopik) ışık mikroskopisine göre daha erken başladığı görülmektedir ( Robbins Basic pathology 7'th edition'dan alınmıştır).

### 2.3. İskemi Ve Serbest Oksijen Radikalleri

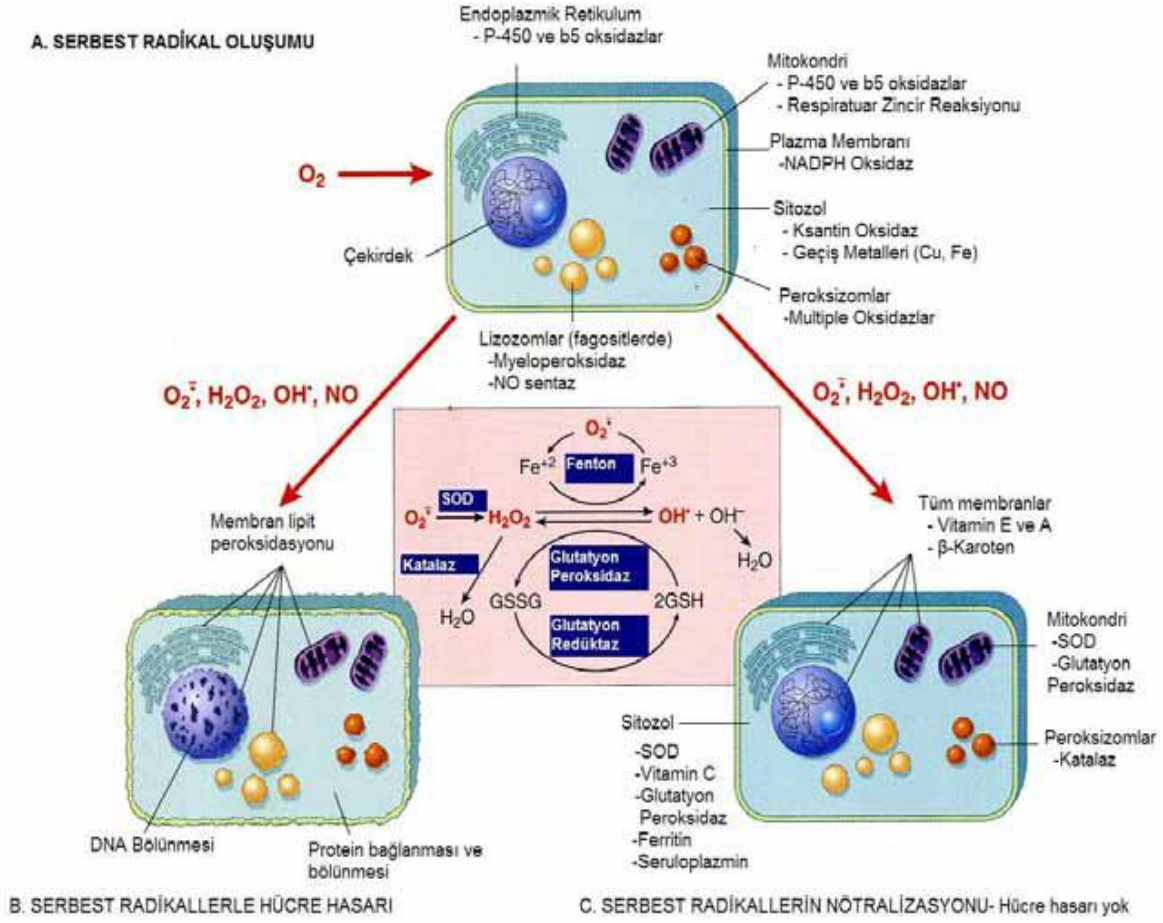
Moleküler oksijenin, hücre içinde oksidatif enzimler tarafından indirgenmesi ile serbest oksijen radikalleri( SOR) oluşur. SOR'leri, yörüngelerinde çift olmayan elektronları bulunduran kararsız moleküllerdir. Kimyasal olarak anstabil dirler ve hızla reaksiyona girerler. Nükleik asit ve membran lipidlerinin yıkılmasına sebep olurlar. Yine serbest radikalle reaksiyona giren hücre içi moleküller de, kararsız bileşik haline dönüp zedelenmeye sebep olurlar. En önemli serbest oksijen radikalleri, süperoksit ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil iyonları(OH) ve nitrik oksit (NO)'tir. Süperoksit radikali, normal hücre metabolizmasında, mitokondrial, endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport işlemleri sırasında oluşan bir ara üründür. İskemik koşullarda ise, hipoksantin ve ksantin katabolizması sırasında ksantin oksidaz enziminin

katalize ettiği bir reaksiyonla oluşur [6-8]. Süperoksit radikalinden, süperoksit dismutaz (SOD) enziminin katalizlediği reaksiyonla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşur. Hidrojen peroksit, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin katalize ettiği reaksiyon ile, H<sub>2</sub>O ve CO<sub>2</sub>'e dönüştürerek inaktive edilir. SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz, serbest oksijen radikallerine karşı organizmanın en önemli savunma elemanlarıdır. SOR aracılığıyla oluşan lipid peroksidasyonu, hücre membranı disfonksiyonu da, hücre şişmesi ve hücre ölümü ile sonuçlanır. Malondialdehit, lipid peroksidasyonunda bir son üründür ve oksidatif hasarın düzeyini göstermede kullanılır.[9] Plazma MDA ve doku MDA seviyeleri serbest radikallerin bir indikatörü olarak ölçülür.[9],lipid peroksidasyonu stoplazmik membranda hasar ve geçirgenlik artışına yol açarak hücre içinde aşırı kalsiyum birikmesine yol açar. Oluşan hücre membran disfonksiyonu da, hücre şişmesi ve hücre ölümü ile sonuçlanır[10].

#### **2.4. Antioksidan Maddeler**

Hücreyi serbest radikallere karşı koruyan ve onları nötralize eden maddelerdir. Prezervasyon hasarı sürecinde gelişen hücre içi serbest radikalleri, bu maddeler ile ortadan kaldırılabilir. Bunların çoğu endojen kaynaklı iken, bir kısmı ekzojen kaynaklıdır.

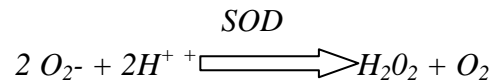
En sık üzerinde çalışılan antioksidanlar: triptofan, histidin, glisin, transferin, ferritin, laktoferrin,seruloplazmin, askorbik asit, E vitamini, A vitamini, çinko, selenyum, manganez,asetilsistein-karbosistein, alfa glutatyon-s-transferaz, allopurinol, glutatyon peroksidaz,katalaz, süperoksit dismutazdır [11, 12] (**Grafik-2**).



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

### 2.4.1. Süperoksit Dismutaz(SOD)

Süperoksit dismutaz 1968 yılında oksijenli solunum yapan canlılarda belirlenmiştir. Bu enzim; süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Hidrojen peroksit daha sonra glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimi aracılığı ile etkisiz hale getirilmektedir. Hücre bölünmelerindeki süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir rol oynar[13].



İnsanda SOD'nin iki tipi bulunmaktadır. Bunlar, sitozolde bulunan dimerik, Cu (bakır) ve Zn(çinko) ihtiva eden izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn(mangan) ihtiva eden izomerlerdir (Mn SOD). Genel olarak hücrede bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD' dir[14].



Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder.

SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO<sub>2</sub> artışı ile artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde hücre içi süperoksit düzeyi düşük tutulur. SOD'nin hücre dışı aktivitesi çok düşüktür.

SOD fagosite edilmiş bakterilerin hücre içinde etkisiz hale getirilmesinde de rol oynar. Bu yüzden SOD, granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de granülositlerden daha fazla miktarda SOD bulunmaktadır. SOD enziminin yüksek katalitik aktivitesi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez. Ancak çeşitli patolojik durumlarda süperoksit yapımının artması durumunda, süperoksite özgü tepkimeler görülmeye başlar.

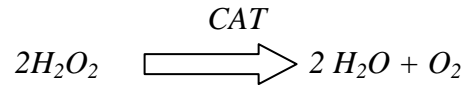
Süperoksit metal iyonlarını indirgeyerek bağlı oldukları proteinlerden salınımına neden olur, kofaktörlerin oksidasyon düzeylerini bozar, metal iyonlarının katıldığı hidroksil radikali yapım tepkimelerini hızlandırır. Diğer radikallere göre daha az reaktif olsa da, süperoksit, indirgenmiş nükleotidleri, bazı amino asitleri ve antioksidan bileşikler (glutasyon, askorbik asit, tokoferol) oksitler.

Süperoksit, hücre zarlarının hidrofobik ortamlarında daha uzun ömürlü ve çözünürlüğü daha fazladır. Zar fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri daha asidiktir ve süperoksit burada daha kolayca bir proton alarak hidrojen peroksit radikalini (HO<sub>2</sub><sup>-</sup>) oluşturur. Bu radikal de çok reaktif olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir.

#### 2.4.2.Katalaz(CAT)

Katalaz 4 tane hem grubu bulunduran hemoproteindir. Her alt birim ayrıca bir molekül NADPH içerir. Bu molekül enzimin kararlılığında rol oynamaktadır. Enzim sitokrom sistemi içeren tüm oksijenli solunum yapan hücrelerde mevcuttur. Katalaz esas olarak peroksizomlarda olmak üzere endoplazmik retikulum ve sitozolde yoğunudur. Aktivitesi; karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde yüksektir.

Görevi, hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır. Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak; bu enzim bir molekül hidrojen peroksiti elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir[15]



Katalazın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ve metil, etil gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmez[16].

### 2.4.3. Silybum Marianum(Silymarin)(Meryem ana dikeni)

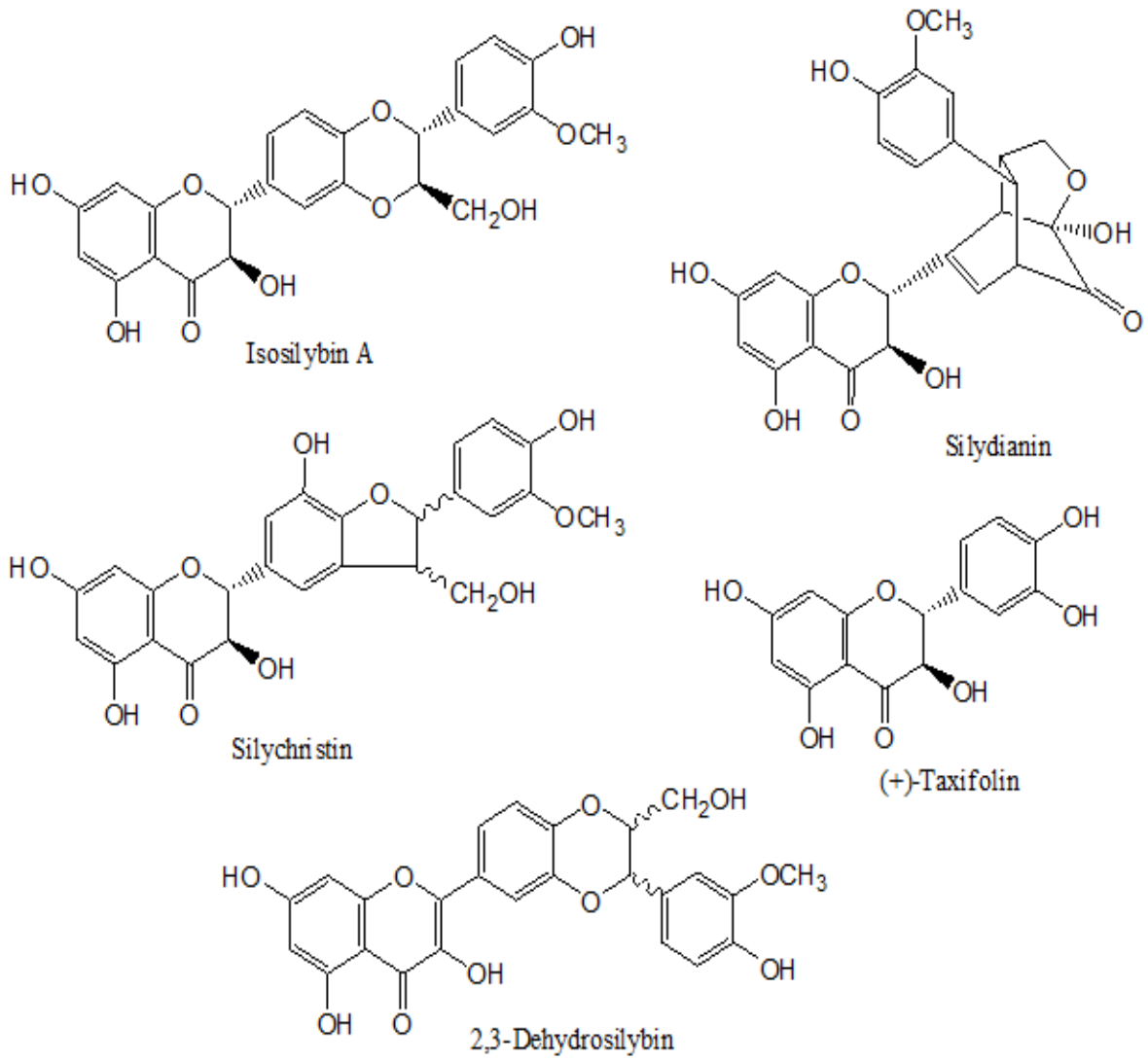


**Resim 1:** Silybum marianum (Meryem ana dikeni)( St. Mary's thistle) .

*Silybum marianum* (Meryem ana dikeni) *Asteraceae* familyasına ait bir bitkidir. Tohumları karaciğer ve safra kesesi hastalıkları ile toksin zehirlenmelerine karşı karaciğeri korumada; aynı zamanda mantar zehirlenmeleri, yılan sokması, böcek ısırıkları gibi durumların tedavisinde de yaklaşık 2000 yıldır kullanılmaktadır, günümüzde karaciğer hastalıklarının tedavisinde en çok araştırılmış bitkilerden bir tanesidir. Bu bitkinin aktif bileşenlerinin tümüne *silymarin* adı verilmektedir.

Silymarinin bileşenlerinin yapısı 1960'lı yıllarda tanımlanmıştır;

Silymarini % 70-80 flavonolignanlar ve % 20-30 oranında tanımlanmamış polifenolik bileşenler oluşturur. Silymarinin doğal bileşenlerinden olan silybin en etkili olandır ve silymarinin % 80'ini oluşturur. Bunun dışında isosilybin, silychristin, taxifolin, dihidrosilybin ve silydianin diğer bileşenlerdir[17]. Silybum tohumları kanıtlanmış bir hepatoprotektif madde olan betaine ve esansiyel yağ asitleri de içerir. Bu maddeler silymarinin antiinflamatuvar etkisine katkıda bulunmaktadır.



**Grafik 3:**Silymarin yapısındaki bileşenler(Czech academy of science,insitute of microbiology'den alıntıdır)

#### 2.4.3.1. Silymarinin Farmokokinetik Özellikleri

Silymarin suda çözünmez, bu nedenle bitkisel çay olarak tüketilememektedir. Standart kapsüllenmiş bitki ekstresi olarak kullanılır. Oral alımı sonrası emilim nispeten az olup, yapılan çalışmalarda ratlarda oral uygulamadan 24 saat sonra safrada %2-3 oranında tespit edilmiştir. Hayvanlarda ve insanlarda oral alımı takiben pik plazma konsantrasyonuna 4-6 saat sonra ulaşılır[4]. Vücuttan atılımı esas olarak safra yolu ile, az bir kısmı da böbrekler yolu ile olmaktadır. Yarılanma ömrü 6-8 saattir [4]

### 2.4.3.2. Silymarinin Klinik Endikasyonları

Silymarinin klinikte en önemli kullanım alanı Amanita mantar zehirlenmesidir. Amanita genusuna ait mantarlar Avrupa ve Kuzey Amerika'da yaygın olarak bulunmaktadır. Bu genusta aşırı toksik pek çok mantar cinsi bulunmaktadır. Amanita mantarları amanitin ve phalloidin adı verilen çok güçlü hepatotoksinler içermektedir. Bu mantarların yanlışlıkla alımına bağlı her yıl Amerika ve Avrupa'da ortalama 60 zehirlenme vakası olmakta ve mortalite % 30 olarak bildirilmektedir[18].

Farelerde silymarinin Amanita zehirlenmesinden hemen önce veya 10 dakika içinde uygulanması karaciğer toksitesini %100 engellemiştir. Silymarinin ilk 24 saat içinde uygulanması ağır karaciğer hasarı ve ölümü engellemiştir [19]. Köpeklerde yapılan bir çalışmada silymarinin belirgin hepatoprotektif etkisi karaciğer enzimleri ve karaciğer biyopsisi üzerinde gösterilmiştir.

Silymarinin hepatoprotektif etkisi insanlarda amanita toksini maruziyeti sonrası defalarca gösterilmiştir. Silymarin ile tedavi edilen 18 hasta serisinde, 1 hasta hariç tüm hastalar hayatta kalmıştır. Silymarinin *Amanita phalloides* mantar alımından 48 saat sonra dahi uygulanması ağır karaciğer hasarını engellemede etkilidir [20]. 1995 yılında yayınlanmış bir çalışmada 41 mantar zehirlenmesi vakasında silymarin ile tedavi edilen grupta ölüm olmamıştır[21]. Amanita mantarı zehirlenmesi sonrası tedavi altındayken 3. günde kötüleşen ve intravenöz silybin tedavisi başlanan vakada klinik düzelme gözlemlendiği bildirilmiştir[21].

Silymarinin hepatoprotektif etkisini gösteren pek çok çalışma bildirilmiştir. Bir askeri hastanede karaciğer enzim yüksekliği olan (çoğunlukla alkol alımına bağlı) hastaların 4 haftalık takibinde 420 mg/gün silymarin uygulanmasının karaciğer enzimlerini belirgin olarak düşürdüğü gözlenmiştir. Histolojik incelemede karaciğer biyopsilerinde anlamlı düzelme saptanmıştır[22]. Kronik aktif hepatiti olan 20 hasta ile yapılan bir çalışmada 240 mg/gün silybin-fosfatidilkolin kompleksinin 7 gün uygulanması, serum AST, ALT, GGT, ALP ve total bilirubin düzeylerinde anlamlı düşüş sağlamıştır[23].

Kronik alkolik karaciğer hastalığı olan 36 hasta ile yapılan başka bir çalışmada 6 ay süreyle 420 mg/gün silymarin uygulanması serum AST, ALT, GGT, total bilirubin düzeylerinin normale gelmesini ve karaciğer biyopsilerinde düzelme sağlamıştır. Ayrıca tedavi grubunda prokollajen III (aktif fibrozis markırı) belirgin düşük saptanmıştır [24]

Karaciğer sirozu olan 170 hasta ile yapılan bir Avusturya çalışmasında ortalama 41 ay 420 mg/gün silymarin uygulaması sağ kalım süresini belirgin olarak uzatmıştır (tedavi grubunda %58, plasebo grubunda %39)[25].

Yukarıda belirtilen tüm çalışmalarda silymarinin bir yan etkisi bildirilmemiştir.

### 2.4.3.3 Etki Mekanizması

Silymarinin karaciğer hücrelerine pek çok toksine karşı koruduğu bildirilmiştir; örneğin asetaminofen, etanol, karbontetraklorid ve D-galaktozamin. Ayrıca iskemik hasar, radyasyon, demir toksitesi ve viral hepatitte etkili bulunmuştur [26].

Hepatoprotektif etkilerinde ana mekanizmalar antioksidasyon, anti lipid peroksidasyonu, güçlü detoksifikasyon ve glutatyon azalmasına karşı koruyucu etkileridir[27]. Silymarin lipooksijenaz enzimini inhibe ederek karaciğerden lökotrien oluşumunu engellemektedir[27]. Çalışmalarda ayrıca silymarinin hepatosit protein

sentezini arttırdığı, tümör öncüllerinin aktivitesini azalttığı, mast hücrelerini stabil ettiği, immun fonksiyonları modüle ettiği ve antiinflamatuvar ve antifibrotik etkileri gösterilmiştir[27].

Silymarinin hepatik dokuda rejenerasyonu stimule etmesi hasarlı karaciğerde protein sentezini arttırmasıyla olmaktadır. Hem *in vivo* hem de *in vitro* deneylerde artmış protein senteziyle beraber ribozom oluşumu ve DNA sentezinde belirgin artış bulunmuştur. Artmış protein sentezi sadece hasarlı karaciğerde (parsiyel hepatotektomi) saptanmış, kontrol grubunda gözlenmemiştir [28]. Protein sentezi artış mekanizması bilinmemektedir. Ancak bazı yazarlar silymarinin fizyolojik bir regülatörü taklit ettiğini ve silybinin, polimeraz enzimine bağlanarak ribozom oluşumunu arttırdığını düşünmektedirler. Silymarinin protein sentezini arttırıcı etkisi malign karaciğer dokusunda gözlenmemiştir[28].

Günümüzde non-viral kronik hepatit tedavisinde immunosupresif/antiinflamatuvar ajanlar kullanılmaktadır. Bu ilaçlar hayat kurtarıcı olsa da uzun dönemde ciddi yan etkilere sahiptir. Botanik anti-inflamatuvar ilaçlar güvenli ve etkili alternatif tedavi seçenekleri sunmaktadır. Silymarinin hepatik dokuda belirgin anti-inflamatuvar etkileri pek çok çalışmada gösterilmiştir. Bu etkiler mast hücre stabilizasyonu, nötrofil migrasyon inhibisyonu, kuppfer hücre inhibisyonu, lökotrien ve prostoglandin sentez inhibisyonudur [29]. Karaciğer fibrogenezinde hepatik stellat hücreler merkezi rol oynamaktadır. Bazı fibrotik etkilere cevap olarak proliferer olurlar ve miyofibroblastlara dönüşürler ve bu hücrelerde karaciğerde kollajen liflerin depozisyonundan sorumludur. Silybin ( $10^{-4}$  mol/l konsantrasyonda) izole edilmiş, rat hepatik stellat hücrelerinde proliferasyonu %75 oranında geriletmiştir. Stellat hücrelerinin miyofibroblastlara dönüşümünü ve fibrozis için gerekli ekstraselüler matriks bileşenleri gen ekspresyonunu azaltmıştır[30]. Silymarinin hayvanlarda karaciğer fibrozisini yavaşlattığı ve iyileşme sağladığı gösterilmiştir. Safra yolları total oklüze edilmiş ratlarda inflamasyon olmadan progresif karaciğer fibrozisi gelişmektedir. Silymarin (50 mg/kg/gün) bu fibrozisi kontrol grubuna oranla %30-35 oranında azaltmıştır. Safra kanalı oklüzyonu sonrası sürekli 6 hafta veya sadece son 2 hafta silymarin uygulaması eşit derecede etkili bulunmuştur. Düşük dozda (25/mg/kg/gün) etkili bulunmamıştır[31].

Kolşisin fibroziste makrofaj stimülasyonunu inhibe ederek antifibrotik ve anti-inflamatuvar etki gösterir. Bu etkileri ile karaciğer fibrozisini engellemede kullanılmıştır ancak ciddi yan etki profiline sahiptir. Silymarin karbon tetraklorid ile ratlarda oluşturulan karaciğer fibrozis çalışmasında kolşisine benzer derecede etkili bulunmuştur, ayrıca yan etki gözlenmemiştir[32].

Silymarin sitokrom P450 (Faz I) detoksifikasyon sisteminde inhibitör etkiye sahiptir. Farelerde yapılan bir çalışmada silybinin spesifik pek çok P450 enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir[33]. Bu etki Amanita zehirlenmesinde protektif etkilerini açıklayabilir. Amanitin toksini P450 sistemi ile biyoaktif edildikten sonra hepatositler için ölümcül hale gelir. Ayrıca, silymarin ve diğer antioksidanlar P450 enzimleri ile oluşan serbest radikallere karşı koruma sağlarlar. Glukuronidasyon önemli bir Faz II detoksifikasyon yolağıdır. Vücuttan çok sayıda toksinin atılma yolu glukuronidasyon yolağıdır. Toksinler safra ile vücuttan atılmak üzere glukuronik asitle konjuge edilmektedir. Ayrıca östrojen de vücuttan bu yolla atılır. Barsaktaki bazı bakterilerde bulunan beta-glukuronidaz enzimi glukuronik asidi bağlı bulunduğu maddeden ayırır ve enerji kaynağı olarak kullanır. Bu reaksiyonla orijinal madde yeniden gastrointestinal sistem tarafından emilerek kişide yeniden maruziyete neden olur. Silymarinin sağlıklı kişilerde beta-glukuronidaz enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir [34].

