



**T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL KONTROLLÜ NON-HEART BEATING
DONÖR MODELİNDE MET-RANTESİN KARACİĞER
HASARINI ÖNLEYİCİ ETKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. BİLSAY AKALIN

KAYSERİ – 2007



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL KONTROLLÜ NON-HEART BEATING
DONÖR MODELİNDE MET-RANTESİN KARACİĞER
HASARINI ÖNLEYİCİ ETKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. BİLSAY AKALIN

**Danışman
PROF. DR. ZEKİ YILMAZ**

KAYSERİ – 2007

TEŐEKKÖR

BaŐta tez danıŐmanım Prof. Dr. Zeki Yılmaz olmak üzere tüm hocalarıma, asistan ve hemŐire çalışma arkadaşlarıma, cerrahi hayattaki teneffüslerimin mimarı Hem. Sultan Gündüz'e, her zaman beni destekleyen, yetiŐtiren, eŐi bulunmaz aileme ve yaŐamın anlamı, yüreğiyle hep yanımda olan, hayatında olmaktan onur duyduğum eŐim Uzm. Dr. Olcay Akalın'a en içten dileklerle teŐekkör ederim.

Dr. Bilsay Akalın

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
KISALTMALAR	III
TABLO LİSTESİ	V
RESİM ve GRAFİK LİSTESİ	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1.KARACİĞER	4
2.1.1. Karaciğerin embriyolojisi	4
2.1.2 Karaciğerin histolojisi	4
2.2.KARACİĞERİN ANATOMİSİ	5
2.2.1.Yapısal Anatomi	5
2.2.2.Vasküler Anatomi	6
2.3.KARACİĞERİN FİZYOLOJİSİ	6
2.4.KARACİĞERİN GÖREVLERİ	6
2.5. KARACİĞER TRANSPLANTASYONU	7
2.6. KARACİĞERDE İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI	10
2.7. NON-HEART BEATING DONÖRLER	12
2.8. RANTES VE MET-RANTES	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
4. BULGULAR	28
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇLAR	54
7. KAYNAKLAR	56
ONAY SAYFASI	

KISALTMALAR

A	: Arteria
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATP	: Adenozin trifosfat
Bcl-2	: B cell lenfoma-2
DNA	: Deoksiribonükleik asit
GMCSF	: Granüosit makrofaj koloni stimüle edici faktör
g	: Gram
HBD	: Heart beating donör
H&E	: Hemotoksilen-Eozin
HTK	: Histidin triptofan ketoglutarat
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
IM	: Işık mikroskopisi
IL	: İnterlökin
ICAM-I	: İntrasellüler adezyon molekülü-1
İHK	: İmmünohistokimya
KCL	: Potasyum klorür
LDH	: Laktat dehidrogenaz
NHBD	: Non-heart beating donör
PCNA	: Prolifere olan hücre nükleer antijeni
RANTES	: Regulated upon activation normal T cell expressed secreted
SC	: Subkutan
SOR	: Serbest oksijen radikalleri

TNF : Tumor nekroze edici faktör
TGF : Transforming growth faktör
VCAM-I : Vasküler hücre adezyon molekülü
WU : Wisconsin Üniversitesi
μ : Mikro

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 :	Karaciğerde oluşan hasara ait histopatolojik değişikliklerin derecelendirilmesi, Suzuki skorlaması	25
Tablo 2 :	Kontrol ve çalışma gruplarında perfüzetlerin AST ve ALT değerleri..	30
Tablo 3 :	Sham, kontrol ve çalışma gruplarının PCNA değerleri	30
Tablo 4 :	Sham, kontrol ve çalışma gruplarının bcl-2 boyanma yüzdeleri.....	30
Tablo 5 :	Sham, kontrol ve çalışma gruplarının konjesyon oranları	31
Tablo 6 :	Sham, kontrol ve çalışma gruplarının vakuolizasyon oranları	31
Tablo 7 :	Sham, kontrol ve çalışma gruplarının nekroz oranları.....	32

RESİM VE GRAFİK LİSTESİ

- Resim 1** : Çıkarılan ve perfüzyon için hazırlanan(portal ven ve vena kava kateterize) karaciğer dokusu..... 24
- Resim 2** : PCNA ile işaretli hepatositler (İHKx400).Sham grubu (A) ve Çalışma grubu (B) 35
- Resim 3** : Bcl-2 ile işaretli hepatositler Sham grubu (İHKx200)(A) ve Çalışma grubu (İHKx100)(B) 36
- Resim 4** : Sham grubu konjesyon ışık mikroskopi A (x100), B (x200) 37
- Resim 5** : Kontrol grubu konjesyon ışık mikroskopi A (x100), B (x200)..... 38
- Resim 6** : Çalışma grubu normal karaciğer dokusu ışık mikroskopi A (x100), B (x200) 39
- Resim 7** : Sham grubu tek hücre nekrozları (IMx200)..... 40
- Grafik 1** : Kontrol ve çalışma grupları perfüzetlerin AST ve ALT değerlerinin karşılaştırılması 32
- Grafik 2** : Sham, kontrol ve çalışma gruplarında bcl-2 boyanma yüzdelerinin karşılaştırılması 33
- Grafik 3** : Sham, kontrol ve çalışma gruplarında konjesyon oranlarının karşılaştırılması 33
- Grafik 4** : Sham, kontrol ve çalışma gruplarında vakuolizasyon oranlarının karşılaştırılması 34
- Grafik 5** : Sham, kontrol ve çalışma gruplarında nekroz oranlarının karşılaştırılması 34