Silymarinin karaciğer üzerine immunomodulator etkisi pek çok çalışmada araştırılmıştır. İki Macar çalışmasında silymarinin immün fonksiyon üzerine pozitif etkisi gösterilmiştir. İlk çalışma biyopsi ile kanıtlanmış kronik alkolik karaciğer hastalığı olan hastalarda yapılmış ve bu hastalarda görülen düşük T-hücre sayısı, yüksek CD 8+ hücre sayısı ve artmış lenfosit sitotoksitesisi 6 aylık silymarin uygulaması ile gerilemiştir[24].

İkinci çalışmada 40 alkolik siroz hastasına silymarin, aminoimidazolekarboksamido-fosfat veya plasebo 1 ay süre ile çift-kör olarak verilmiştir. Tedavi gruplarında silymarin serum AST, ALT, GGT ve total bilirubin düzeylerini normale çevirmiş ve lenfositotoksitesiteyi baskılamıştır[35].

#### **2.4.3.4. Dozaj/Toksisite**

Silymarin suda çözünmez, standart kapsüllenmiş bitki ekstresi olarak kullanılır (%70-80 silymarin). Hayvanlarda silymarinin yüksek dozda kısa ve uzun süreli kullanımında herhangi bir yan etki gözlenmemiştir. İnsan çalışmalarında da genelde yan etki saptanmamıştır. Erişkinler için silymarin dozu iki veya üç bölünmüş doz halinde 240-900 mg/kg/gün'dür. Daha yüksek dozlarda (>1500 mg/gün ) silymarinin laksatif ve safra sekresyonunu ve akımını arttırıcı etkisi oluşmaktadır. Hafif alerjik reaksiyonlar bildirilse de, hiç biri tedavi kesilmesini gerektirecek düzeyde olmamıştır [36].

### **2.5. Organ Prezervasyonu**

#### **2.5.1. Prezervasyon Prensipleri**

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

Organ kanlanması kesilmesi yoluyla gelişen iskemik süreçte eğer metabolizma yavaşlatılabilirse, gelişecek olan hücre hasarı da doğru orantılı olarak yavaşlayacaktır. Hücre metabolizmasının yavaşlatılmasında temel faktör **hipotermidir**. 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[37]. Bu yararlı etkilerinin yanında, ATP pompa aktivitesinin bozulmasına da neden olmaktadır. Bunun sonucunda, Na<sup>+2</sup> hücre içine geçerken, K<sup>+</sup> hücre dışına çıkar ve hücre içinde onkotik basınç artar, hücre içine su çekilir, hücre şişer ve hücre ölümü meydana gelir[37].

#### **2.5.2. Prezervasyon Hasarı Mekanizması**

##### **2.5.2.1. Preprezervasyon Hasarı**

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

### **2.5.2.1.1. Karaciğerin Yapısı**

En çok görülen nedenleri, obeziteye bağlı steatoz, alkol veya ilaç kullanımına bağlı hepatitin yol açtığı hasarlardır. Steatoz, hepatositlerde ve sinüzoidal hücrelerde soğuk prezervasyon hasarını artırır. İlaç veya çok miktarda alkol kullanımı ölüm nedeni olabilir. Bu nedenlerle potansiyel toksik karaciğer hasarı göz önünde bulundurulmalıdır. Potansiyel donörleri değerlendirirken, hikâye, fizik muayene, ilaç toksisite testleri, karaciğer fonksiyon testleri (KCFT) ve karaciğer biyopsisi, daha önceden var olabilecek, olası bir karaciğer hasarını elimine etmek için kullanılır[38, 39]

### **2.5.2.1.2. Beyin Ölümünün Etkileri**

Beyin ölümüne neden olan travma, genellikle hipotansiyon ve hipoksiye neden olur. Özellikle, uzun süre yoğun bakım ünitelerinde yatmış olan potansiyel donörler, hepatik glukojenasyon ve diğer negatif nutrisyonel etkilere maruz kalmış olabilirler. Glikojen depoları tükenen karaciğer dokusunun ise sıcak iskemiye olan toleransı azalır [40].

### **2.5.2.1.3. Organ Çıkarılması Sırasında Gelişen Hasar**

Ameliyat süresince gelişen hasarın en önemli nedeni hipotansiyondur. Organları kabul edilen donörlerin üçte birinde, organ çıkarılması sırasında alınan karaciğer biyopsilerinde sinüzoidal endotelial hücrelere yapışmış trombositlerin neden olduğu pre prezervasyon hasarı görülür. Bu tip hasarın derecesiyle, implantasyon sonrası gelişen organ disfonksiyonu arasında ilişki olduğu gösterilmiştir[40, 41].

### **2.5.2.2. Soğuk Prezervasyon Hasarı**

Soğuk prezervasyon, organ korunması için standart metoddur. Karaciğerde metabolik aktiviteyi azaltabilmek için solüsyonun ısısı 0–4°C arasında tutulur, böylece organın enerji ihtiyacı azalmış olur. Sıcaklıktaki her 10°C'lik azalma ile metabolik aktivite 1,5-2,5 kat azalır. Sıcaklığın enzimatik aktiviteye etkisi ise değişkendir. Örneğin, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP-az ve Ca<sup>2+</sup>-ATP-az enzimleri 20 °C'nin altında tamamen inhibe olurlarken, bazı proteazlar 1°C'de bile fonksiyonlarını sürdürebilirler [42].

#### **2.5.2.2.1. Soğukun Etkileri**

Metabolik ihtiyacı azaltmak için organ soğutulur. Metabolizma yavaşlar, ancak durdurulamaz ve ATP yıkılmaya devam eder. Anaerobik glikolizde ATP üretimi olsa da, ATP kullanımı, üretimini aşar ve sonuçta ATP tükenir. Normalde ATP, ADP ve AMP'den oluşur ama bunu yapabilecek yeterli enerji olmadığı için, ADP ve AMP hücreyi terk ederek adenozine yıkılır. Bu yıkılma evrelerinde ksantin ve hipoksantin üretilir. Ksantin oksidaz enzimi, hipoksik soğuk prezervasyonda aktive olur. Ksantin ve hipoksantin, ksantin oksidaz varlığında oksijenle birleşir ve SOR'nin oluşmasına neden olurlar, bu radikaller ise hücre membranına toksiktir[43]. 20°C'nin altındaki sıcaklık, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP-az pompasının fonksiyon kaybına neden olur. Bu enzimin aktivitesinin bozulması ile hücre içinde düşük, ekstrasellüler sıvıda ise yüksek K<sup>+</sup> konsantrasyonu

oluşur.  $\text{Na}^{++}$  için ise tersi bir durum söz konusudur. Pompa elektrokimyasal bir gradient oluşturur ve hücre içi, hücre dışına göre negatif hale geçer. Pompanın kaybıyla, hücre membranı boyunca  $\text{Na}^{++}$  -  $\text{K}^{+}$  dengesi bozulur ve gradient kaybolur. Prezervasyon solüsyonlarının içeriği, bu istenmeyen etkileri engellemek üzere düzenlenmeye çalışılmıştır[2, 42, 43].

#### **2.5.2.2.2. Sinüzoidal Endotelial Hücre Hasarı**

Birbirinden bağımsız yapılan laboratuvar çalışmalarında, karaciğerin hepatosit dışında kalan hücrelerinin, prezervasyon ve perfüzyon hasarına duyarlı olduğu gösterilmiştir[44].

Yapılan bir çalışmada, spesifik olarak sinüzoidal endotelial hücreler incelenmiş ve prezervasyon sonrası karaciğer hasarının, temelde sinüzoidal endotelial hücre hasarına bağlı olduğuna dair ikna edici kanıtlar elde edilmiştir[44].

Yapılan çalışmalarda ,sinüzoidal endotelial hücrelerde gelişen hasarın önemli nedenlerinden birinin proteazlar olduğu da gösterilmiştir. Bu etkiyi gösteren proteazlar arasında, kalsiyum bağımlı intrasellüler bir enzim olan calpain ve matriks metalloproteinazları (MMP-2 ve MMP-9) sayılabilir[45, 46].

Soğuk, Ca-ATP az'ı da inhibe ederek intrasellüler kalsiyum seviyesini ve buna bağlı calpain aktivitesini artırır. Bu da sonuçta, aktin stres fiberlerinin parçalanmasına neden olur. Aktin stres fiberlerinin parçalanması ise, sinüzoidal endotelial hücrelerden MMP salgılanması ile sonuçlanır. MMP sekresyonu ve aktin parçalanması, hücre yüzeyini aktive ederler ve bunun kanıtı da, artmış Von Willebrand faktör (vWF) ekspresyonu ve hücre yüzeylerine trombosit adezyonunun artmasıdır[44, 47].

Soğukun neden olduğu sinüzoidal endotelial hücre hasarı, zaman içinde dolaşımdaki normal trombosit ve lökositler için reseptör eksprese eden ve koagülasyonu başlatabilen hücrelerin oluşmasına neden olur. MMP sekresyonunun, sinüzoidal endotelial hücre aktivasyon mekanizmasında ve soğuk prezervasyon hasarında ana rol üstlendiği görülmüştür[48-50]

Bu nedenlerle, prezervasyon için kullanılan UW ve HTK solüsyonlarında laktobiyonat ve histidin gibi güçlü birer MMP inhibitörü kullanılmıştır.

#### **2.5.2.3. Sıcak İskemi Hasarı**

Donör karaciğerinin ameliyat sahasına getirilmesi ile başlar ve anastomozlar tamamlanana kadar devam eder. Bu dönemde karaciğer tedrici olarak ısınır ve yeterince perfüze olamaz, yaklaşık 40 dakika sonra karaciğerin merkez sıcaklığı  $2^{\circ}\text{C}$ 'den  $20^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar çıkar. Beraberinde enzim aktivitesi ve metabolik hız artar, geriye kalan glikojen depoları da hızlı bir şekilde tüketilir. Bu sıcaklıklar sinüzoidal endotelial hücrelerden çok hepatositlere zararlıdır. Sıcak iskeminin çok uzun sürmesi, tek başına organ yetmezliğine neden olabilir[51].



#### **2.5.2.4. Reperfüzyon Hasarı**

Herhangi bir tip iskemi sonrası reperfüzyon, karaciğer hasarına neden olur. Hasar, normalde inaktif halde olan lökosit ve trombositlerin aktive olarak endotelyuma yapışmasına ve inflamatuvar mediatörlerin yayılımına bağlıdır. Metabolik olayların yavaş ilerlediği soğuk depolama periyodunun tersine, reperfüzyon periyodundaki olaylar saniyeler ve dakikalar içinde gelişir. Soğuk prezervasyonun uzadığı durumlarda, yaygın trombosit ve beyaz küre adezyonu ve intravasküler tromboz meydana gelir[52].

Alıcıya bağlı faktörlerde, reperfüzyon periyodunun sonucunu etkiler. Örneğin alıcı hipotansif ise, greft reperfüzyonu sırasında diğer organların yanı sıra greftte de sıkıntı yaşanma riski artar. Sistemik inflamatuvar yanıt sendromuna bağlı olarak alıcı kanında aktive trombosit, lökosit ve artmış inflamatuvar mediatörlerin varlığı da hasarı artıran faktörlerdir. Deneysel çalışmalarda, portal venin uzun süre klemplenmesine bağlı olarak barsaklardan endotoksin salınımı olduğu, bunun sonucunda kupffer hücrelerinin aktive olarak tümör nekroz faktör-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) salgıladığı ve sistemik şok benzeri bir tablo oluşturduğu gösterilmiştir[50].

##### **2.5.2.4.1. Trombositler**

Endotelial duvarın aktivasyonu, trombosit adezyon ve aktivasyonuna neden olur. Mekanizma büyük ihtimalle sinüzoidal hücrelerde artmış vWF ekspresyonuna bağlıdır. Aktive olmayan trombositler vWF'e yapışarak endotel hücrelere fikse olur ve aktive hale geçerler[53]. Trombositler, TGF, kalpainler ve diğer toksik metabolitlerin kaynağıdır.

Trombositlerce nitrik oksit üretimi, SOR ve reoksijene olmuş iskemik karaciğerde Peroksi nitrit oluşmasına neden olur. Bu da endotel hücrelerinin apoptozisini başlatır [54-56]

##### **2.5.2.4.2. Lökositler**

Reperfüzyon sonrası lökositler hızlı bir şekilde sinüzoidlere yapışır ve hasara neden olur. Adezyon, artmış ICAM-1(İnterselüler Adezyon Molekül 1)'e bağlı olarak gelişir. Lökositler hücre membranında, NADPH bağımlı oksidaz sistemi ile reaktif oksijen radikali salgılar. Reperfüzyon başladığında ise, aktive olan kupffer hücrelerinden TNF- $\alpha$  ve IL-1 salgınır, buna bağlı olarak lökositlerde CD11-b ekspresyonunu artırır ve sinüzoidlerde lökositlerin toplanması sağlanır. Yapılan çalışmalarda, lökositlerin ve trombositlerin sinerjistik olarak sinüzoidal endotelial hücrelerin apoptozisini indüklediği ve hasarını artırdığı gösterilmiştir [57-59].

##### **2.5.2.4.3. Endotelial Hücre Apoptozisi**

Sinüzoidal endotelial hücre ölümünün mekanizmasının nekroz mu, yoksa apoptozis mi olduğu hala tartışmalıdır. Geçmişte reperfüzyon sonrası endotel hücre ölümünün koagülasyon nekrozuna bağlı geliştiği kabul edilirken, günümüzde apoptozis aracılıklı hücre ölümü daha yaygın olarak kabul edilmektedir. Hepatik prezervasyon ve perfüzyon

hasarında apoptozisin önemi, prezervasyon solüsyonuna antiapoptotik ajanların eklenmesi ile sağlanan protektif etkiler ile anlaşılmıştır[56, 60].

#### **2.5.2.4.4. Efektör Moleküller**

Reperfüzyon hasarında SOR oluşumunun ana kaynağı kupffer hücreleridir. Deneysel çalışmalar, SOR'un soğukta prezerve edilmiş fare karaciğerinin reperfüzyonundan sonra endotelial hücrelerden TNF- $\alpha$  ve IL-10 sekresyonunu artırdığını göstermiştir. Bu sitokinler hasarın önemli mediatörleridir [61].

#### **2.5.2.4.5. Sitokinler**

Sitokinler, karaciğer hücreleri tarafından, en çok kupffer ve sinuzoidal endotelial hücreler tarafından üretilir. En önemlileri TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6'dır. Colletti ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, uzamış iskemik dönemlerin sitokinlerin aşırı salınımına neden olduğu gösterilmiş ve TNF- $\alpha$ 'nın hepatosit ve SEC(sinuzoidal endotelial hücreler) apoptozisini başlattığı görülmüştür. Kupffer hücrelerinden TNF- $\alpha$  salınımının engellenmesi ile soğuk ve sıcak iskemi modellerinde reperfüzyon hasarının azaldığı gösterilmiştir[62].

#### **2.5.2.4.6. Proteazlar**

Kalpain ve kaspas gibi birçok sistin proteazlarının, prezervasyon ve perfüzyon hasarına mediatörlük yaptığı gösterilmiştir. Kalpainler, sitoplazmik non-lizozomal kalsiyum bağımlı sistin proteazlarıdır. Kalpain aktivitesi soğuk iskemide ve reperfüzyon sonrası belirgin bir şekilde hızla artar. Soğuk ve sıcak iskemik hasarda kalpain inhibisyonunun koruyucu etkisi gösterilmiştir. Kalpain inhibisyonu, hem endotel hücrelerde, hem de hepatositlerde doku hasarını azaltır ve sonunda greft fonksiyonu belirgin olarak korunur. Birçok soğuk ve sıcak iskemi modelinde, hepatik iskemi ve reperfüzyon sırasında kaspas inhibisyonunun koruyucu etkisi gösterilmiştir[63].

### **2.5.3. En Sık Kullanılan Prezervasyon Teknikleri**

#### **2.5.3.1. Statik Hipotermik Koruma**

Organ çıkarıldıktan sonra soğuk prezervasyon solüsyonu ile perfüze edilir. Perfüzyon solüsyonu ile birlikte steril bir torbaya konulup 0-4°C arasında saklanır[64, 65].

#### **2.5.3.2. Devamlı Perfüzyon İle Saklama**

Belzer ve arkadaşları tarafından özellikle böbrek prezervasyonunda kullanılmıştır. Özel bir cihazla organa oksijen ve besin maddeleri verilir ve oluşan artıklar uzaklaştırılır[64, 66].

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

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

#### **2.5.4. Prezervasyon Solüsyonları**

Son çeyrek asırda, özellikle A.B.D’de 160–170 değişik koruma solusyonu tanımlanmıştır. Bunlar arasında HTK, UW, Collins, Euro-collins, UW-PEG, Polysol, Kyoto, New Kyoto v.b. sayılabilir. Fakat tüm dünyada en sık kullanılan ve üzerinde çalışmalar yapılan sıvılar, HTK ve UW solüsyonlarıdır[1, 2, 67].

##### **2.5.4.1. HTK Solüsyonu**

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

$K^+$  ve  $Na^{++}$  değerlerinin düşük olması nedeniyle, ilk olarak kalp transplantasyonunda kullanımı yaygınlaşmıştır. Daha hızlı soğutma yapar, 3 kat daha yüksek akım hızına sahiptir. Vizkozitesi düşük (2,0 cp) olduğu için yüksek hacimde ve düşük akım hızında kullanılır (10–12 lt ve 100–175 ml/kg civarında). UW ile kıyasladığında, maliyeti daha

düşük olup flushing tarzı kullanımda hiperpotasemi riski yoktur [68, 69].

Karaciğer prezervasyonunda UW kadar etkin olduğu, yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir[70, 71]. HTK solüsyonu genel olarak, lökosit adhezyonunu düşürür, kapiller permeabiliteyi azaltır, doku oksijenizasyonunu artırır, ATP tüketimini azaltır ve LDH düzeyini artırır.

#### **2.5.4.2. UW Solüsyonu**

UW solüsyonu (ViaSpan Belzer ® , DuPont Pharmaceutical-İrland); Belzer ve arkadaşlarının Wisconsin Üniversitesinde geliştirdiği bir solüsyondur. Serbest radikal önleyici ve ksantin oksidaz inhibitörü olarak, glutatyon ve allopurinol eklenmiştir[72, 73] Laktobiyonatin ve glutatyonun güçlü birer MMP inhibitörü olduğu da gösterilmiştir[74, 75] İçinde ATP gereksinimi için adenosin, interstisyel ödemi önleyici Hidroksi-etil-starch ve pH stabilizasyonu için fosfat iyonu bulunur. Hücre içi ile aynı oranda elektrolit taşıdığı için kardiyotoksiktir ve flushing tarzında kullanımı hiperkalemi riski taşır[76].

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

#### **2.5.5. Prezervasyon Solüsyonlarının Kullanımı**

Organ prezervasyon tekniklerinin temelinde organı kansız hale getirme ve hipotermi sağlama ön plandadır. Kadavradan kaynaklı organlarda ameliyat sırasında, canlı donör organlarda organın çıkarılması ile bu işlemler başlar. Karaciğer, primer olarak UW solüsyonu ile korunur, UW ile 24 saate kadar güvenli prezervasyon sağlanır. Son zamanlarda, HTK'nında UW kadar etkin olduğu gösterilmiştir. Prezervasyonda sağlanan gelişmelere rağmen greft disfonksiyon oranı hala %5 ile %20 arasında değişir[77].

PNF'nin yüksek olmasının nedeni, yetersiz soğuk depolama ve mükemmel solüsyonun henüz bulunmamış olmasıdır. Bu nedenle, soğuk prezervasyon sırasında organ korunmasını arttırmak için yeni stratejiler bulmak kaçınılmaz bir ihtiyaçtır.

#### **2.5.6. Koruma Süreleri**

Organların organizmadan çıkarılması ile birlikte gelişen hücre hasarı ve sonucunda hücre ölümünü önlemek için organların organizmadaki ortamına benzer yapay bir ortam hazırlamak ideal korumanın temelidir. Fakat bu ortamın aynısını oluşturmak için yeni bir organizma yaratmak gerekir ki, bu da mümkün değildir. Bu nedenle, şu ana kadar yaratılan benzer ortamlarda hücre hasarı ve belli bir süre sonra da hücre ölümü gerçekleşmesi önlenememektedir[78]. Hücre hasarı ve ölümünün maksimum süreleri her organ için farklılık göstermektedir. Bu süre kalp ve akciğer için 6, karaciğer için 24, pankreas için 48, böbrek için 72 saat iken, kornea için yaklaşık 1 haftadır.

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

**Tablo–2:** HTK ve UW solüsyonlarının bazı özelliklerinin karşılaştırılması

<b>İÇERİKLER</b>	<b>UW</b>	<b>HTK</b>	<b>ÖZELLİKLER</b>
<b>Osmolarite (mosm/L)</b>	320	310	
<b>Sodyum (mmol/L)</b>	40	15	
<b>Potasyum (mmol/L)</b>	120	10	
<b>Magnezyum (mmol/L)</b>	5	4	Membran Stabilizatörü
<b>Kalsiyum (mmol/L)</b>	-	0.015	
<b>Laktabiyonat (mmol/L)</b>	100	-	Hücrel şişliği engeller, geğirgen olmayan anyon
<b>Sülfat (mmol/L)</b>	5	-	
<b>Fosfat (mmol/L)</b>	25	-	Tampon-pH düzenler
<b>Raffinoz (mmol/L)</b>	30	-	Hücrel şişliği engeller
<b>Adenosin (mmol/L)</b>	5	-	ATP prekürsörü, radikal temizleyici, vazodilatatör
<b>Glutasyon (mmol/L)</b>	3	-	Antioksidan-radikal temizleyici
<b>Allopurinol (mmol/L)</b>	1	-	Ksantin oksidaz inhibitörü, radikal temizleyici
<b>Histidin (mmol/L)</b>	-	198	Antioksidan
<b>Triptofan (mmol/L)</b>	-	2	Membranoprotektif etki
<b>Starch(g/L)</b>	50	-	İntertisyel ödemi azaltır+kolloid
<b>Mannitol (mmol/L)</b>	-	30	Antiödem+Antioksidan
<b>Ketogluterat (mmol/L)</b>	-	1	Membranoprotektif etki

**Tablo-3:** HTK ve UW solüsyonlarının içerik olarak karşılaştırılması

### 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 gram ağırlığında, 32 adet Wistar albino ırkı, erişkin erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar, optimum laboratuvar koşullarında, ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  oda sıcaklığı, 12 saatlik aydınlık / karanlık periyodu) polikarbon kafeslerde tutulup, standart kuru peletler halindeki sıçan yemi (Purina®) ile beslendi. Ratlar her biri 8 tane hayvan içeren 4 gruba ayrıldı. Grup 1: UW grubu, Grup 2: UW+Silymarin grubu, Grup 3: HTK grubu, Grup 4: HTK+Silymarin grubu olarak belirlendi. 2. ve 4. gruplardaki ratlar hepatektomi öncesi, 1 hafta boyunca orogastrik tüp ile 200 mg/kg Silybum marianum (silymarin) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), ile beslendi.

#### 3.2.Araştırma Tipi

Deney protokolü, Sütçü İmam Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı sonrasında Araştırma Kurulu tarafından 2013/3-28D proje numarası ile desteklendi. Deneysel çalışmalar, Sütçü İmam Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde "National Institutes of Health, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" kurallarına uygun olarak gerçekleştirildi.

#### 3.3.Anestezi

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

#### 3.4. Cerrahi Teknik

6 saatlik açlığı takiben 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  $30^{\circ}$  eğimle tutuldu. (Resim 2).

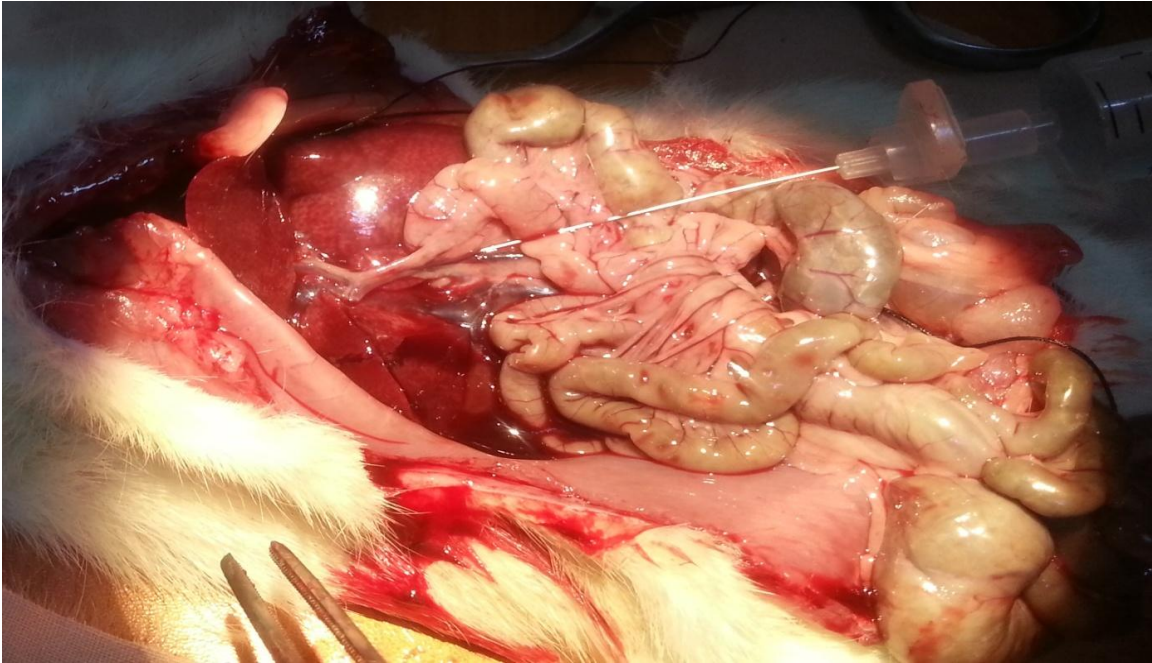


## Resim 2 Deney hayvanının hazırlanması

### 3.5. Deney Tasarımı

Orta hat insizyonu tercih edilerek, laparotomi yapıldı, ince barsaklar karın dışına alınıp, portal pedikül tanımlandı. Abdominal aorta trunkus çölyakusun üstü ve SMA altından bağlanıp, VCI'da hepatik ven dallarının öncesinden bağlanarak, karaciğerin arteriyel ve venöz dolaşımı kesildi. Daha sonra karaciğer perfüzyonu amacı ile portal ven kanülide edilerek Grup 1 ve 2, +4°C'deki UW solüsyonu ile, grup 3 ve 4 ise +4°C'deki HTK solüsyonu ile hepatik venden berrak sıvı gelene kadar yıkandı, ardından hepatektomi yapıldı. (Resim 3)

Hepatektomi yapıldıktan sonra karaciğer dokuları, içinde yıkandığı prezervasyon solüsyonu (HTK ve UW) bulunan torbalara konulup, torbalar içi buz dolu saklama kaplarına yerleştirildi.



Resim 3 Portal ven kanülasyonu ve perfüzyonu

### 3.6. Araştırma Grupları

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

- Grup 1: UW grubu (UW)
- Grup 2: UW+Silymarin grubu (UW+S)



- Grup 3: HTK grubu(HTK)
- Grup 4: HTK+Silymarin grubu (HTK+S)

### 3.7. Araştırma Parametreleri

Perfüze edilen karaciğerlerden,biyokimyasal inceleme için 0, 6 ve 12. saatlerde karaciğer biopsileri ve karaciğer dokusunun içinde saklandığı solüsyonlardan biyokimya tüpüne sıvı örnekleri, histopatolojik inceleme için 0, 6 ve 12. saatlerde karaciğer biyopsileri ve elektron mikroskopik değerlendirme için 6.saatte karaciğer biopsileri 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 Şehir Devlet Hastanesi biyokimya laboratuvarında,Roche COBUS c 501 marka biyokimya otoanalizatöründe,Roche marka ALT kiti ile spektrofotometrik (IFCC) yöntemle çalışıldı.

##### 3.7.1.2. Katalaz Ölçümü

Katalaz aktivitesi, amonyum molibdatla stabil bir kompleks oluşturan hidrojen peroksitin spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi temeline dayanan ölçümler sonucu belirlendi[79].

#### Homojenat Hazırlanması:

- 1) Örnek sayısı kadar tüp alınarak numaralandı.
- 2) Yaklaşık 0,4 g 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:

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  den 9,08 gr alındı ve 1 litre distile su içinde çözüldü (A).
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 'den 11.88 g alındı ve 1 litre distile su içinde çözüldü (B).
  - Daha sonra 3.3 ml A çözeltisinden alınarak B çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlandı ve pH = 8 olacak şekilde pH metrede ayarlandı.
- 6) Buz dolu bir kap içindeki tüpte bulunan örnek, homojenizatör cihazında 8000 devirde 10 vuruada homojenize edildi.
  - 7) Daha sonra soğutmalı santrifüjde +4 °C de, 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.

8) Üstte toplanan süpernatant ayrı bir viale alınarak ölçümde kullanıldı. Aynı gün içinde ölçüm yapılacaksa, +4 °C de daha sonra ölçüm yapılacaksa –80 °C de derin dondurucuda saklandı.

### Çözeltiler:

1) Substrat çözeltisi: %30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> den 8.11 ml alınıp, fosfat tamponu ile 1000 ml ye tamamlanıp pH: 7,4 ayarlandı.

2) 32,4 mmol/l amonyum molibdat ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 4H<sub>2</sub>O) çözeltisi: Bunun için, 8 g 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 çözeltisi:

A) 4,08 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> alınarak 500 ml distile suda çözüldü.

B) 8,04 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> alınarak 500 ml distile suda çözüldü.

Daha sonra (A) çözeltisinden 3,3 ml alınarak (B) çözeltisi ile 100 ml ye tamamlandı ve 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.

$$\text{Katalaz aktivitesi} = \frac{\text{Örnek} - \text{Blank}(B_1)}{\text{Blank 2}(B_2) - \text{Blank 3}(B_3)} \times 271$$

### 3.7.1.3.SOD(Süperoksit dismutaz) Ölçümü

Süperoksit dismutaz, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin  $H_2O_2$  ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve XO(Ksantin oksidaz) kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, 2-4-iyodofenil-3-4-nitrofenol-5-feniltetrazolium klorid (p-iyodonitrotetrazolium viyole: INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazan boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği 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.

#### Ayırıcılar

##### 1. CAPS (3-(sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit) Tamponu (pH 10.2)

50.00 mM CAPS	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	0.00152 gr
0.025 mM INT	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)

$Na_2PO_4$	54.91 mg
$NaH_2PO_4$	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.

## Hesaplama

Çalışma körü SOD içermediği için inhibisyona uğramamış reaksiyon olarak kabul edilir ve değeri %100 olarak alınır. Tüm standartlar için % inhibisyon değeri bunlara ait çalışma körüyle oranlanarak 100'den çıkarılması sonucu hesaplanır.

$$\Delta A/\text{dak. standart} = A_2 - A_1 / 3 \text{ dakika}$$

$$\% \text{ inhibisyon standart} = 100 - \frac{\Delta A/\text{dak standart} \times 100}{A \text{ çalışma körü}}$$

Hesaplama yapıldıktan sonra x yatay eksenine SOD derişimlerinin (Ü/ml) logaritmik dönüşüm değerleri, Y (dikey) eksenine standartlara ait % inhisyon değeri yazdırılarak standart eğri elde edilir.

Tekrar karıştırıldıktan 30 saniye sonra çalışma körünün ve standardın 37°C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbanları (A<sub>1</sub>) okunur. Aynı anda kronometre çalıştırılarak 3 dakika sonra son absorbanları (A<sub>2</sub>) tekrar okunur

$$\Delta A/\text{dak örnek} = A_2 - A_1 / 3 \text{ dakika}$$

$$\% \text{ inhibisyon örnek: } 100 - \frac{\Delta A/\text{dak örnek} \times 100}{A \text{ çalışma körü}}$$

Örneğe ait hesaplanan yüzde inhibisyon değerine karşılık gelen SOD değeri standart eğri kullanarak bulunur. Ü/ml biriminden ölçülen SOD spesifik aktivitesi Ü/mg protein birimlerinden verilmiştir.

$$\text{OD Spesifik Aktivitesi (Ü/mg protein)} = \frac{\text{SOD Değeri (Ü/ml)}}{\text{Protein (mg/ml)}}$$

### 3.7.2.4 .MDA(Malondialdehit) Ölçümü

Yöntemin amacı; lipit peroksidasyonu son ürünlerinden bir tanesi olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği renk reaksiyonuna dayanmaktadır.[80]

#### Homojenat Hazırlanması:

- 1) Örnek sayısı kadar tüp alınarak numaralandı.
- 2) Yaklaşık 0,4 gram ağırlığında karaciğer doku örnekleri alındı.
- 3) Alınan örnekler 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. 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 TBA (Tiyobarbitürik asit) 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 dk. kaynatıldı.
- 4) Tüpler soğuduktan sonra içlerine 4 ml butanol ilave edildi.
- 5) 3500 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi.
- 6) Ölçüm için süpernatant alındı.
- 7) Spektrofotometre 532 nm'ye getirildikten sonra, distile su ile sıfırlanarak, blank ve örnek tüplerinin absorbansları okundu.

#### **Sonucun Hesaplanması:**

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

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

#### **3.7.2. Histopatolojik 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 üç mikron kalınlığında kesitler alındı, kesitler etüvde 37°C'de bir gece bekletilerek deparafinize edildi.

### 3.7.2.1. Caspase 3 İmmünohistokimyasal Boyama

Karaciğer hücrelerinde meydana gelen apoptozis ve apoptozis regulasyonunda rol alan protein ekspresyonu değerlendirildi. Caspase -3 ekspresyonu formol fikse, parafin bloklarından hazırlanan kesitlerde immünohistokimyasal yöntemle araştırıldı .

#### 3.7.2.1.1.Caspase-3 Ekspresyonu

Formol fiske parafin bloklardan kesitler lizinli lama alınarak, 0,4 mikron kalınlığında kesildi 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatılarak 20 dakika inkübasyon yapıldı. PBS (fosfat tamponlu salin) 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 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, x 400 büyütmede ,10 ayrı saha tarandı ve en az 1000 hepatositte, boyanmış olan hepatosit stoplazmaları sayıldı

### 3.7.3. Elektron Mikroskopik Parametreler

Elektron mikroskopik inceleme için alınan karaciğer dokusu örnekleri % 2.5 glutaraldehit ve % 1 osmium tetroksit ile tespit edildikten sonra aseton ile dehidrate edilerek araldit bloklar içine gömüldü. Araldit bloklardan ultramikrotom ile 80 nm kalınlığındaki ince kesitler bakır gridler üzerine alındı. Kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlama işlemini takiben Zeiss Libra 120 *Transmission elektron mikroskop (TEM)* ile incelenerek fotoğraflar alındı.

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

#### 4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

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.



## 5.BULGULAR

### 5.1. Biyokimya Analiz Sonuçları

#### 5.1.1. ALT Değerleri

<b>GRUP 1(UW)</b>			
	<i>0.saat</i>	<i>6.saat</i>	<i>12.saat</i>
	50	678	1213
	92	672	672
	44	688	1329
	92	700	1276
	251	728	1314
	101	640	815
	87	680	690
	79	720	956
<b>Ortalama±sd</b>	<b>99.5±64.5 IU/L</b>	<b>688.2±28.0 IU/L</b>	<b>1033.1±282.7 IU/L</b>

**Tablo 4: Grup 1:UW grubunun 0,6 ve 12 saatlerdeki ALT değerleri,ortalama ve standart sapmaları**

UW grubundanki ALT değerleri karşılaştırıldığında 0. saatten başlayarak 12 .saate kadar progresif bir artış olduğu görülmektedir,grupların kendi arasındaki karşılaştırılmasında( $p:0.01$ ) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmiştir.

<b>GRUP 2(UW+S)</b>			
	<i>0.saat</i>	<i>6.saat</i>	<i>12.saat</i>
	138	899	283
	128	202	972
	108	369	986
	110	887	991
	123	604	281
	139	396	464
	127	607	990
	136	202	324
<b>Ortalama±sd</b>	<b>126.1±11.9 IU/L</b>	<b>520.7±270.0 IU/L</b>	<b>661.3±350.3 IU/L</b>

**Tablo 5:Grup 2:UW+Silymarin grubunun 0,6 ve 12. saatlerdeki ALT değerleri,ortalama ve standart sapmaları.**

UW+Silymarin grubundaki ALT değerleri karşılaştırıldığında 0.saatteki değerlerin ortalaması  $126.1 \pm 11.9$  IU/L , 6.saatteki değerlerin ortalaması  $520.7 \pm 270.0$  IU/L olarak hesaplanmıştır.0.ve 6. Saatteki grupların karşılaştırılmasında(  $p:0.01$ ) 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmiştir.

12.saatteki değerlerin ortalaması  $661.3 \pm 350.3$  IU/L olarak hesaplanmıştır 6. ve 12. saatlerdeki değerler karşılaştırıldığında (  $p:0.293$ ) 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir.

<b>GRUP 3(HTK)</b>			
	<i>0.saat</i>	<i>6.saat</i>	<i>12.saat</i>
	103	1333	1595
	251	1298	1268
	249	1229	1243
	471	1217	1647
	99	1259	1618
	220	1227	1139
	458	879	1654
	217	916	1235
<b>Ortalama±sd</b>	<b>285.5±140.3IU/L</b>	<b>1169.7±172.7 IU/L</b>	<b>1424.8±221.5 IU/L</b>

**Tablo 6:Grup 3** HTK grubunun 0,6 ve 12. saatlerdeki ALT değerleri,ortalama ve standart sapmaları.

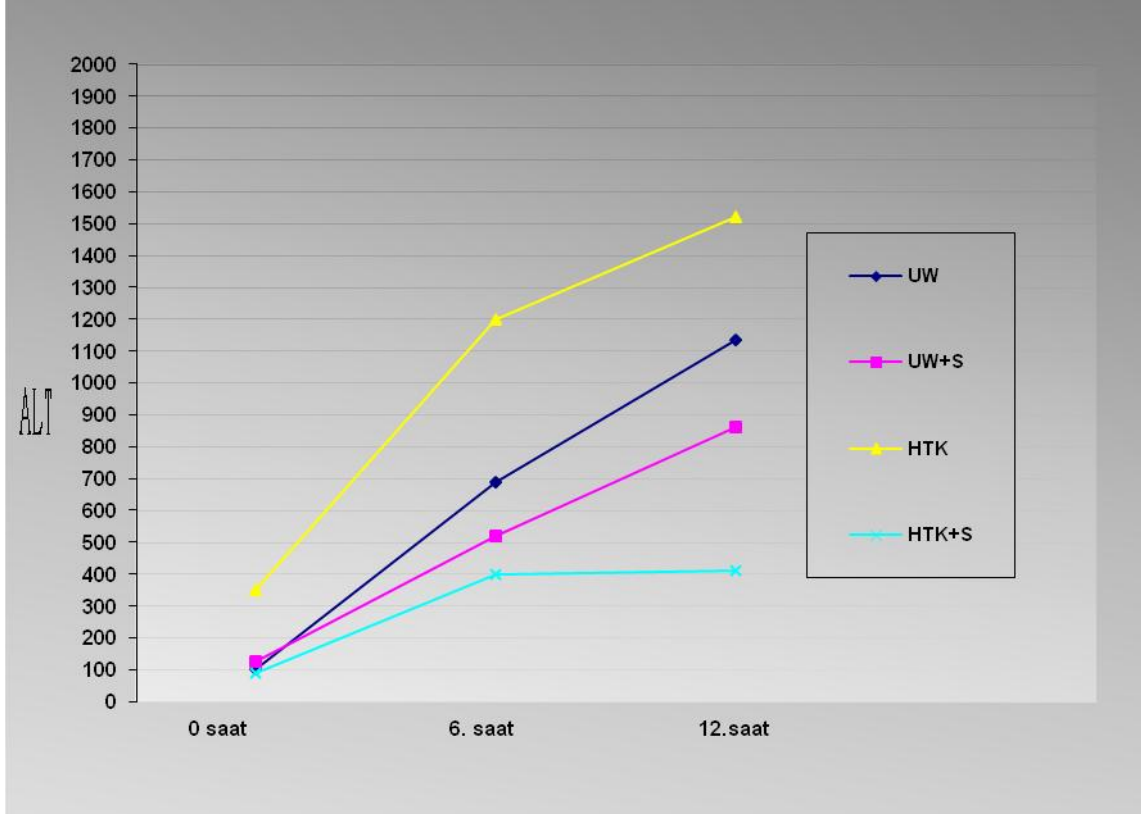
HTK grubundada UW grubunda olduğu gibi 0. saatten 12. saate kadar enzim değerlerinde progresif bir artış söz konusudur. ALT değerleri karşılaştırıldığında 0.saatteki ortalama değer  $285.5 \pm 140.3$  IU/L olarak ,6 .saatteki ortalama değer  $1169.7 \pm 172.7$  IU/L olarak hesaplanmıştır.HTK grubunun 0. ve 6.saatleri karşılaştırıldığında(  $p:0.01$ ) anlamlı fark izlenmiştir.

12.saatteki ortalama değer  $1424.8 \pm 221.5$  IU/L olarak hesaplanmıştır,6.saat ve 12. saatteki sonuçların karşılaştırılmasında (  $p:0.059$ ) anlamlı fark izlenmemiştir.

<b>GRUP 4(HTK+S)</b>			
	<i>0.saat</i>	<i>6.saat</i>	<i>12.saat</i>
	102	498	709
	65	158	302
	42	465	298
	127	378	160
	70	428	356
	43	375	400
	127	400	260
	98	170	180
<b>Ortalama±sd</b>	<b>84.2±34.2 IU/L</b>	<b>359±127.4 IU/L</b>	<b>333.1±172.0 IU/L</b>

**Tablo 7:Grup 4** HTK+Silymarin grubunun 0,6 ve 12. saatlerdeki ALT değerleri,ortalama ve standart sapmaları.

HTK+Silymarin grubunda 0.saatten 6.saate progresif artış görülürken 12. saat değerlerinde azalma görülmektedir.0. ve 6. saat değerleri istatistiksel olarak incelendiğinde ( $p:0.001$ )istatistiksel olarak fark izlenmiştir 6. saat ve 12. saat değerleri karşılaştırıldığında ise ( $p:0.372$ ) anlamı fark izlenmemiştir.



**Grafik 4:** ALT değerlerine göre grupların kendi aralarında karşılaştırılması. Birimi: IU/L

Grup 1 ve grup 2 (UW ve UW+S) 'nin karşılaştırılmasında 0. saat ,6. saat ve 12. saat p değerleri sırasıyla  $p:0.012, p:0.93, p:0.93$  olarak hesaplanmıştır ,istatistiksel olarak sırasıyla  $p>0.05, p<0.05$  ve  $p<0.05$  olarak değerlendirilmiştir, UW ve UW+S grupları arasında: 0. saatlerdeki ALT değerleri arasında fark izlenirken,6. ve 12.saatlerdeki enzim değerleri arasında fark izlenmemiştir.

Grup 3 ve grup 4 (HTK ve HTK+S ) 'ün karşılaştırılmasında ise 0.saat,6.saat ve 12.saat p değerleri sırasıyla  $p:0.005, p:0.001, p:0.001$  olarak hesaplanmıştır, sırasıyla  $p<0.05, p<0.05, p<0.05$  olarak değerlendirilmiştir.HTK ve HTK+S grupları arasında, 0.saat,6.saat ve 12.saatlerin hepsinde fark izlenmiştir.

Gruplar arası karşılaştırmada;en yüksek enzim değerleri HTK grubuna ait iken,en düşük enzim değerleri HTK+Silymarin grubunda izlenmiştir.UW grubuna yine silymarin eklenmesi enzim değerlerinde düşüğe neden olmuştur.

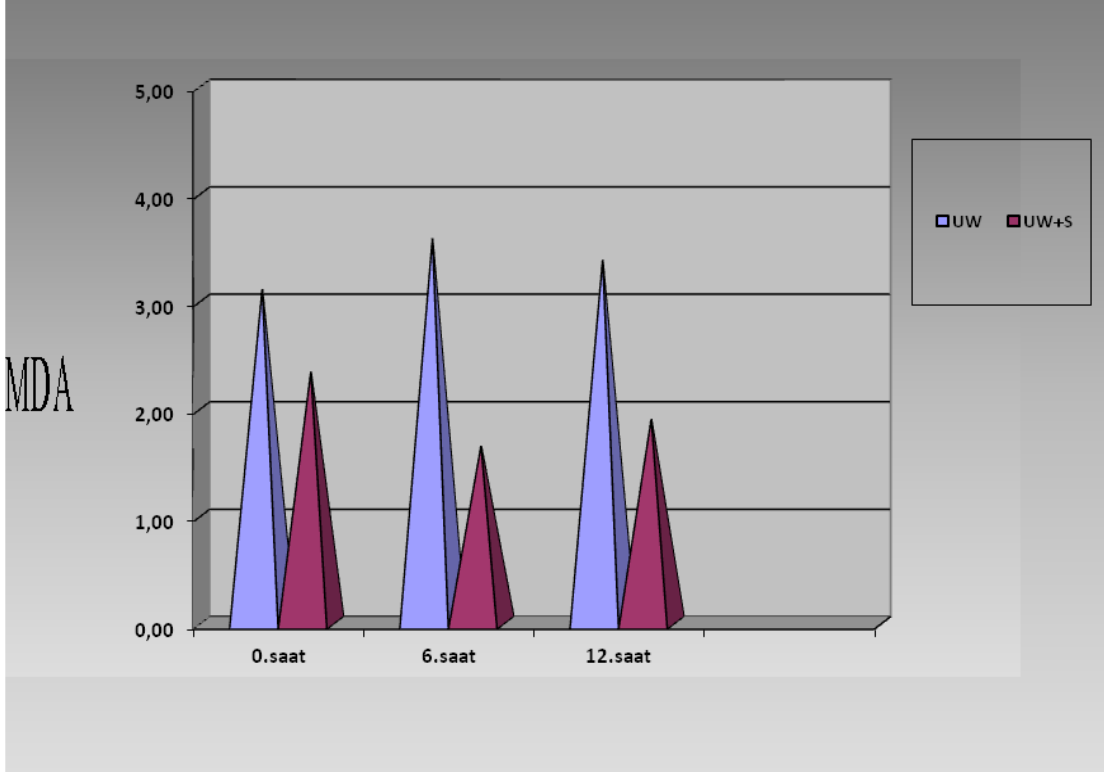
### 5.1.2. MDA(Malondialdehit), Cat(Katalaz), SOD(Süperoksit Dismutaz) Sonuçları

GRUPLAR VE SAATLER		Mda(nmol/mg)	Cat(ü/mg)	Sod(ü/mg)
UW grubu 0.saat	Ortalama	3,1144	69,6196	2,6410
	Standart sapma	,89423	17,41551	,87841
	Minimum	2,07	41,54	1,49
	Maksimum	4,86	94,54	3,71
UW 6.saat	Ortalama	3,5829	62,7178	1,4343
	Standart sapma	1,28812	25,38664	,19155
	Minimum	2,44	21,47	1,13
	Maksimum	5,81	81,18	1,76
UW 12. saat	Ortalama	3,3804	83,6698	1,6491
	Standart sapma	,90681	28,65424	,76121
	Minimum	2,42	45,53	,80
	Maksimum	5,20	134,32	2,99
HTK 0. saat	Ortalama	4,9647	49,5456	1,8950
	Standart sapma	1,17736	23,30800	,58852
	Minimum	3,49	20,24	1,23
	Maksimum	6,23	86,21	3,05
HTK 6. saat	Ortalama	4,5690	82,7694	1,8075
	Standart sapma	1,83962	11,27388	,45315
	Minimum	2,32	67,03	1,09
	Maksimum	6,99	99,26	2,30
HTK 12. saat	Ortalama	3,9273	49,1634	2,0482
	Standart sapma	2,21556	18,57610	1,08240
	Minimum	2,42	26,02	1,15
	Maksimum	8,29	85,70	4,47
UW+ S 0. saat	Ortalama	2,3469	84,6384	3,6165
	Standart sapma	,79042	51,48025	1,37773
	Minimum	1,35	11,90	2,23
	Maksimum	3,41	178,91	5,88