DENEYSEL KONTROLLÜ NON-HEART-BEATING DONÖR MODELİNDE MET-RANTESİN KARACİĞER HASARINI ÖNLEYİCİ ETKİSİ

ÖZET

Bu deneysel çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM), Ekim-Aralık 2006 tarihleri arasında gerçekleştirildi.

Amaç: Sıçanlarda deneysel kontrollü non-heart beating donör modelinde, met-rantesin karaciğer hücre canlılığına etkisini ve bu tür greftlerin kullanılabilirliğini araştırmak.

Materyal ve Metod: Çalışmada ağırlığı 225-290 gram arasında değişen, 30 adet Wistar-Albino erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlardan sham, kontrol ve çalışma grubu şeklinde 3 grup oluşturuldu. Her bir grup 10 sıçan içeriyordu. Sıçanlara kardiyak arrest yapıldığı için anestezi madde verilmedi. Kardiyak arrestten önce tüm sıçanlara 0,1 ml heparin subkutan olarak uygulandı. Kontrol grubundaki deneklere kardiyak arrestten 2 saat önce 0,5 ml SF ve çalışma grubundakilere 1µg/kg met-rantes intraperitoneal yolla verildi. Sıçanlara 0,2 ml intrakardiyak KCL verilerek kardiyak arrest sağlandı. Organ çıkarılması ile kardiyak arrestin oluşması arasındaki bekleme süresi 30 dk idi. Her bir sıçana orta hat insizyon ile total hepatektomi uygulandı. Falsiform ligament kesilerek karaciğer serbestleştirildi. Tüm bağları açılarak karaciğer total olarak disseke edildi. Yukarıda vena kava ve alt tarafta vena porta disseke edilerek serbestleştirildi. Daha sonra lumenine uygun (3,5 french) bir katater yardımıyla portal ven kataterize edildi. Bu katater yardımıyla 50 ml Euro Collins solüsyonu ile invivo olarak karaciğer yıkandı. Total olarak çıkarılan karaciğerler sirkulatuar bir sistem yardımıyla HTK solüsyonu ile 60 dk perfüze edildi. AST ve ALT ölçümleri için perfüzyon sıvıları, ışık mikroskopisi ve İHK çalışmaları için de karaciğerler uygun koşullarda saklandı.

Bulgular: AST ve ALT değerleri, met-rantes verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı daha düşük bulundu ($p<0,05$). Gruplar; konjesyon, vakuolizasyon açısından karşılaştırıldığında met-rantes verilen grupta parametreler istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p<0,05$). PCNA işaretlenme oranları ve nekroz açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark

saptanmadı ($p>0,05$). Bcl-2 boyanma yüzdeleri açısından karşılaştırıldığında met-rantes grubunda istatistiksel olarak anlamlı düşük boyanma tespit edildi ($p<0,05$)

Sonuç: Met-rantes, deneysel kontrollü non-heart beating donör modelinde hepatosit viabilitesini, biyokimyasal ve morfolojik açıdan artırmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Met-rantes, NHBD, sıcak iskemi, bcl-2

THE EFFECT OF MET-RANTES ON LIVER DAMAGE IN CONTROLLED EXPERIMENTAL NON-HEART-BEATING DONOR MODEL

ABSTRACT

This experimental study has been performed in Hakan Çetinsaya Experimental and Clinical Research Center (DEKAM) at Erciyes University Medical Faculty between Oct–Dec 2006.

Aim: The aim of this study is to investigate the effect of met-rantes on viability of hepatocytes in experimental controlled non-heart beating donor models of rats and additionally to determine the usefulness of these grafts.

Materials and Methods: Thirty Wistar–Albino male rats weighing between 225 and 290 gr were used in this study. The rats were divided into three groups as sham, control and study groups. Each of these groups included 10 rats. No anesthetic agents were given to rats because cardiac arrest was performed. Before the cessation of cardiac activity 0,1 ml heparin was administered subcutaneously to each of the rats. 0,5 ml saline was given to control groups and 1µgr/kg met-rantes was given, by intraperitoneal way to study group 2 hours before cardiac arrest. Cardiac arrest is performed by intracardiac 0,2 ml KCL injection. The waiting interval between cessation of cardiac activity and organ retrieval was 30 minutes. Midline laparotomy incision and total hepatectomy was performed to each rat. After dissection of vena cava and portal vein hepatic grafts were retrieved. Then a suitable catheter was inserted into the portal vein. Liver grafts were washed out with 50 ml euro collins solution via portal vein catheter. Liver grafts which were dissected totally had been perfused for 60 minutes with HTK solution by using a circulator system. During this period samples were taken to asses hepatocellular injury. AST and ALT levels were measured in perfusion fluids. The grafts were saved under suitable conditions for hystopathologic assesment.