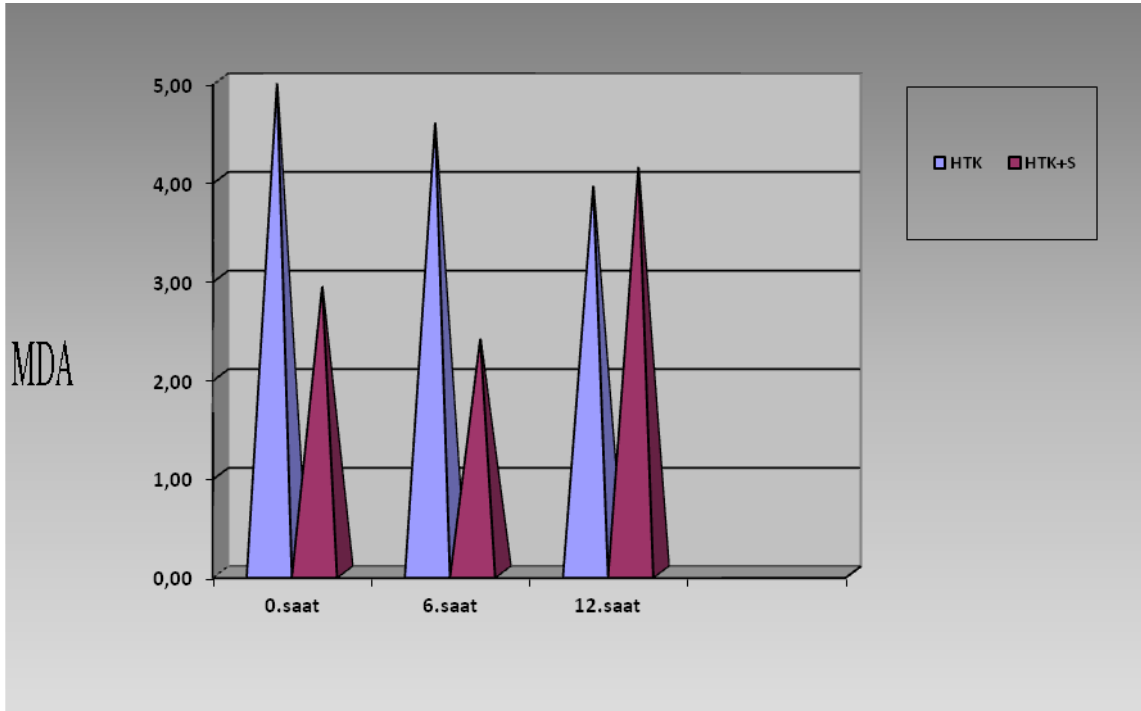
UW+ S 6. saat	Ortalama	1,6559	99,1882	3,2176
	Standart sapma	,65158	35,00540	2,00626
	Minimum	1,02	46,60	1,28
	Maksimum	2,70	161,31	7,84
UW+ S 12. saat	Ortalama	1,9080	146,3471	3,8133
	Standart sapma	,84164	42,91117	1,90110
	Minimum	,35	51,47	1,19
	Maksimum	3,04	199,56	5,99
HTK + S 0. saat	Ortalama	2,9382	113,8327	3,1524
	Standart sapma	,93104	75,42984	1,29229
	Minimum	1,19	46,48	2,09
	Maksimum	4,39	281,70	5,33
HTK + S 6. saat	Ortalama	2,3728	159,3176	4,1657
	Standart sapma	1,15443	51,11050	1,76124
	Minimum	1,08	73,08	2,17
	Maksimum	4,66	238,75	6,26
HTK + S 12. saat	Ortalama	4,1068	130,0147	4,5609
	Standart sapma	1,29154	68,25744	1,79923
	Minimum	2,88	32,76	1,49
	Maksimum	6,80	254,88	6,97

**Tablo 8:**MDA(Malondialdehit),CAT(Katalaz),SOD(Süperoksit Dismutaz) ‘ın gruplar ve saatlere göre ortalama,standart sapma,minimum ve maksimum değerleri görülmektedir. Malondialdehit:*nanomol/mg protein*,Katalaz :*ünite/mg protein*,Süper oksit Dismutaz:*ünite/mg protein* olarak birimlendirilmiştir

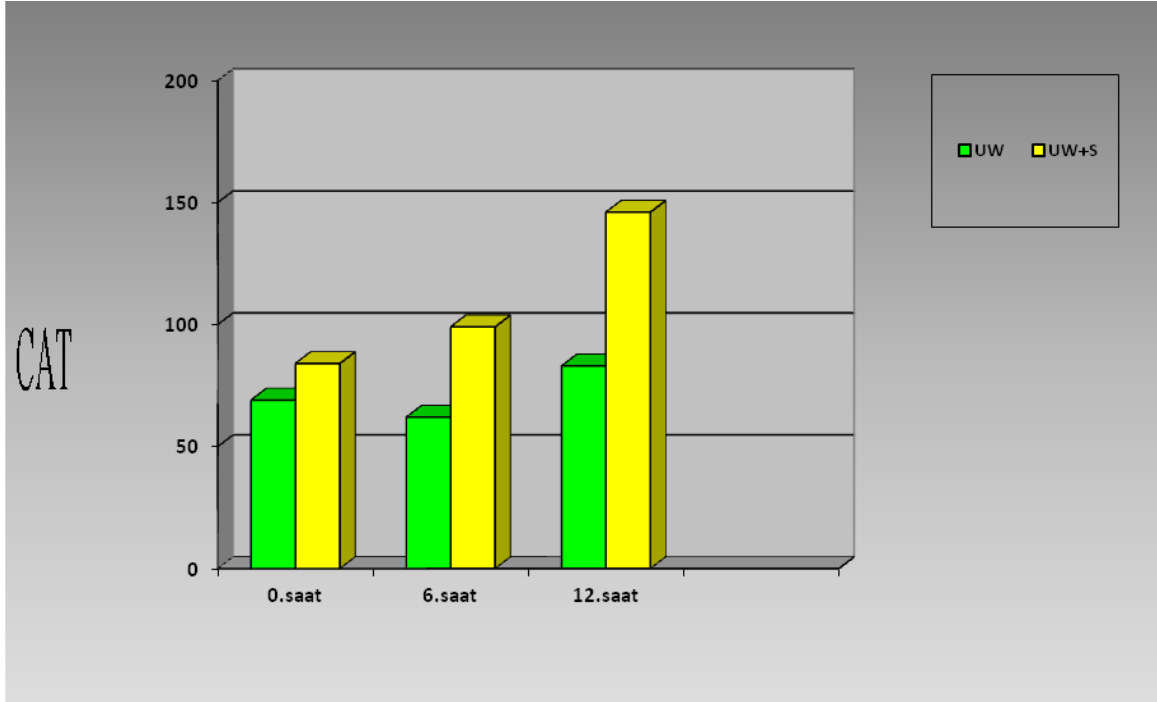
**UW:**(Universityofwisconsin), **UW+S:**(Universityofwisconsin+Silymarin) ,**HTK:** (Histidin-triptofan-ketoglutarat),**HTK+S:**(Histidin-triptofan-ketoglutarat+Silymarin)



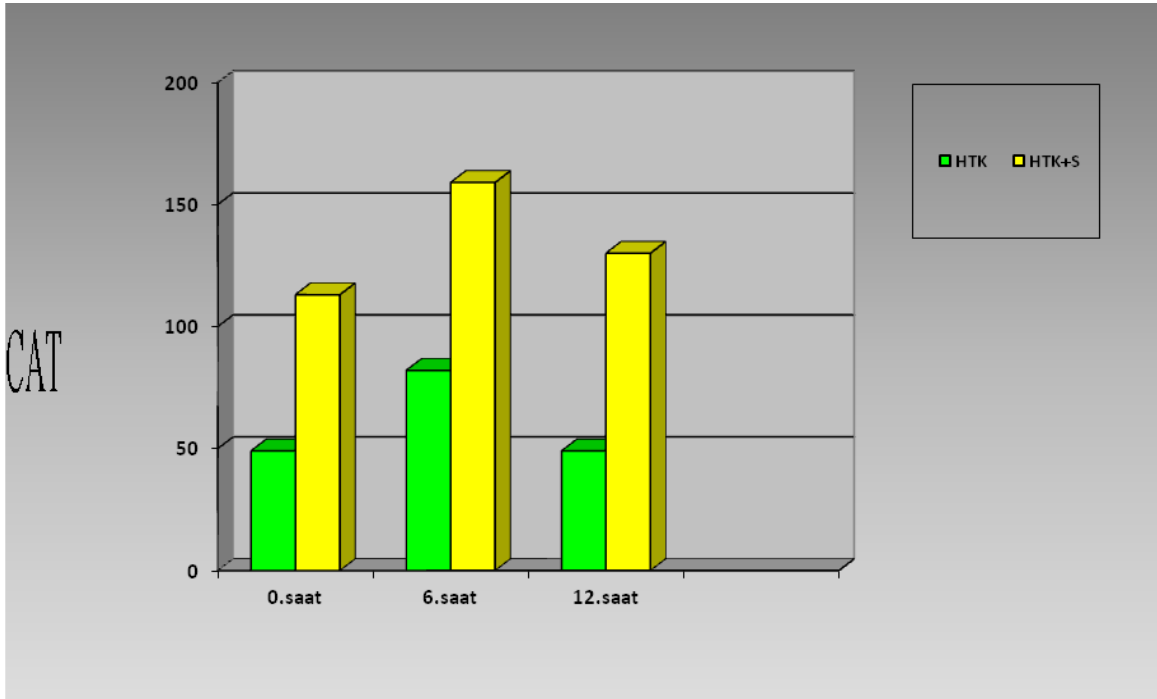
**Grafik 5.** UW ve UW+S grupları arasındaki MDA(Malondialdehit) değerinin saatlere göre değişimi .Birim: *nanomol/mg protein*



**Grafik 6.** HTK ve HTK+S grupları arasındaki MDA(Malondialdehit) değerinin saatlere göre değişimi .Birim: *nanomol/mg protein*

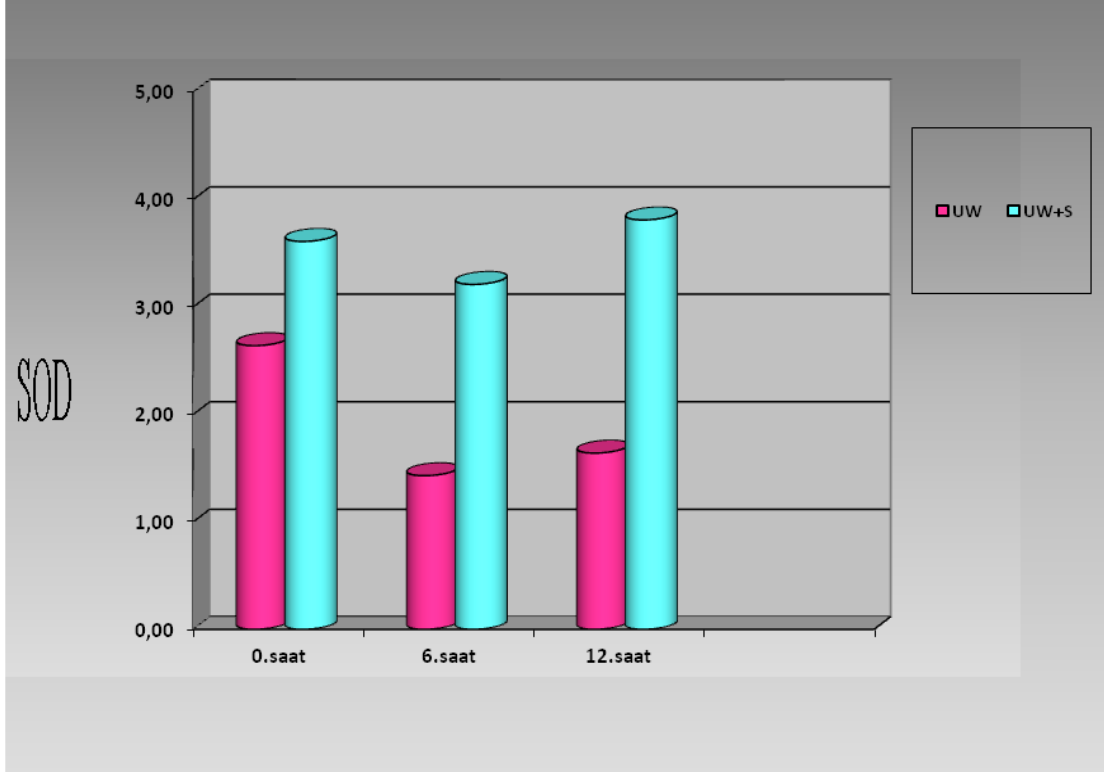


**Grafik 7.** UW ve UW+S grupları arasındaki CAT(Katalaz) değerinin saatlere göre değişimi. Birim: *ünite/mg protein*

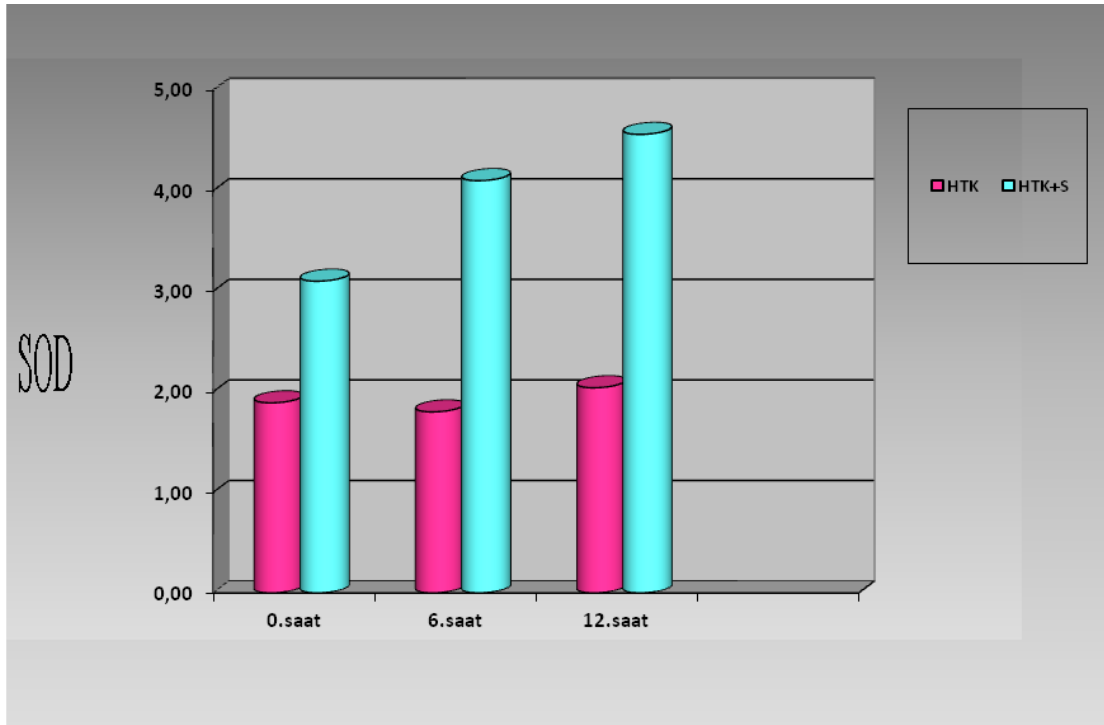


**Grafik 8.** HTK ve HTK+S grupları arasındaki CAT(Katalaz) değerinin saatlere göre değişimi. Birim: *ünite/mg protein*





**Grafik 9.** UW ve UW+S grupları arasındaki SOD(Süperoksit Dismutaz) değerinin saatlere göre değişimi.Birim: *ünite/mg protein*



**Grafik 10.** HTK ve HTK+S grupları arasındaki SOD(Süperoksit Dismutaz) değerinin saatlere göre değişimi.Birim: *ünite/mg protein*

Grupların kendi aralarında karşılaştırılmasında:

1) UW ve UW+S 0. saat gruplarında mda,cat ve sod değerleri sırasıyla  $3.11\pm 0.89$ ,  $69.6\pm 17.4$ ,  $2.64\pm 0.87$  ve  $2.34\pm 0.79$ ,  $84.6\pm 51.4$ ,  $3.61\pm 1.37$  olarak hesaplanmıştır.2 grubun karşılaştırılmasında sırasıyla  $p:0.093,p:0.345,p:0.141$  olarak saptanmıştır, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir.

2) UW ve UW+S 6. saat gruplarında mda,cat ve sod değerleri sırasıyla  $3.58\pm 1.28$ ,  $62.7\pm 25.3$ ,  $1.43\pm 0.19$  ve  $1.65\pm 0.65$ ,  $99.1\pm 35.0$ ,  $3.21\pm 2.0$  olarak hesaplanmıştır.2 grubun karşılaştırılmasında sırasıyla  $p:0.003,p:0.006,p:0.009$  olarak hesaplanmıştır gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmiştir.

3) UW ve UW+S 12. Saat gruplarında mda,cat ve sod değerleri sırasıyla  $3.38\pm 0.90$ ,  $86.3\pm 28.6$ ,  $1.64\pm 0.76$  ve  $1.90\pm 0.84$ ,  $146,3\pm 42.9$ ,  $3.81\pm 1.90$  olarak hesaplanmıştır.2 grubun karşılaştırılmasında sırasıyla  $p:0.006,p:0.009,p:0.021$  hesaplanmıştır,gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmiştir.

4) HTK ve HTK+S 0. Saat gruplarında mda,cat ve sod değerleri sırasıyla  $4.96\pm 1.17$ ,  $49.5\pm 23.3$ ,  $1.89\pm 0.58$  ve  $2.93\pm 0.93$ ,  $113.8\pm 75.4$ ,  $1.89\pm 0.58$  olarak hesaplanmıştır.2 grubun karşılaştırılmasında sırasıyla  $p:0.003,p:0.012,p:0.009$  olarak hesaplanmıştır,gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmiştir.

5) HTK ve HTK+S 6. Saat gruplarında mda,cat ve sod değerleri sırasıyla  $4.56\pm 1.83$ ,  $82.7\pm 11.2$ ,  $1.80\pm 0.45$  ve  $2.37\pm 1.15$ ,  $159.3\pm 51.1$ ,  $4.16\pm 1.76$  olarak hesaplanmıştır.2 grubun karşılaştırılmasında sırasıyla  $p:0.012,p:0.006,p:0.002$  olarak hesaplanmıştır,gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmiştir.

6) HTK ve HTK+S 12. Saat gruplarında mda,cat ve sod değerleri sırasıyla  $3.92\pm 2.21$ ,  $49.1\pm 18.5$ ,  $2.04\pm 1.08$  ve  $4.1\pm 1.29$ ,  $130.0\pm 68.2$ ,  $4.56\pm 1.79$  olarak hesaplanmıştır.2 grubun karşılaştırılmasında sırasıyla  $p:0.141,p:0.009,p:0.009$  olarak  $p>0.05,p<0.05,p<0.05$  hesaplanmıştır,mda değerleri arasında fark izlenmez iken,Cat ve Sod değerleri arasında anlamlı fark izlenmiştir.

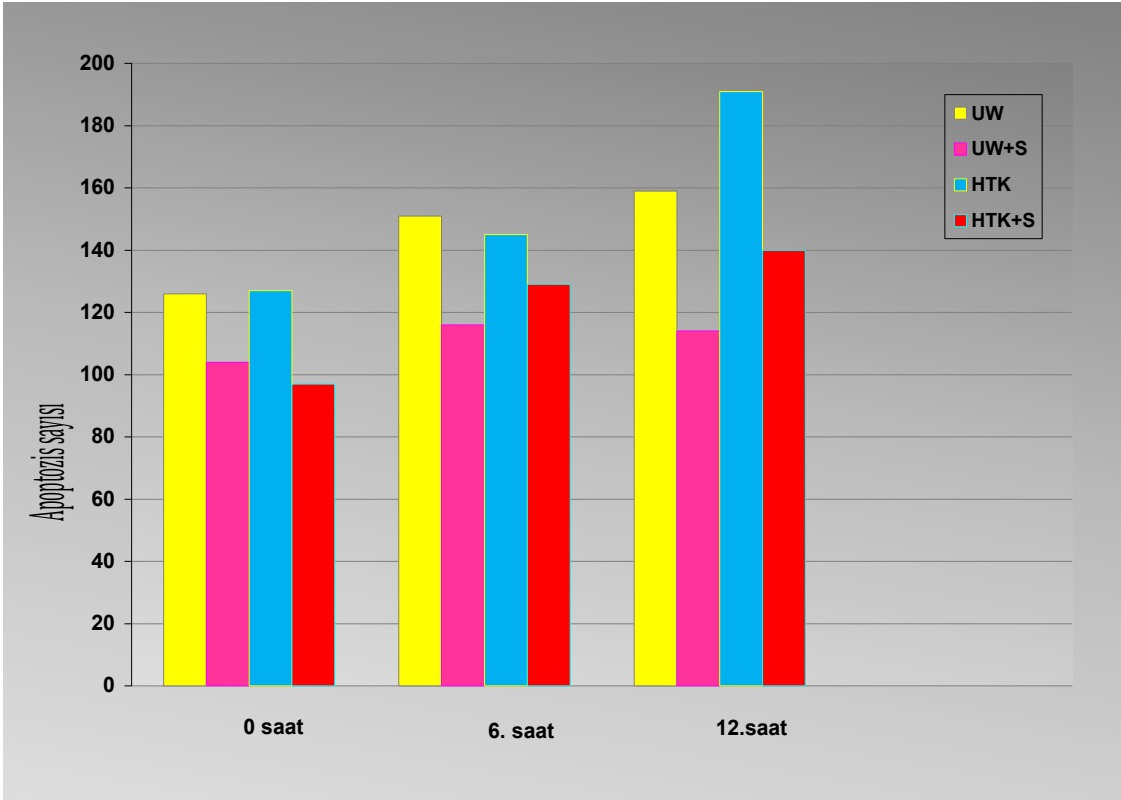
## 5.2. Patoloji Sonuçları

### 5.2.1. Caspase 3 İmmünohistokimyasal Boyama İle Apoptozis Değerlendirilmesi

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

	<i>0.saat</i>	<i>6.saat</i>	<i>12.saat</i>
<b>UW</b>	125±2.1	142±18	149±10.5
	<i>p:0.11</i>	<i>p:0.043</i>	<i>p:0.002</i>
<b>UW+S</b>	102±5.1	108±16.4	110±8.5
<b>HTK</b>	122±9.1	142±9.9	188±6.7
	<i>p:0.021</i>	<i>p:0.043</i>	<i>p:0.021</i>
<b>HTK+S</b>	90±14	124±7.3	130±20

**Tablo 9:**Grupların saatlere göre apoptotik hücre sayıları ve grupların kendi arasında İstatistiksel olarak karşılaştırılması



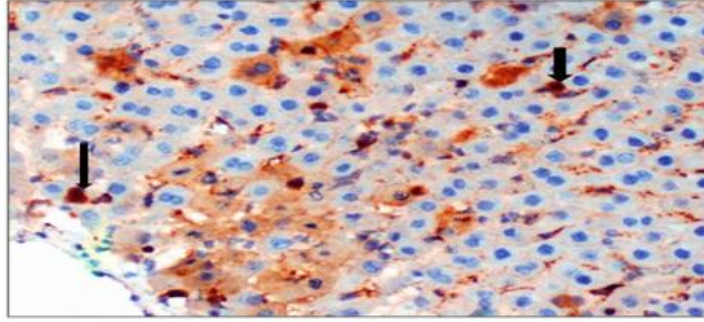
**Grafik 11:**Grupların saatlere göre apoptotik hücre sayıları ve grupların kendi arasında karşılaştırılması.

UW ve HTK gruplarına Silymarin eklenmesi apoptozis sayısının azalmasına neden olmuştur.

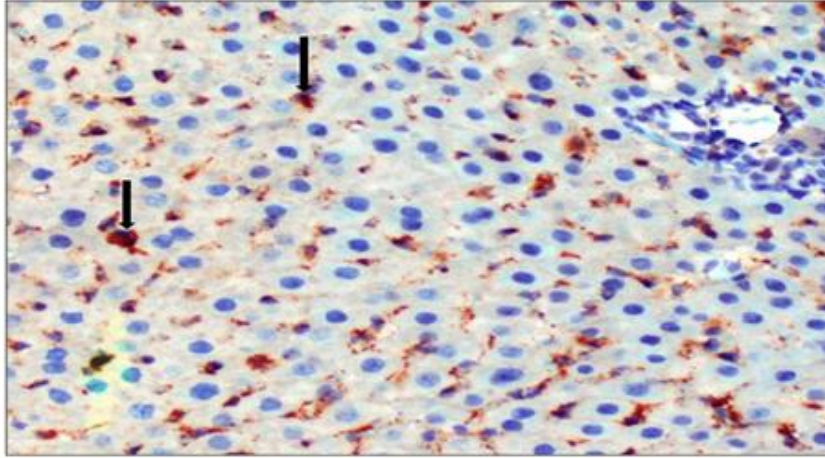
UW grubu ile UW+Silymarin grubu karşılaştırılmasında 0.saatte anlamlı fark bulunmazken( $p:0.11$ ),6.saat ve 12.saat karşılaştırılmalarında sırasıyla ( $p:0.043,p:0.002$ ) hesaplanmıştır.Fark izlenmiştir.

HTK grubu ile HTK+Silymarin grubu karşılaştırıldığında her 3 saatte ( $p:0.021,p:0.043,p:0.021$ ) olarak hesaplanmıştır.Her 3 saatte fark izlenmiştir.

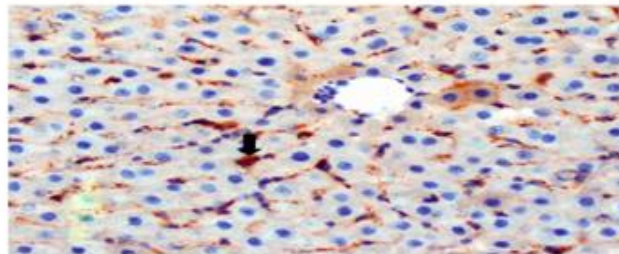
En yüksek apoptozis sayısı HTK grubunda izlenirken ,0. saatte en düşük apoptozis sayısı HTK+Silymarin grubunda ,6. ve 12.saatlerde ise UW+Silymarin grubunda izlenmiştir .



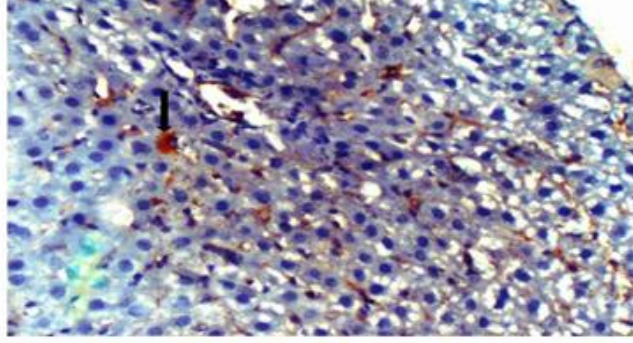
**Resim 4:**HTK 12.saat grubuna ait caspase 3 immunohistokimyasal boyanma (okla gösterilen alanlar apoitotik hücreleri göstermektedir). x 400 büyütme.



**Resim 5:** UW 12.saat grubuna ait caspase 3 immunohistokimyasal boyanma x 400 büyütme



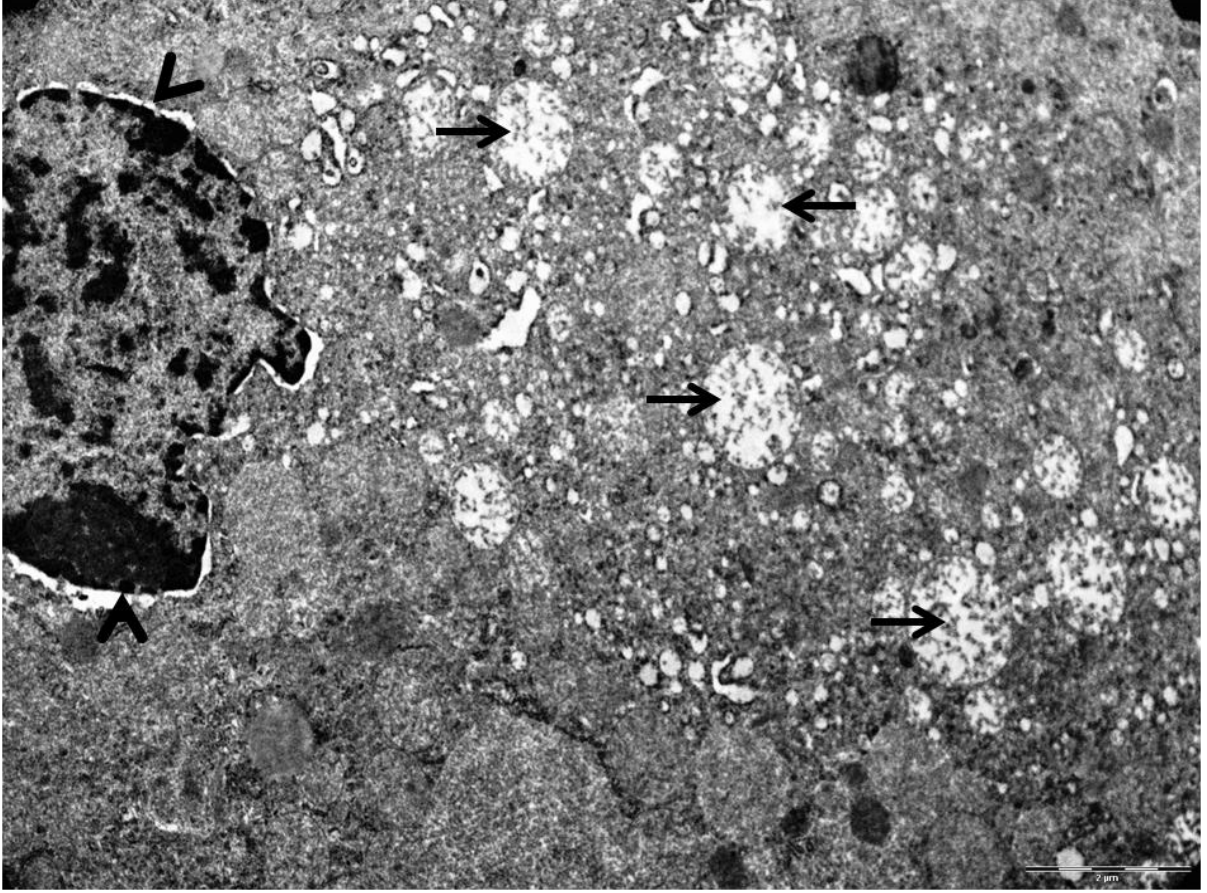
**Resim 6:** UW+S 6.saat grubuna ait caspase 3 immunohistokimyasal boyanma x 400 büyütme



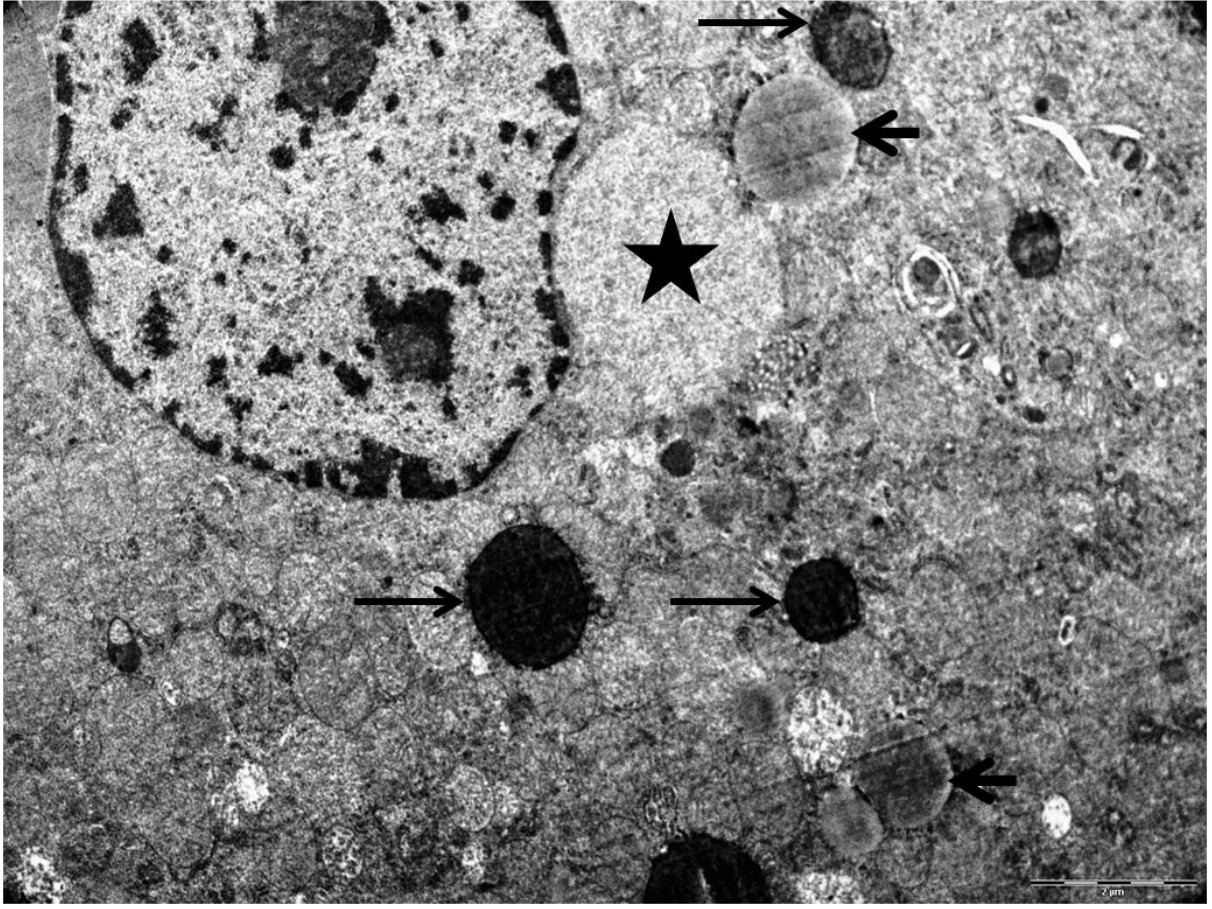
**Resim 7:**HTK+S 0.saat grubuna ait caspase 3 immunohistokimyasal boyanma x 400 büyütme

### 5.3. Elektron Mikroskopi Sonuçları

UW grubuna ait karaciğer doku örneklerinin ultrastrüktürel incelenmesinde yer yer hepatositlerin nükleus sınırlarında orta derecede düzensizlik ve perinükleer aralıkta minimal düzeyde dilatasyon saptandı. Bazı hepatositlerin mitokondriyonlarında orta düzeyde dilatasyon ve krista kaybı izlendi (Resim 8). Ayrıca hepatositlerin sitoplazmasında çok sayıda lipid vakuelleri ile hidropik vakuoller ve sekonder lizozomlar saptandı (Resim9,10). Sinuzoidlerde yerleşik Kupffer hücrelerinin çok sayıda değişik çaplarda sekonder lizozomlar içerdiği gözlemlendi (Resim 11). Yer yer hepatositlerde ve sinuzoid endotelinde nekrotik dejenerasyon saptandı (Resim 12). Bu gruptaki hepatositlerin sitoplazmasında ve Disse aralıklarında genel olarak bir yoğunluk artışı olduğu ve Disse aralıklarının net olarak seçilemediği görüldü.

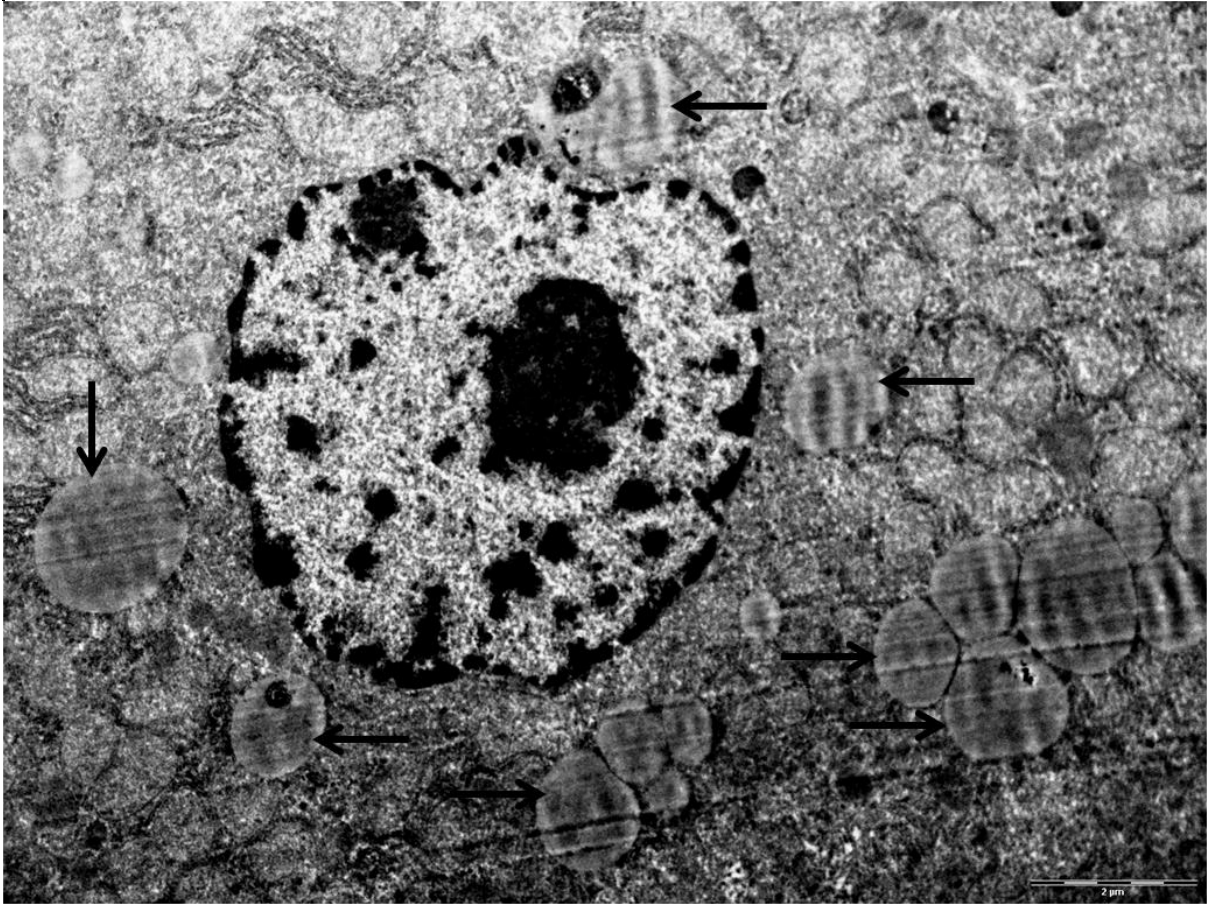


**Resim 8:** Perinükleer aralıkta dilatasyon (ok başları), mitokondriyonlarda dilatasyon ve krista kaybı (oklar). (Mikron bar = 2  $\mu\text{m}$ )

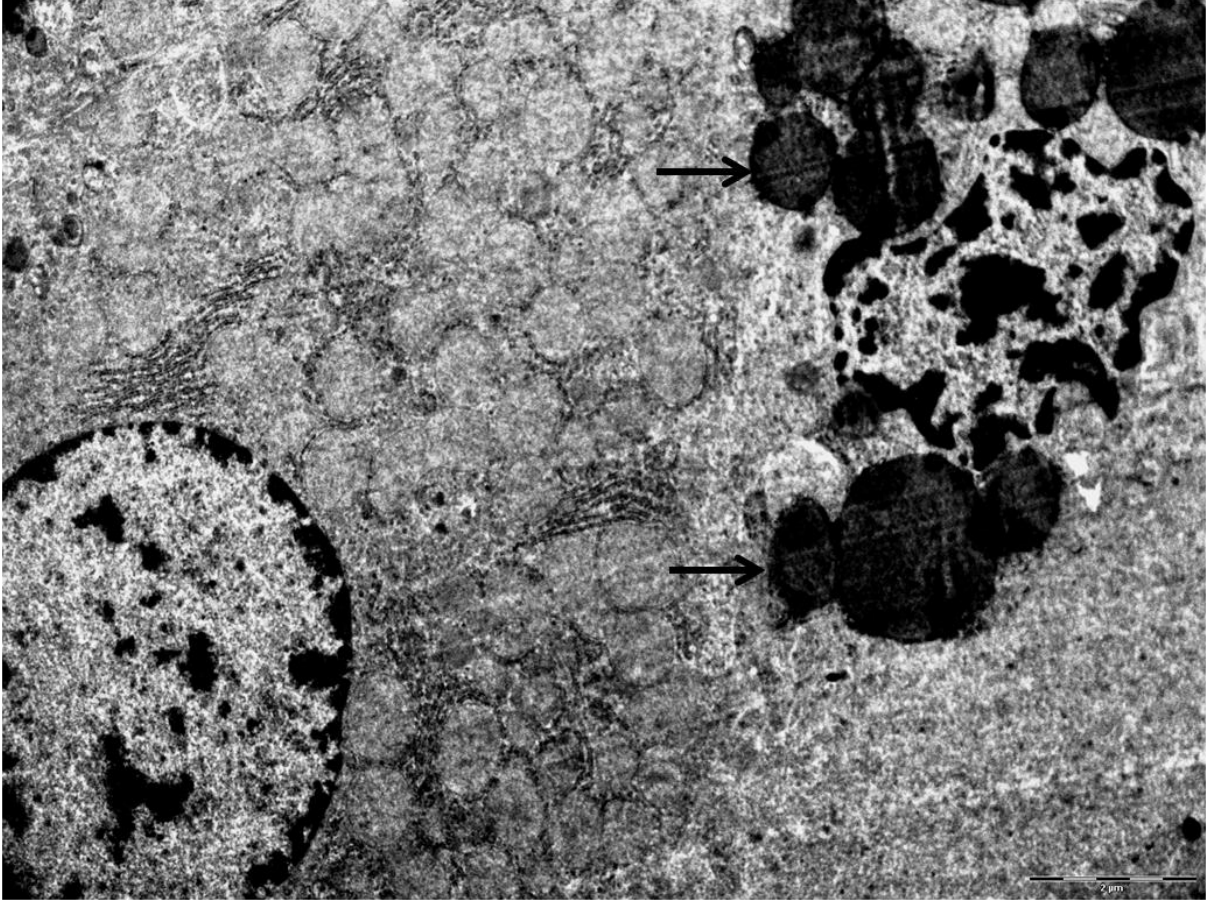


**Resim 9:** Hepatosit sitoplazmasında lipid vakuolleri (kısa oklar), hidropik vakuol (yıldız) ve sekonder lizozomlar (uzun oklar). (Mikron bar = 2 µm)

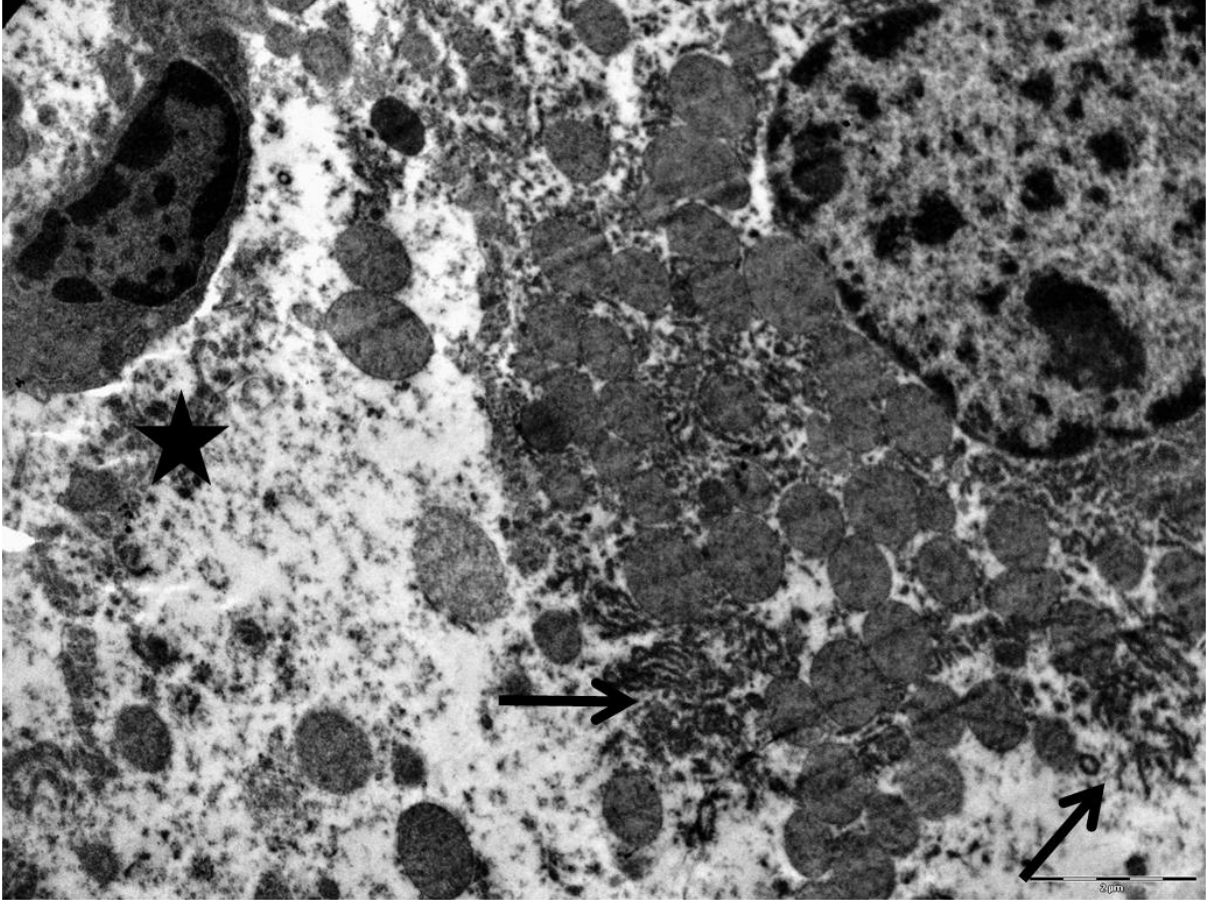




**Resim 10:** Hepatosit sitoplazmasında çok sayıda, değişik çaplarda lipid vakuolleri (oklar). (Mikron bar = 2 µm)

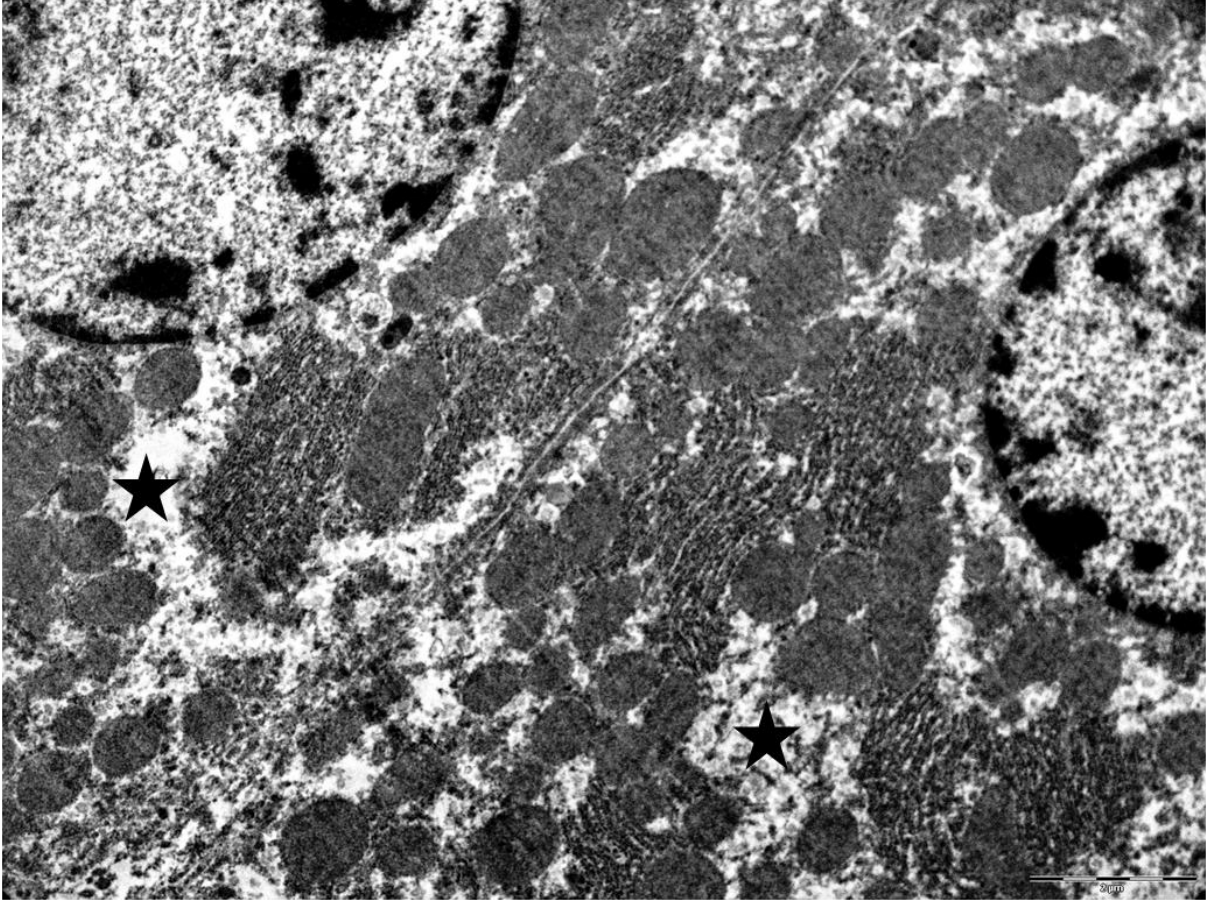


**Resim 11:** Kupffer hücre sitoplazmasında sekonder lizozomlar (oklar). (Mikron bar = 2  $\mu\text{m}$ ).

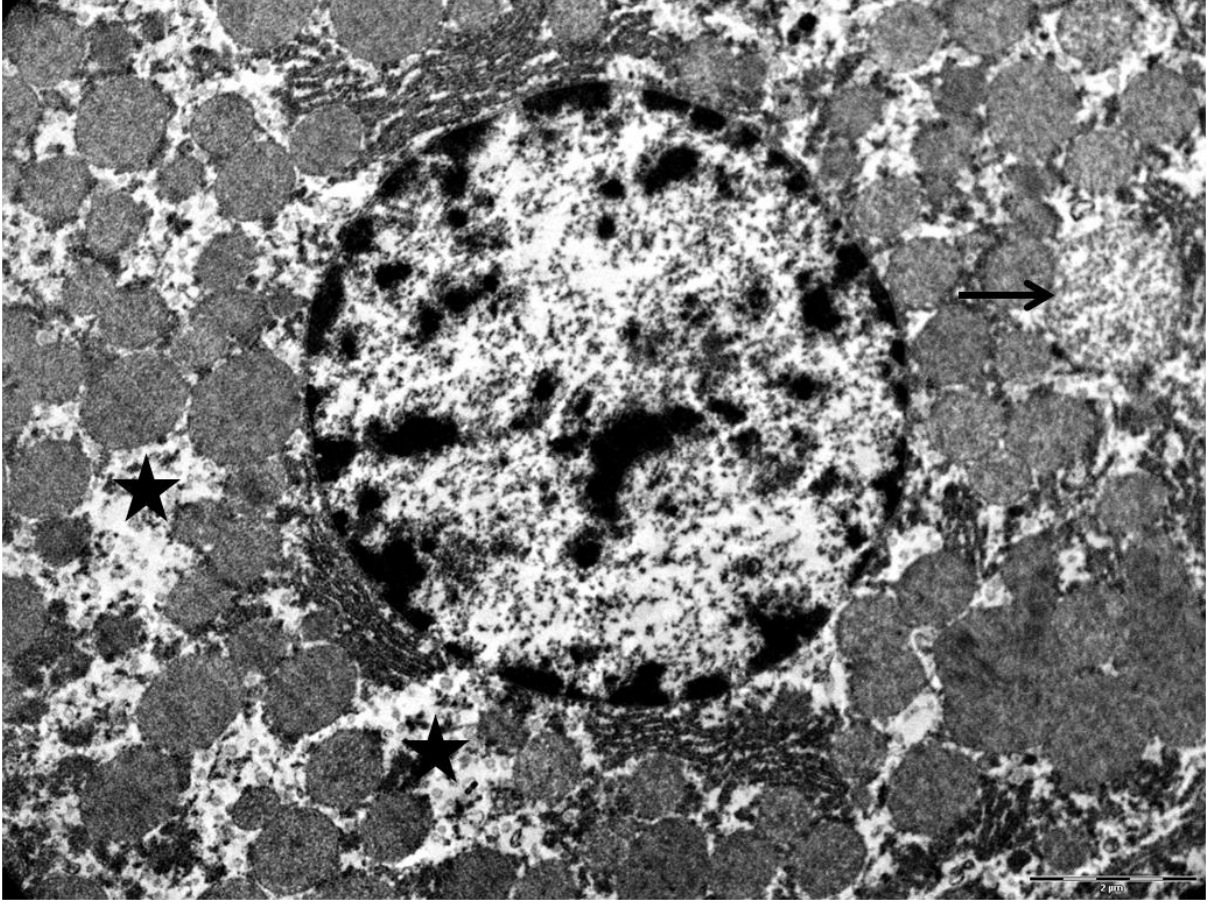


**Resim 12:** Hepatositlerde (oklar) ve sinuzoid endotelinde (yıldız) nekrotik dejenerasyon. (Mikron bar = 3  $\mu$ m).

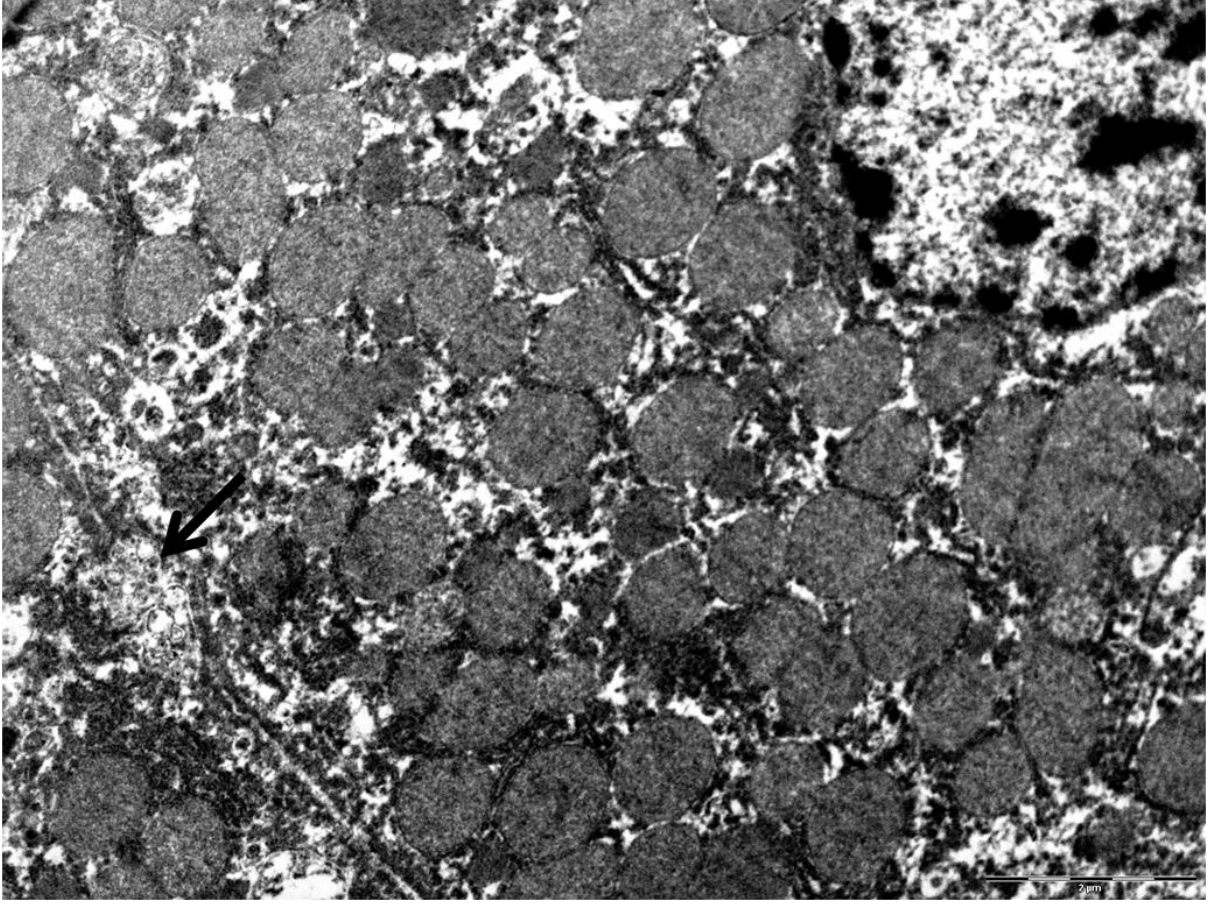
UW+Silymarin grubuna ait karaciğer dokularının elektron mikroskopik incelenmesinde hepatositler genel olarak normal ultrastrüktürde izlenmekle birlikte yer yer minimal düzeyde intrasellüler ödem mevcuttu (Resim 13,14). Nadir olarak bazı hepatositlerde az sayıda dilate mitokondriyonlara rastlandı (Resim 14). Hepatositlerin hücre sınırları net olarak seçilmekte ve safra kanalikülleri açık olarak izlenmekteydi (Resim 13,14,15).



**Resim 13:** Hepatositlerde minimal düzeyde intrasellüler ödem (yıldızlar). (Mikron bar = 2  $\mu$ m).

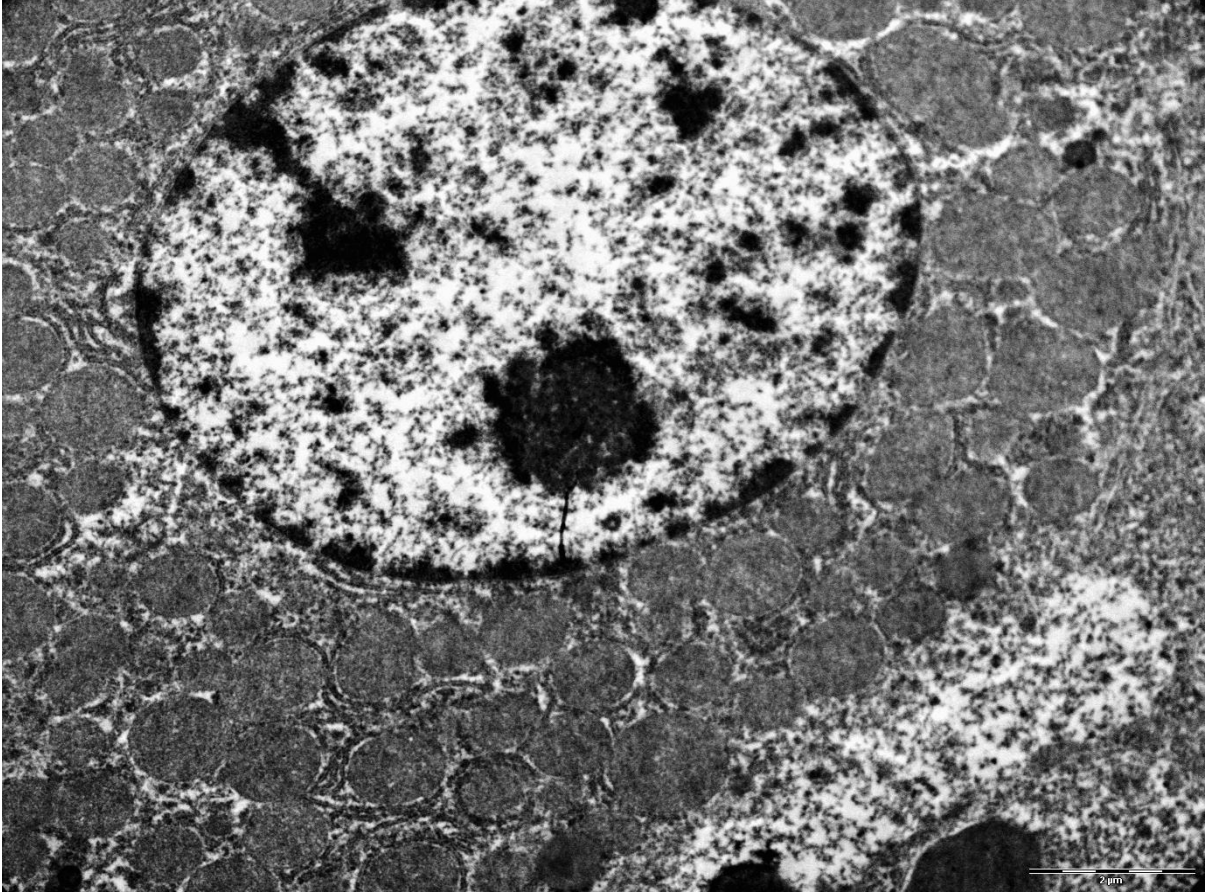


**Resim 14:** Hepatositlerde minimal düzeyde intrasellüler ödem (yıldızlar) ve dilate bir mitokondriyon (ok). (Mikron bar = 2 µm).

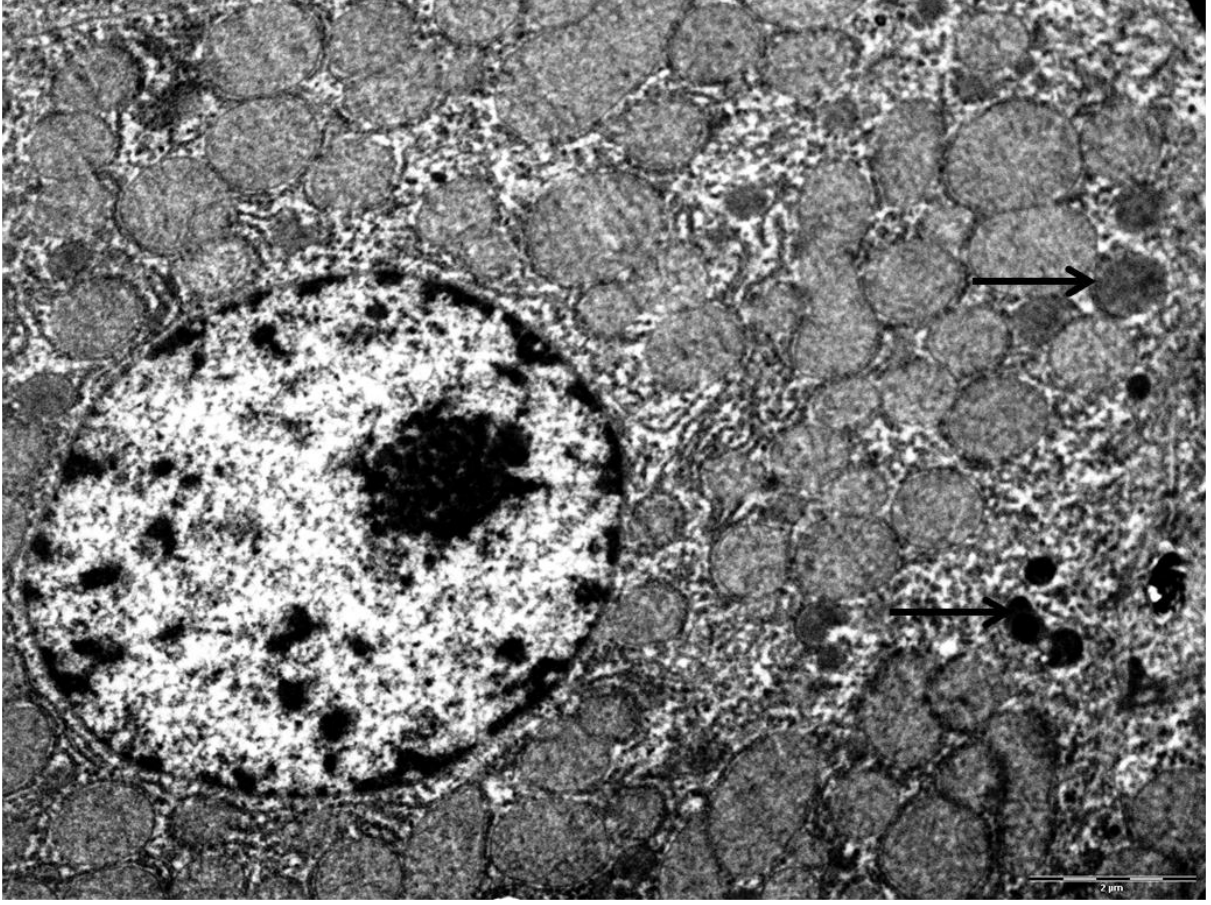


**Resim 15:** Normal ultrastrüktürde hepatosit ve safra kanalikülü (ok). (Mikron bar = 2  $\mu\text{m}$ ).

HTK grubuna ait karaciğer dokularının ultrastrüktürel incelenmesinde genel olarak hepatositler normal ultrastrüktürel yapıda (Resim 16) izlenmekle birlikte yer yer az sayıda, küçük lizomlar (Resim 17,18) ve lipid vakuolleri içeren (Resim 19) hepatositlere rastlandı. Hepatositlerin hücre sınırları ve safra kanalikülleri net olarak seçilmekteydi. (Resim 18).

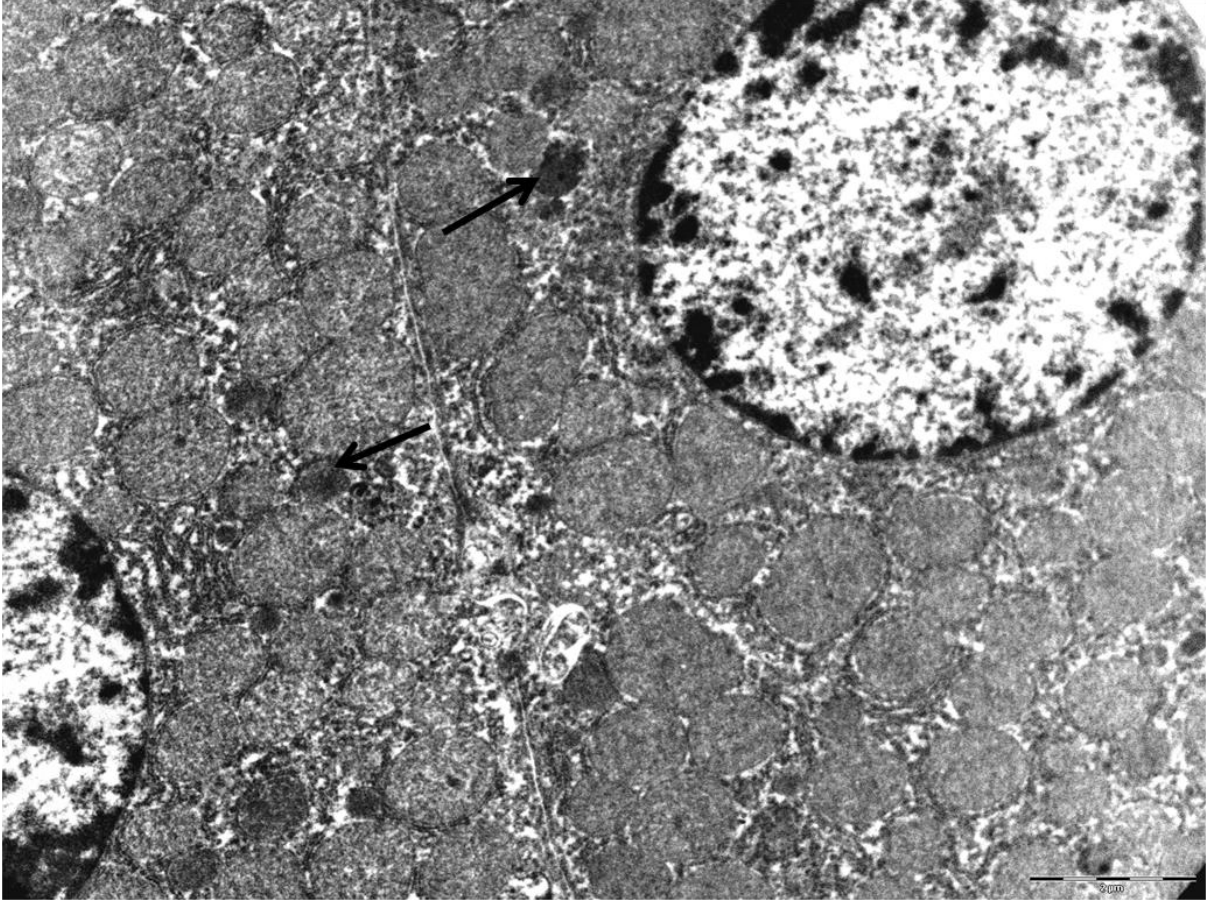


**Resim 16:** Normal ultrastrüktürel yapıda hepatosit. (Mikron bar = 2  $\mu\text{m}$ ).

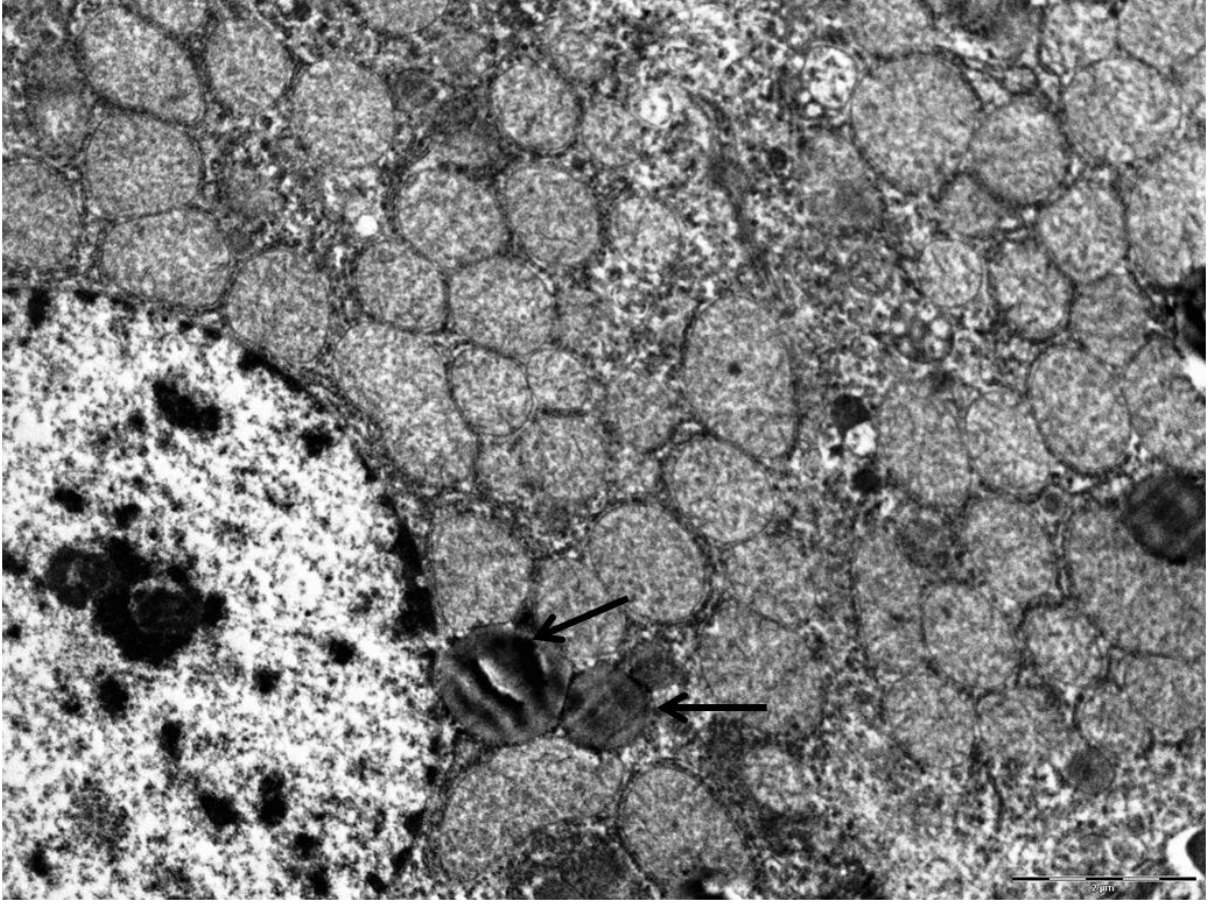


**Resim 17:** Normal ultrastrüktürel yapıdaki hepatositlerin sitoplazmasında küçük lizozomlar (oklar). (Mikron bar = 2  $\mu$ m).



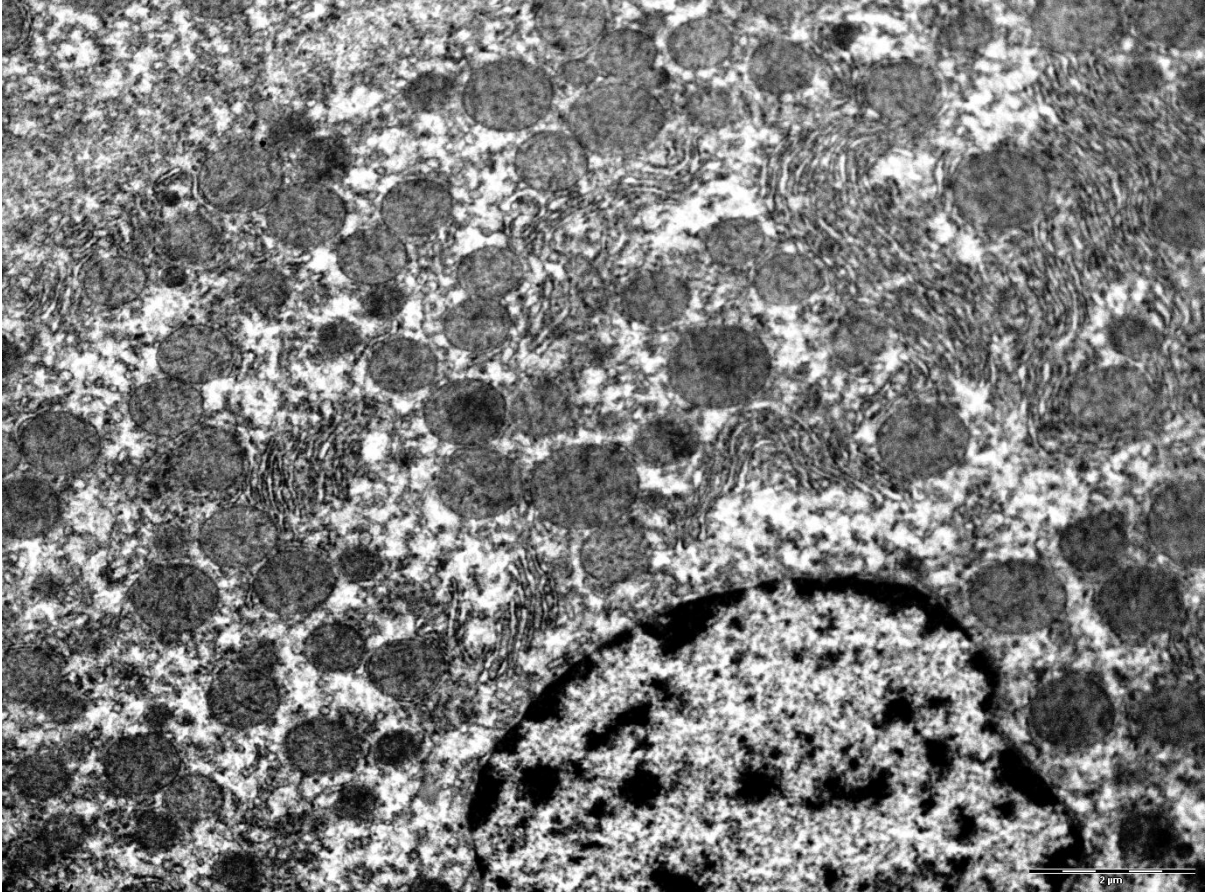


**Resim 18:** Normal ultrastrüktürel yapıdaki hepatositlerin sitoplazmasında küçük lizozomlar (oklar). (Mikron bar = 3  $\mu$ m).

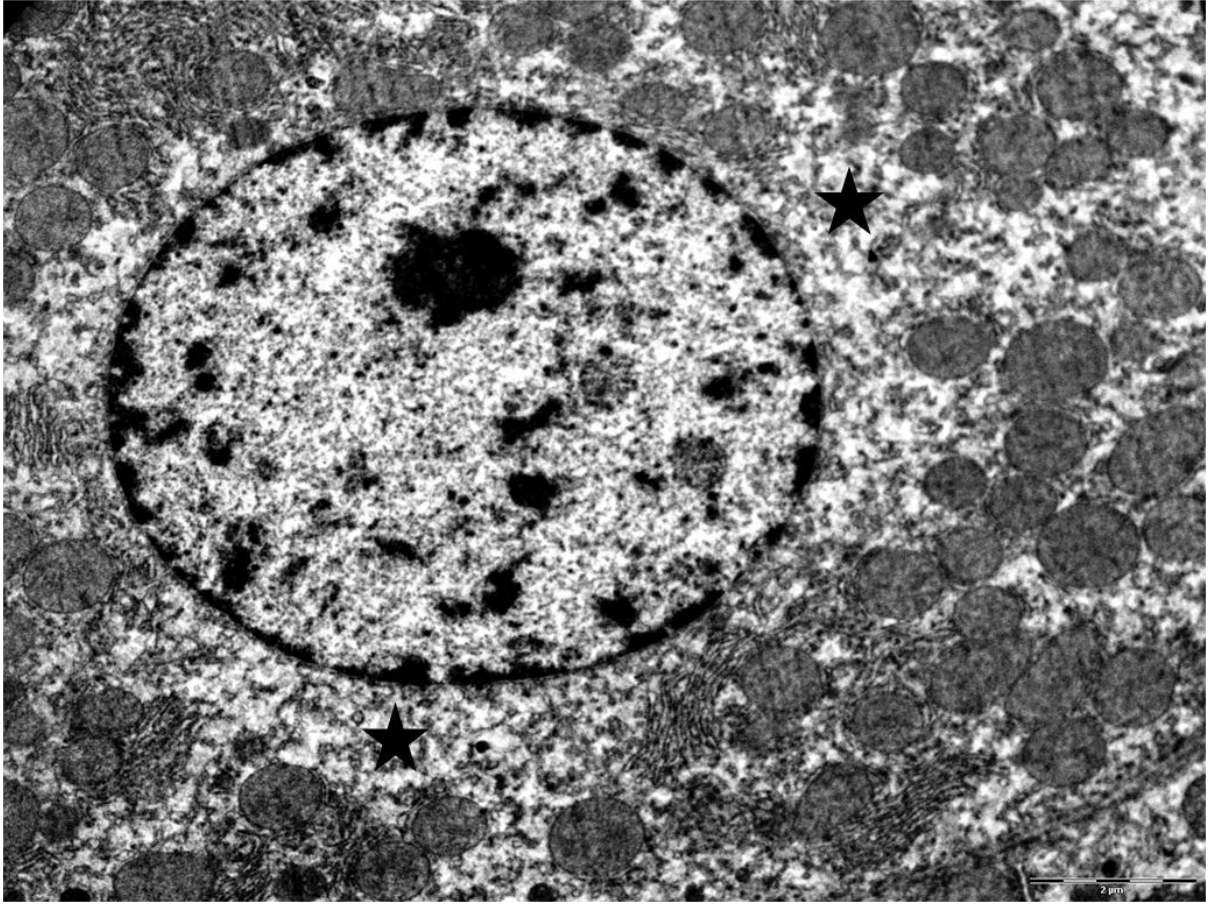


**Resim 19:** Hepatosit sitoplazmasında lipid vakuolleri (oklar). (Mikron bar = 2  $\mu$ m).

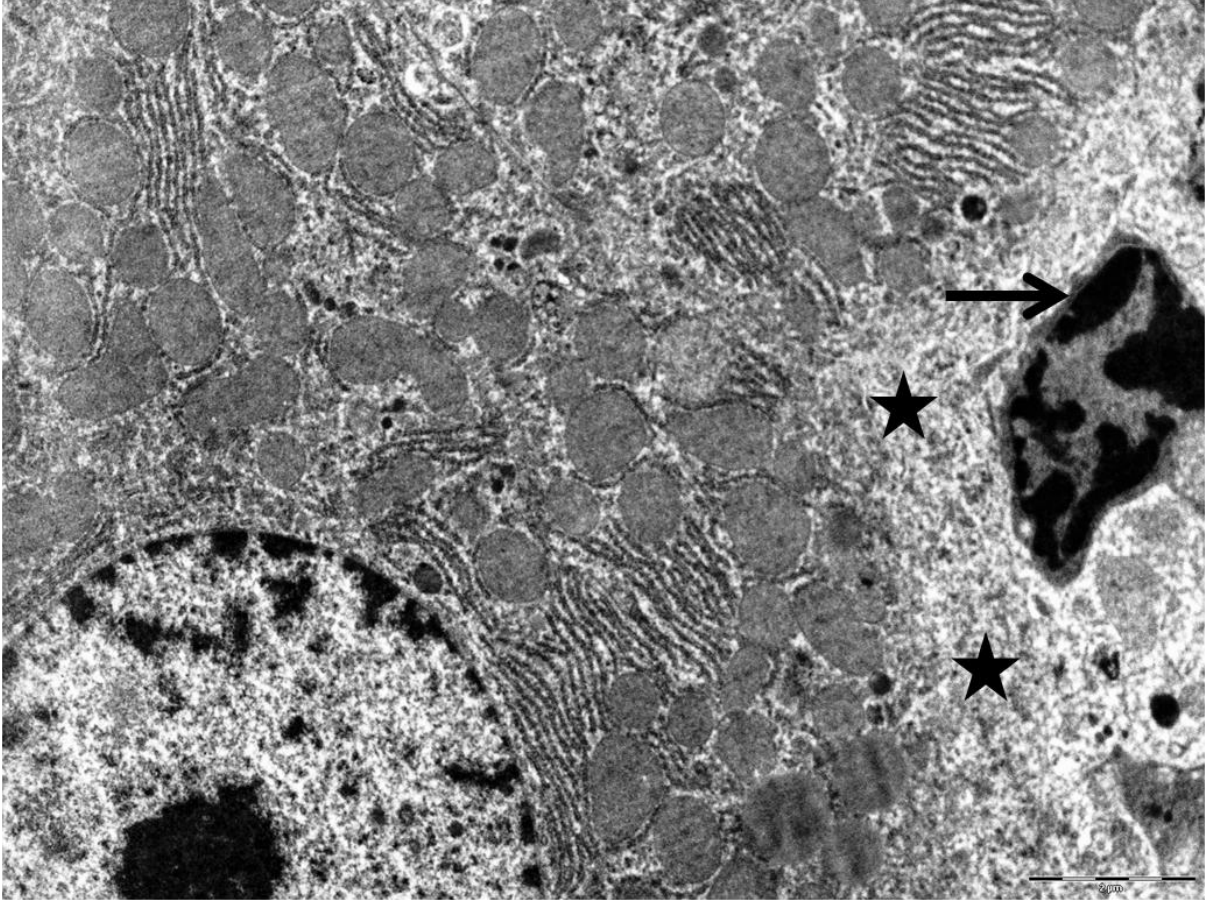
HTK+Silymarin grubuna ait karaciğer doku örneklerinin elektron mikroskopik incelenmesinde genel olarak hepatositler normal ultrastrüktürel yapıda izlendi (Resim 20). Yer yer bazı hepatositlerde perinükleer alanda minimal düzeyde intrasitoplazmik ödem tespit edildi, ancak bu hepatositlerde organel hasarı ve lizozom artışı olmaması dikkati çekti (Resim 21). Disse mesafeleri açık ve sinuzoid endoteli normal ultrastrüktürel yapıda gözlendi (Resim 22).



**Resim 20:** Normal ultrastrüktürel yapıda hepatosit. (Mikron bar = 2  $\mu\text{m}$ ).



**Resim 21:** Hepatosit sitoplazmasında perinükleer alanda minimal düzeyde intrasitoplazmik ödem (yıldızlar). (Mikron bar = 2  $\mu\text{m}$ ).



**Resim 22:** Normal ultrastrüktürel yapıda hepatosit, Disse aralığı (yıldızlar) ve sinuzoid endotel hücresi (ok). (Mikron bar = 2  $\mu$ m).

## 6.TARTIŞMA

Şu anki verilerle karaciğer transplantasyonu bazı metabolik karaciğer hastalıkları, fulminan karaciğer yetmezliği, başka cerrahi ve medikal tedavilere yanıt vermeyen terminal dönemdeki kronik karaciğer hastalıkları, karaciğerin primer ve nöroendokrin tümör metastazlarında daha fazla olmak üzere sekonder tümörleri ve alveolar kist hidatik gibi bazı parazitik hastalıkların tedavisinde uygulanmaktadır.

Karaciğer nakli ile ilgili ilk çalışmalar Welch tarafından köpekler üzerinde yapılmış ve ardından 1963 yılında T.Starzl tarafından insanda ilk karaciğer nakli gerçekleştirilmiştir[2]. Fakat başarılı sonuçlar, siklosporin gibi immünsupresif ajanların kullanıma girmesiyle alınmaya başlanmıştır. Artan cerrahi teknik, yoğun bakım imkânları, immünsüpresif tedavilerdeki gelişmelere rağmen günümüzde halen belli oranda karaciğer transplantasyonu primer non fonksiyon'a bağlı olarak başarısızlıkla sonuçlanmaktadır[81]. Primer non fonksiyon, karaciğer transplantasyonu sonrası ölümcül bir komplikasyondur, nakil sonrası serum KCFT yüksekliği, safra üretiminin azalması ve ciddi koagülopati görülmesi şeklinde tanımlanabilir [82, 83]. Karaciğer transplantasyonu sonrası non fonksiyon gelişiminden birçok faktör sorumludur. Bunların içinde cerrahi teknik, prezervasyon hasarı, donör organın histopatolojik yapısı ve sıcak iskemiyi periyodunda gelişen hasarlar önemli rol oynar. Bu çalışmada prezervasyon sürecinde meydana gelen ve non fonksiyon gelişmesinde belki de en önemli faktör olan prezervasyon hasarı incelendi.

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

Karaciğerde, iskeminin oluşturduğu doku hasarının, reperfüzyonun sağlanması ile daha da arttığı birçok deneysel çalışmada gösterilmiştir. Reperfüzyon hasarının ortaya çıkmasında, en çok sorumlu tutulan mekanizma endotel hücreleri, kupffer hücreleri ve nötrofillerden salınan serbest oksijen radikalleridir[84].

Bu hasar mekanizmasının anlaşılması ile yeni cerrahi teknikler geliştirilmiş ve hasarı önlemeye yönelik, antioksidan ve sitoprotektif ajanlar araştırılmıştır[85-87]. Bu ajanlar, oksidatif stresin değişik basamaklarında, stresin yarattığı olumsuz etkileri ortadan kaldıran antioksidan moleküllerdir.

Silymarinin hepatoprotektif etkilerinde ana mekanizmalar antioksidasyon, anti lipit peroksidasyonu, güçlü detoksifikasyon ve glutatyon azalmasına karşı koruyucu etkileridir[27]. Silymarinin hepatosit protein sentezini arttırdığı, tümör öncüllerinin aktivitesini azalttığı, mast hücrelerini stabil ettiği, immün fonksiyonları modüle ettiği ve antiinflamatuvar ve antifibrotik etkileri gösterilmiştir[27]

Çalışmamızda 2 adet silymarin verilen ve 2 adet silymarin verilmeyen toplam 4 grup karşılaştırılmıştır. Biyokimyasal parametrelerden ALT değerleri açısından grupların karşılaştırılmasında; UW grubunda 0,6 ve 12.saatlerdeki değerlerin sırasıyla incelenmesinde, ALT değerlerinde progresif olarak artış görüldüğü ve 0,6 ve 12.saatlerdeki değerlerin birbirinden istatistiksel olarak farklı olduğu izlenmiştir, UW+S grubunda ise 0.saatten 6.saate anlamlı artış izlenirken, 6. ve 12. saatlerdeki değerlerin

kendi arasında karşılaştırılmasında; istatistiksel olarak anlamlı artış izlenmemiştir, UW ve UW+S gruplarının aynı saatlerinin karşılaştırılmasında 0. saatler arasında ALT değerlerinde anlamlı azalma izlenirken 6. ve 12. saat karşılaştırılmalarında ALT değerlerinde anlamlı azalma izlenmemiştir, Bu bilgiler ışığında ;University of Wisconsin prezervasyon solusyonuna, silybum marianumun eklenmesi 0. saatteki hücresel hasarı anlamlı bir şekilde azaltırken, 6. saat ve 12. saatteki hücresel hasarı anlamlı bir şekilde azaltmamıştır. Fakat UW grubundaki 6. saatten başlayıp 12. saate kadar artış gösteren hücresel hasarın, silymarin eklenmesi ile zayıflaması sağlanmıştır.

HTK grubunda ise 0. saat ALT değerlerinin 6. ve 12. saat ALT değerleri ile karşılaştırılmasında anlamlı artış izlenirken, 6. saat ve 12. saat değerlerinin kendi aralarında karşılaştırılmasında anlamlı artış izlenmemiştir, HTK+S grubunun incelenmesinde ise 0. saat ALT değerlerinin 6. ve 12. saat ALT değerleri ile karşılaştırılmasında anlamlı artış izlenirken, 6. saat ve 12. saat değerlerinin kendi aralarında karşılaştırılmasında anlamlı artış izlenmemiştir. HTK ve HTK+S gruplarının aynı saatlerinin kendi aralarında karşılaştırılmasında; her 3 saatte ALT değerlerinde anlamlı derecede azalmalar olduğu görülmüştür.

Bu bize HTK+S grubunda hücresel hasara karşı koruyuculuğun erken saatlerden itibaren başlamış ve ilerleyen saatlerde devam etmiş olduğunu göstermektedir.

Mandegary.A. ve arkadaşlarının 77 gaz rafineri işçisi üzerinde yaptığı çalışmada Hidrojen sülfür adlı hepatotoksik gaza maruziyet sonrası 1 ay boyunca günde 3 kez 140 mg verilen silymarin sonrası ALT, AST ve ALP değerlerinde anlamlı derecede azalma görülmüştür[88]

A.W. Avolio ve arkadaşlarının HTK veya UW ile perfüzyon uyguladıkları 5 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, genel postoperatif safra yolu komplikasyonları dışında komplikasyon açısından fark olmadığı, safra yolu komplikasyonlarının HTK grubunda daha fazla olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada, UW kullanılan grupta ilk hafta serum AST ve ALT düzeyleri daha yüksek iken daha sonra aynı olduğu saptanmıştır[75].

Cacciapuoti F . ve arkadaşlarının 72 adet non alkolik yağlı karaciğer hasarı olan hastaya ,3 ay boyunca günde 2 kez oral silymarin verilmesinin ardından AST ve ALT değerlerinde anlamlı düşme ve ultrasonografide hepatik yağlanmayı gösteren hepatorenal parlaklık indeksinde azalma izlenmiştir.[89]

Hajiaghamohammadi A.A. ve arkadaşlarının 66 adet non alkolik yağlı karaciğer hasarı olan hasta üzerinde yapmış olduğu çalışmada metformin, pioglitazon ve silymarin gruplarında kan şekeri, lipid profili, AST ve ALT değerleri, serum insulin değerleri incelenmiş ve sonuç olarak en ciddi AST ve ALT azalmasının silymarin grubunda olduğu görülmüştür.[90]

Yapılan çalışmalar bizim sonuçlarımızla paralelik göstermektedir. Silymarin gruplarında serum ALT değerlerinde azalmalar izlenmektedir, bunu hepatoprotektivitenin bir göstergesi olarak düşünmekteyiz.

Oksidatif stres ve antioksidan mekanizmalar açısından UW ve UW+Silymarin gruplarının karşılaştırılmasında; 0 saatte: oksidatif stres markırı olan mda(malondialtehit), antioksidan mekanizmaları temsil eden sod(süperoksit dismutaz) ve cat(katalaz) değerlerinin karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir.

UW ve UW+Silymarin gruplarının 6. saat değerlendirilmesinde; UW+Silymarin grubunda mda'nın anlamlı düşük, sod ve cat değerlerinin anlamlı yüksek olarak izlenmesi silymarin etkinliği açısından anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

12. saat değerlendirilmesinde ,6 saat değerlendirilmesiyle benzerlik göstermektedir UW grubundaki mda değeri, UW+Silymarin grubundaki mda değerinden anlamlı olarak

düşük ,cat ve sod değerleri ise anlamlı olarak yüksek hesaplanmıştır.Bu da yine 12. saatteki oksidatif stres markırının azalıp,antioksidan mekanizmaların artmış olduğunu göstermektedir.

Bu sonuç University of Wisconsin solusyonu ile silymarin kombinasyonunun oksidatif stres ve antioksidan mekanizmalar açısından koruyucu etkinliğinin 6 ve 12. saatlerde sadece UW ile perfüze edilen gruba göre anlamlı derecede artmış olduğunu desteklemektedir.

HTK ve HTK+Silymarin gruplarının karşılaştırılmasında;HTK+Silymarin grubunda 0.saatlerde mda değerlerinde anlamlı düşme izlenirken,cat ve sod miktarlarında da istatistiksel olarak anlamlı sayılan yükselmeler izlenmiştir.

6.saatte grupların karşılaştırılmasında yine 0.saatte benzer şekilde mda değerlerinde düşme, Cat ve sod değerlerinde yükselmeler görülmüştür.

HTK ve HTK+Silymarin gruplarının 12.saatteki karşılaştırılmasında mda değeri HTK grubunda  $3.92 \pm 2.21$  nmol/mg protein iken HTK+S grubunda  $4.1 \pm 1.29$  nmol/mg protein olarak hesaplanmıştır ve gruplar arasında anlamlı fark izlenmemiştir,cat ve sod değerleri karşılaştırıldığında ise silymarin grubunda anlamlı derecede yükselme olduğu izlenmiştir.

HTK ve HTK+S gruplarının karşılaştırılmasında 0. ve 6. Saatlerdeki oksidatif stres markırının anlamlı derecede azaldığı fakat 12.saatte oksidatif stres markırında anlamlı değişiklik olmadığı görülmüştür,antioksidan mekanizmalar açısından değerlendirilmeler yapıldığında her 3 farklı saatteki gruplarda da antioksidan mekanizmaların artış gösterdiği izlenmiştir.

Oksidatif stres ve antioksidan mekanizmalar açısından Histidin–triptofan-ketoglutarat solusyonu ile silymarin kombinasyonunun 0. ve 6.saatlerde koruyucu etkinliğinin 12. Saate göre daha efektif olduğu gözlenmiştir.

Bu bilgiler ışığında; Oksidatif stres ve antioksidan mekanizmalar açısından Silymarin eklenen her 2 grupta genel olarak oksidatif stres markırının azalıp,antioksidan mekanizmaların artış gösterdiği izlenmiştir. Histidin-triptofan-ketoglutarat solusyonunun silymarin ile kombinasyonunun erken saatlerde, University of Wisconsin solusyonun silymarin ile kombinasyonun daha ileri saatlerde daha etkin olduğu gözlenmiştir.

Gerek ALT değerleri, gerekse antioksidan mekanizmalar açısından bakıldığında HTK+Silymarin grubunda hücrel koruyuculuğun, UW+Silymarin grubuna göre erken başlangıçlı olmasını, HTK solusyonunun UW solusyonundan vizkozitesinin daha düşük olması ,akışkanlığının daha hızlı olması ve önemli sonuç olarak daha hızlı soğutma yapabilmesine bağlamaktayız.

Jia R. ve arkadaşlarının sazan balıkları üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada karbon tetraklorür maruziyeti olan balıklara 60 gün boyunca 0,0.1,0.5 ve 1 gr/kg silymarin verilmiş 0.5 ve 1 gr/kg silymarin verilen balıklarda SOD,katalaz,Glutasyon peroxidaz ve total antioksidan kapasitenin anlamlı biçimde arttığı ve malondialdehit miktarında azaldığı gözlenmiştir[91]

Valentova K. ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada 10 hastaya 400 mg silymarin+295 mg L-arginin verilmiş, sonuç olarak serum  $\gamma$ -glutamil transferaz, malondialdehit düzeyi ve eritrosit glutasyon S-transferaz aktivitesinin azalmış olduğu görülmüştür. [92]

Gharagozloo ve arkadaşlarının 30 tane  $\beta$  talasemi major lu hasta üzerinde yaptığı çalışmada,verilen grupta TNF- $\alpha$  ve neopterin seviyelerinin azalıp,INF- $\gamma$  ve İL-4 seviyelerinin arttığı izlenmiştir,antioksidan,immünmodülatör etkileri yanında demir



şelasyonu etkisi sayesinde,kronik demir aşırı yüklenmesi tedavisinde de iyi bir adaydır.[93]

Richard S.Mangus ve arkadaşlarının 378 karaciğer transplanti hasta üzerinde yaptığı çalışmada HTK ve UW gruplarında greft ve hasta sağ kalımı, PNF bulguları ve postoperatif komplikasyonlar açısından istatistiksel hiçbir fark saptanmamıştır [94]. Yine Mangus ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, HTK'nın UW'ye nazaran daha hızlı ve kolay hipotermi sağladığı, organı kandan daha çabuk ve efektif temizlediği, buna karşılık UW'nin uzun soğuk iskemi süresine sahip greftleri daha iyi koruduğu belirtilmiştir [95]. Richard S. Mangus ve arkadaşlarının 698 standart ve genişletilmiş donör hepatektomi materyalleri üzerinde yaptığı bir başka çalışmada, postoperatif erken dönemde HTK grubunda enzim yüksekliği daha fazla iken, 1. aydan sonra her iki grupta fonksiyonların aynı düzeye indiği,fakat HTK'nın UW'ye göre biliyer komplikasyonlara daha az sebebiyet verdiği görülmüştür. Yine HTK'nın maliyeti açısından daha uygun olduğu üzerinde durulmuştur[96]

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar literatürdeki araştırmalar ile paralellik göstermekte, antioksidan mekanizmalarda artış ve oksidatif strese azalma görülmektedir.

Histopatolojik (immunohistokimyasal) inceleme sonuçlarında, apoptozis sayıları karşılaştırıldığında,UW ve UW+Silymarin grupları 0.saat karşılaştırılmasında anlamlı fark izlenmez iken ,UW ile UW+Silymarin grupları 6.saat ve 12.saat karşılaştırıldığında,UW+Silymarin grubunda anlamlı azalmalar izlenmiştir,HTK ile HTK+Silymarin gruplarına bakıldığında, aynı saat karşılaştırılmalarında,her 3 saattede apoptozis oranlarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar izlenmiştir.HTK+Silymarin grubundaki apoptozisteki azalmalar UW +Silymarin grubuna oranla daha başarılı bulunmuştur.Oksidatif stres ve antioksidan mekanizmalardaki sonuçlara paralel olarak UW grubunun etkinliği patoloji preperatlarında da geç başlangıçlı,HTK gruplarında yine erken başlangıçlı olduğu görülmüştür.

Chtourou Y. ve arkadaşlarının Wistar cinsi erkek ratlar üzerinde yaptığı çalışmada , manganiz klorid (20 mg/mL) maruziyeti sonrası 30 gün intraperitoneal silymarin (100 mg/kg) tedavisi ile ,meydana gelen oksidatif stres,karaciğer hasarı ve apoptoziste belirgin azalma görülmüştür.[97]

Khazim K. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; in vivo olarak tip 1 diabeti ve diabetik nefropatisi olan yüksek doz glukozu maruz kalan fare böbrek podositlerinde görülen % 60 süperoksit artışı,%100 nitrik oksit artışı ve %150 apoptotik hücre artışlarının, 10 mikromol silymarin kullanımı ile tamamen bloke edildiği görülmüştür.[98]

Gopalakrishnan R. ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada N-nitrosodiethylamine (NDEA) maruziyeti sonrası meydana gelen hepatoselüler kanserde silymarin tedavisinin apoptozisi artırıp anti-apoptotik protein ekspresyonunu azalttığı görülmüştür.[99]

Bousserouel S.ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ortotopik hepatokarsinomda silymarinin apoptozisi artışı bunuda TNF bağımlı apoptozis artırıcı ligand(TRAİL) caspase 3 ve 8 aktivasyonu yolu ile gerçekleştirdiği gösterilmektedir.[100]

Çalışmamızda ve literatürdeki sonuçlara bakıldığında silymarinin benign hücrelerde apoptozisi azalttığı fakat malign hücrelerde bunun tam tersine apoptotik mekanizmalarda artışa yol açtığı saptanmıştır.

Elektron mikroskopik incelemelerde ,incelenen gruplardan UW grubunda hepatositlerin nükleus sınırlarında orta derecede düzensizlik ve perinükleer aralıkta minimal düzeyde dilatasyon, kupffer hücrelerinin çok sayıda değişik çaplarda sekonder lizozomlar ve yer hepatositlerde ve sinuzoid endotelinde nekrotik dejenerasyona kadar ilerleyen ciddi hasar izlenirken,UW+Silymarin grubunda bu hasarın belirgin derecede azalmış olduğu izlenmiştir.

HTK grubunda yer yer az sayıda, küçük lizomlar ve lipid vakuolleri içeren hepatositlere rastlanırken,HTK+Silymarin grubunda normale en yakın ultrastrüktürel bulgular izlenmiştir.

Elektron mikroskopik incelemede hasar miktarı en fazla olan grup UW grubu iken, yine en iyi sonuç HTK+Silymarin grubunda izlenmiştir

Abdelmeguid NE. ve arkadaşlarının 90 tane Sprague Dawley cinsi erkek rat üzerinde yaptığı çalışmada ;sisplatinin tetiklediği karaciğer hasarında ,silymarinin sisplatin enjeksiyonundan 2 saat önce verilmesi elektron mikroskopik incelemede stoplazmik vakuolizasyonda,sinüzoid dilatasyonunda ve organel disorganizasyonunda anlamlı düzelme görülmesine yol açmıştır.[101]

HTK solusyonunun hepatoprotektif etkisi ve silymarin ile kombinasyonunda enzim değerlerinin anlamlı derecede düşüş göstermesi,histopatolojik ve elektron mikroskopik incelemelerdeki etkinliği göz önüne alınırsa; gruplar arasında yapılan karşılaştırmada HTK+S grubu hepatoprotektif etkinlik açısından en uygun grup olarak değerlendirilmiştir.

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

## 7.SONUÇ

- 1)Biyokimyasal,histopatolojik,elektron mikroskobik incelemeler sonucunda; HTK ve UW solusyonlarına silymarin eklenmesi ile hücrel koruyuculuğun artmış olduğu görülmüştür.
- 2) Elektron mikroskobik incelemede en fazla hasar UW grubunda izlenirken, en az hasar HTK+Silymarin grubunda izlenmiştir.
- 3)İncelenen gruplar içerisinde; ALT değerleri,histopatolojik ve elektron mikroskopik incelemeler açısından yapılan karşılaştırmalarda; en etkin grup HTK+Silymarin grubu olarak belirlenmiştir.
- 4)Prezervasyon solusyonlarına silymarin eklenmesiyle HTK gruplarında etkinliğin erken,UW gruplarında ise etkinliğin daha ileri saatlerde başladığı gözlemlenmiştir.Bunu HTK'nın daha hızlı, UW'nin daha yavaş soğutma yapabilmesine bağlamaktayız.
- 5)Prezervasyon solusyonları ile silymarin kombinasyonu hepatoprotektivite açısından sadece prezervasyon solusyonlarına göre daha olumlu sonuçlar vermekte,gelecekte hazırlanacak daha etkili koruma solusyonları için umut verici olmaktadır.

## KAYNAKÇA

1. Eren E. Donor Heart Preservation in Heart Transplantation. Turkish Journal of Cardiovascular Surgery 145–150. 2004. 12: p. 145-150.
2. M, H., Emiroğlu R. Karaciğer Transplantasyonu, Temel ve Sistematiğ Cerrahi ( Gulay H ), 1. basım, Bölüm III.4, İzmir, Güven Kitapevi, Cilt 1, sayfa 711-738, 2005.
3. RS, M., Wisecarver JL, Radio SJ, et al. Frozen section evaluation of donor livers before transplantation. Transplantation. 1993; 56: 1403– 09.
4. Morazzoni, P., et al., Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 1993. 18(3): p. 289-97.
5. Dehghani, S.M., et al., Comparison of Child-Turcotte-Pugh and pediatric end-stage liver disease scoring systems to predict morbidity and mortality of children awaiting liver transplantation. Transplant Proc, 2007. 39(10): p. 3175-7.
6. Siemionow, M. and E. Arslan, Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. Microsurgery, 2004. 24(6): p. 468-75.
7. Kayyali, U.S., et al., Phosphorylation of xanthine dehydrogenase/oxidase in hypoxia. J Biol Chem, 2001. 276(17): p. 14359-65.
8. Wiezorek, J.S., et al., Rapid conversion to high xanthine oxidase activity in viable Kupffer cells during hypoxia. J Clin Invest, 1994. 94(6): p. 2224-30.
9. Folden, D.V., et al., Malondialdehyde inhibits cardiac contractile function in ventricular myocytes via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. Br J Pharmacol, 2003. 139(7): p. 1310-6.
10. Kacmaz, A., et al., Octreotide improves reperfusion-induced oxidative injury in acute abdominal hypertension in rats. J Gastrointest Surg, 2004. 8(1): p. 113-9.
11. Thies, J.C., et al., Efficacy of N-acetylcysteine as a hepatoprotective agent in liver transplantation: an experimental study. Transplant Proc, 1997. 29(1-2): p. 1326-7.
12. Minor, T., S. Akbar, and R. Tolba, Value of alpha glutathione S-transferase for in vitro evaluation of preservation injury in normal and steatotic livers. Transpl Int, 2000. 13 Suppl 1: p. S551-4.
13. Fridovich, I., Superoxide radical: an endogenous toxicant. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1983. 23: p. 239-57.
14. HELLE, R.A., JESPER, B.N., FLEMING, N., 1997. Antioxidative Enzyme Activities in Human Erythrocytes. Clinical Chemistry, 43 (4): 562-68.
15. AKKUŞ, İ., Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya, 1. Baskı, 17.
16. Jenkins, R.R. and J. Tengı, Catalase activity in skeletal muscle of varying fibre types. Experientia, 1981. 37(1): p. 67-8.
17. Leinonen, J.S., et al., Immunohistochemical demonstration of carbonic anhydrase isoenzyme VI (CA VI) expression in rat lower airways and lung. J Histochem Cytochem, 2004. 52(8): p. 1107-12.
18. Vogel, G., et al., Protection by silibinin against Amanita phalloides intoxication in beagles. Toxicol Appl Pharmacol, 1984. 73(3): p. 355-62.
19. Desplaces, A., et al., The effects of silymarin on experimental phalloidine poisoning. Arzneimittelforschung, 1975. 25(1): p. 89-96.
20. Hruby, K., et al., Chemotherapy of Amanita phalloides poisoning with intravenous silibinin. Hum Toxicol, 1983. 2(2): p. 183-95.

21. Sabeel, A.I., J. Kurkus, and T. Lindholm, Intensive hemodialysis and hemoperfusion treatment of Amanita mushroom poisoning. *Mycopathologia*, 1995. 131(2): p. 107-14.
22. Salmi, H.A. and S. Sarna, Effect of silymarin on chemical, functional, and morphological alterations of the liver. A double-blind controlled study. *Scand J Gastroenterol*, 1982. 17(4): p. 517-21.
23. Buzzelli, G., et al., A pilot study on the liver protective effect of silybin-phosphatidylcholine complex (IdB1016) in chronic active hepatitis. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, 1993. 31(9): p. 456-60.
24. Feher, J., et al., [Liver-protective action of silymarin therapy in chronic alcoholic liver diseases]. *Orv Hetil*, 1989. 130(51): p. 2723-7.
25. Ferenci, P., et al., Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. *J Hepatol*, 1989. 9(1): p. 105-13.
26. Halim, A.B., et al., Biochemical effect of antioxidants on lipids and liver function in experimentally-induced liver damage. *Ann Clin Biochem*, 1997. 34 (Pt 6): p. 656-63.
27. Miguez, M.P., et al., Hepatoprotective mechanism of silymarin: no evidence for involvement of cytochrome P450 2E1. *Chem Biol Interact*, 1994. 91(1): p. 51-63.
28. Sonnenbichler, J., et al., Stimulatory effect of Silibinin on the DNA synthesis in partially hepatectomized rat livers: non-response in hepatoma and other malign cell lines. *Biochem Pharmacol*, 1986. 35(3): p. 538-41.
29. Dehmlow, C., J. Erhard, and H. de Groot, Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology*, 1996. 23(4): p. 749-54.
30. Fuchs, E.C., R. Weyhenmeyer, and O.H. Weiner, Effects of silibinin and of a synthetic analogue on isolated rat hepatic stellate cells and myofibroblasts. *Arzneimittelforschung*, 1997. 47(12): p. 1383-7.
31. Boigk, G., et al., Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. *Hepatology*, 1997. 26(3): p. 643-9.
32. Favari, L. and V. Perez-Alvarez, Comparative effects of colchicine and silymarin on CCl<sub>4</sub>-chronic liver damage in rats. *Arch Med Res*, 1997. 28(1): p. 11-7.
33. Baer-Dubowska, W., H. Szaefer, and V. Krajka-Kuzniak, Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. *Xenobiotica*, 1998. 28(8): p. 735-43.
34. Kim, D.H., et al., Silymarin and its components are inhibitors of beta-glucuronidase. *Biol Pharm Bull*, 1994. 17(3): p. 443-5.
35. Lang, I., et al., Hepatoprotective and immunological effects of antioxidant drugs. *Tokai J Exp Clin Med*, 1990. 15(2-3): p. 123-7.
36. D, B., . *Drug Store News for the Pharmacist* 4:58,60. 1994.
37. Pienaar, B.H., et al., Seventy-two-hour preservation of the canine liver by machine perfusion. *Transplantation*, 1990. 49(2): p. 258-60.
38. Markin, R.S., et al., Frozen section evaluation of donor livers before transplantation. *Transplantation*, 1993. 56(6): p. 1403-9.
39. Briceno, J., et al., Influence of marginal donors on liver preservation injury. *Transplantation*, 2002. 74(4): p. 522-6.

40. Compagnon, P., et al., Brain death does not affect hepatic allograft function and survival after orthotopic transplantation in a canine model. *Transplantation*, 2002. 73(8): p. 1218-27.
41. Cywes, R., 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*, 1993. 56(2): p. 316-23.
42. Upadhyya, G.A., et al., Effect of cold preservation on intracellular calcium concentration and calpain activity in rat sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*, 2003. 37(2): p. 313-23.
43. Arnault, I., et al., Combined effects of fasting and alanine on liver function recovery after cold ischemia. *Transpl Int*, 2002. 15(2-3): p. 89-95.
44. Upadhyya, G.A. and S.M. Strasberg, Glutathione, lactobionate, and histidine: cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and histidine/tryptophan/ketoglutarate liver preservation solutions. *Hepatology*, 2000. 31(5): p. 1115-22.
45. Aguilar, H.I., et al., Enhanced liver calpain protease activity is a risk factor for dysfunction of human liver allografts. *Transplantation*, 1997. 63(4): p. 612-4.
46. Upadhyya, A.G., et al., Evidence of a role for matrix metalloproteinases in cold preservation injury of the liver in humans and in the rat. *Hepatology*, 1997. 26(4): p. 922-8.
47. Topp, S.A., G.A. Upadhyya, and S.M. Strasberg, Leukocyte adhesion to cold-preserved rat endothelial cells: role of actin disassembly and ICAM-1. *Liver Transpl*, 2003. 9(12): p. 1286-94.
48. Imamura, H., et al., Role of Kupffer cells in cold ischemia/reperfusion injury of rat liver. *Gastroenterology*, 1995. 109(1): p. 189-97.
49. Imamura, H., A. Brault, and P.M. Huet, Effects of extended cold preservation and transplantation on the rat liver microcirculation. *Hepatology*, 1997. 25(3): p. 664-71.
50. Urata, K., A. Brault, and P.M. Huet, Effects of portal vein clamping time on rat liver microcirculation following extended cold preservation and transplantation. *Transpl Int*, 1999. 12(6): p. 408-14.
51. Kiuchi, T., et al., Background and prognostic implications of perireperfusion tissue injuries in human liver transplants: a panel histochemical study. *Transplantation*, 1998. 66(6): p. 737-47.
52. Urata, K., et al., Role of Kupffer cells in the survival after rat liver transplantation with long portal vein clamping times. *Transpl Int*, 2000. 13(6): p. 420-7.
53. Sindram, D., et al., Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. *Gastroenterology*, 2000. 118(1): p. 183-91.
54. Cywes, R., et al., Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat. *Hepatology*, 1993. 18(3): p. 635-47.
55. Schoenwaelder, S.M., et al., Calpain cleavage of focal adhesion proteins regulates the cytoskeletal attachment of integrin alphaIIb beta3 (platelet glycoprotein IIb/IIIa) and the cellular retraction of fibrin clots. *J Biol Chem*, 1997. 272(3): p. 1694-702.
56. Gow, A.J., S.R. Thom, and H. Ischiropoulos, Nitric oxide and peroxynitrite-mediated pulmonary cell death. *Am J Physiol*, 1998. 274(1 Pt 1): p. L112-8.

57. Takei, Y., et al., Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation*, 1991. 51(5): p. 959-65.
58. Jaeschke, H. and C.W. Smith, Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol*, 1997. 61(6): p. 647-53.
59. Bajt, M.L., A. Farhood, and H. Jaeschke, Effects of CXC chemokines on neutrophil activation and sequestration in hepatic vasculature. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. 281(5): p. G1188-95.
60. Clavien, P.A., H.A. Rudiger, and M. Selzner, Mechanism of hepatocyte death after ischemia: apoptosis versus necrosis. *Hepatology*, 2001. 33(6): p. 1555-7.
61. Le Moine, O., et al., Cold liver ischemia-reperfusion injury critically depends on liver T cells and is improved by donor pretreatment with interleukin 10 in mice. *Hepatology*, 2000. 31(6): p. 1266-74.
62. Vajdova, K., et al., Endotoxin-induced aggravation of preservation-reperfusion injury of rat liver and its modulation. *J Hepatol*, 2000. 32(1): p. 112-20.
63. Sindram, D., et al., Calpain inhibition prevents sinusoidal endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver. *Transplantation*, 1999. 68(1): p. 136-40.
64. Bessems, M., et al., Machine perfusion preservation of the pig liver using a new preservation solution, polysol. *Transplant Proc*, 2006. 38(5): p. 1238-42.
65. Butler, A.J., et al., Successful extracorporeal porcine liver perfusion for 72 hr. *Transplantation*, 2002. 73(8): p. 1212-8.
66. Lauschke, H., et al., Oxygenated machine perfusion mitigates surface antigen expression and improves preservation of predamaged donor livers. *Cryobiology*, 2003. 46(1): p. 53-60.
67. Demmy, T.L., et al., Organ preservation solutions in heart transplantation--patterns of usage and related survival. *Transplantation*, 1997. 63(2): p. 262-9.
68. Nardo, B., et al., Comparison of Celsior and University of Wisconsin solutions in cold preservation of liver from octogenarian donors. *Transplant Proc*, 2004. 36(3): p. 523-4.
69. Feng, L., et al., Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution vs. University of Wisconsin solution for liver transplantation: a systematic review. *Liver Transpl*, 2007. 13(8): p. 1125-36.
70. Ringe, B., et al., Safety and efficacy of living donor liver preservation with HTK solution. *Transplant Proc*, 2005. 37(1): p. 316-9.
71. Tolba, R.H., et al., Experimental liver preservation with Celsior: a novel alternative to University of Wisconsin and histidine-tryptophan-alpha-ketoglutarate solutions? *Eur Surg Res*, 2000. 32(3): p. 142-7.
72. Pirenne, J., et al., Type of donor aortic preservation solution and not cold ischemia time is a major determinant of biliary strictures after liver transplantation. *Liver Transpl*, 2001. 7(6): p. 540-5.
73. Rentsch, M., et al., Anti-ICAM-1 blockade reduces postsinusoidal WBC adherence following cold ischemia and reperfusion, but does not improve early graft function in rat liver transplantation. *J Hepatol*, 2000. 32(5): p. 821-8.
74. Mosbah, I.B., et al., Effects of polyethylene glycol and hydroxyethyl starch in University of Wisconsin preservation solution on human red blood cell aggregation and viscosity. *Transplant Proc*, 2006. 38(5): p. 1229-35.
75. Avolio, A.W., et al., Comparative evaluation of two perfusion solutions for liver preservation and transplantation. *Transplant Proc*, 2006. 38(4): p. 1066-7.
76. Basaran, O., et al., Comparison of two different liver storage techniques in rat liver model. *Transplant Proc*, 2003. 35(7): p. 2816-20.

77. Selzner, N., et al., Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology*, 2003. 125(3): p. 917-36.
78. Pries, J.M., A.B. Staples, and R.F. Hanson, The effect of hepatic blood flow on taurocholate extraction by the isolated perfused rat liver. *J Lab Clin Med*, 1981. 97(3): p. 412-7.
79. Goth, L., . A Simple Method for Determination of Serum Catalase Activity and Revision of Reference Range, *Clinical Chemical Acta* 196. 1991: p. 143-152.
80. M., U., Mihara, M., 1978, Determination Of Malonaldehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test, *Analytical Biochem* p. 279-286.
81. Greig, P.D., et al., Treatment of primary liver graft non-function with prostaglandin E1 results in increased graft and patient survival. *Transplant Proc*, 1989. 21(1 Pt 2): p. 2385-8.
82. CMB, M., Edwards V, Philips MJ, et al. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* p.; 46.178.
83. Flowers, M., et al., Prostaglandin E in the treatment of recurrent hepatitis B infection after orthotopic liver transplantation. *Transplantation*, 1994. 58(2): p. 183-92.
84. Lentsch, A.B., et al., Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*, 2000. 32(2): p. 169-73.
85. Peralta, C., et al., Liver ischemic preconditioning: a new strategy for the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc*, 2003. 35(5): p. 1800-2.
86. Camargo, C.A., Jr., et al., Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology*, 1997. 26(6): p. 1513-20.
87. Qing, D. and B. Han, Tolerance limits of liver grafts with 30 minutes of warm ischemia to cold preservation in swine. *Transplant Proc*, 2005. 37(1): p. 409-12.
88. Mandegary, A., et al., Hepatoprotective effect of silymarin in individuals chronically exposed to hydrogen sulfide; modulating influence of TNF-alpha cytokine genetic polymorphism. *Daru*, 2013. 21(1): p. 28.
89. Cacciapuoti, F., et al., Silymarin in non alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*, 2013. 5(3): p. 109-13.
90. Hajiaghahmohammadi, A.A., et al., Effects of metformin, pioglitazone, and silymarin treatment on non-alcoholic Fatty liver disease: a randomized controlled pilot study. *Hepat Mon*, 2012. 12(8): p. e6099.
91. Jia, R., et al., The protective effect of silymarin on the carbon tetrachloride (CCl4)-induced liver injury in common carp (*Cyprinus carpio*). *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2013. 49(3): p. 155-61.
92. Valentova, K., et al., Biosafety and antioxidant effects of a beverage containing silymarin and arginine. A pilot, human intervention cross-over trial. *Food Chem Toxicol*, 2013. 56: p. 178-83.
93. Gharagozloo, M., M. Karimi, and Z. Amirghofran, Immunomodulatory effects of silymarin in patients with beta-thalassemia major. *Int Immunopharmacol*, 2013.
94. Mangus, R.S., et al., Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution (HTK) and University of Wisconsin solution (UW) in adult liver transplantation. *Liver Transpl*, 2006. 12(2): p. 226-30.



95. Mangus, R.S., et al., Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution in intestinal and multivisceral transplantation. *Transplantation*, 2008. 86(2): p. 298-302.
96. Mangus, R.S., et al., Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution in extended criteria liver donors. *Liver Transpl*, 2008. 14(3): p. 365-73.
97. Chtourou, Y., et al., Therapeutic efficacy of silymarin from milk thistle in reducing manganese-induced hepatic damage and apoptosis in rats. *Hum Exp Toxicol*, 2013. 32(1): p. 70-81.
98. Khazim, K., et al., The Antioxidant Silybin Prevents High Glucose-Induced Oxidative Stress and Podocyte Injury in Vitro and in Vivo. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013.
99. Gopalakrishnan, R., et al., Dietary supplementation of silymarin is associated with decreased cell proliferation, increased apoptosis, and activation of detoxification system in hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biochem*, 2013. 377(1-2): p. 163-76.
100. Bousserouel, S., et al., Silibinin inhibits tumor growth in a murine orthotopic hepatocarcinoma model and activates the TRAIL apoptotic signaling pathway. *Anticancer Res*, 2012. 32(7): p. 2455-62.
101. Abdelmeguid, N.E., H.N. Chmaise, and N.S. Abou Zeinab, Silymarin ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in rats: histopathological and ultrastructural studies. *Pak J Biol Sci*, 2010. 13(10): p. 463-79.