Results: AST, ALT levels were significantly lower in met-rantes group ($p<0.05$). Congestion and vacuolisation was significantly lower in met-rantes group when compared with other groups ($p<0.05$). When necrosis and PCNA labeling

index was evaluated there was no statistically difference between the groups ($p>0,05$). In met-rantes group amounts of bcl-2 was statistically lower when compared with the other groups ($p<0,05$).

Conclusion: Met-rantes increases the viability of hepatocytes biochemically and morphologically in experimental controlled non-heart beating donor models of rats.

Key Words: Met-rantes, non-heart beating donor, warm ischemia, bcl-2

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son dönem karaciğer hastalığının tek tedavisi karaciğer transplantasyonudur. Ancak organ bekleyen hasta sayısının giderek artması ve buna paralel olarak donör sayısının artmaması transplantasyonu sınırlamaktadır (1).

Günümüzde organ nakillerindeki en önemli sorunlardan biri donör organ sayısının yetersizliğidir. Başlıca organ kaynakları canlı donörler ve beyin ölümü gerçekleşmiş hastalardır. Ancak bu organlar da şu an için yetersiz kalmaktadır. Solunumu ventilatörde devam eden, kardiyak arrest olmamış, beyin ölümü gerçekleşmiş hastalar halen kullanılmakta olan başlıca organ kaynaklarıdır. Son yıllarda donör havuzunu genişletmeye yönelik olarak kardiyorespiratuar arrest olmuş non–heart beating donörler (NHBD) önem kazanmış ve ilgi odağı haline gelmiştir. NHBD’lerin böbrek ve karaciğer transplantasyonunda kullanıma girmesiyle organ havuzu yaklaşık %20 oranında artırılmıştır (2).

Karaciğer yetmezliği olan hastalarda transplantasyon en başarılı tedavi modalitesidir. Bu hastalarda 1 ve 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %87 ve %73’tür. Bununla birlikte organ sayısının azlığı nedeniyle bekleyen hastaların bir kısmı daha bekleme listesindeyken kaybedilmektedir (3).

Erken NHBD greft surveyleri ile ilgili çalışmalar bir yıllık sağkalımın %73–91, beş yıllık sağkalımın %58–80 oranlarında olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar kadaverik heart beating donör transplantlarla karşılaştırılabilir düzeydedir (2).

Kadaverik heart beating donörün (HBD) ölümü, beyin sapı fonksiyonlarının irreversibl kesilmesine dayanmaktadır. NHBD’lerin ölümü ise sirkülatuar ve

respiratuar fonksiyonların irreversibl durmasına dayanmaktadır. Kadaverik HBD'lerde beyin ölümü gerçekleşmiştir, ancak kardiyorespiratuar sistem çalışmaktadır. Bu nedenle beyin ölümlü donörlerde organ iskemisi minimaldir çünkü sirkülatuar arrest, solüsyonların perfüzyonu ile eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir. Oysa NHBD'lerde organlar daha az idealdir. Çünkü perfüzyon öncesi uzamış sirkülatuar arrest nedeniyle organlar iskemiyeye maruz kalmaktadırlar (3).

Son dönem karaciğer hastalığı birçok nedenle oluşabilmektedir. Son dönem karaciğer yetmezliği gelişen hastalar genel olarak medikal tedavilerden küratif fayda görememekte-dirler. Bu hastalarda uygun donör bulunabilirse en etkili ve kesin tedavi seçeneği karaciğer nakli olmaktadır. Son zamanlarda nakil oranlarının artması ve operasyonların başarısı, bu hasta grubunda umut verici olmaktadır. Ancak yine bu konudaki en önemli problem organ azlığı nedeniyle bekleme listelerinin kalabalıklaşmasıdır. Organ bulunmasındaki sıkıntı ve organ azlığı nedeniyle çalışmalar eskiden marjinal donör sayılan organların nakil operasyonlarında kullanılabilirliğini gündeme getirmiştir.

Uzun zamandır marjinal donör olarak adlandırılan ve fonksiyonları ve viabilitesi açısından diğer donörlerden daha kötü durumda olan hastaların verici haline getirilmesi ile organ havuzları anlamlı oranda artırılmaktadır. Kadaverik HBD'ler ile NHBD'ler arasındaki ana farklılık akut inflamatuar bir süreç oluşturan iskemi–reperfüzyon sürecidir. Beyin ölümü donörde proinflamatuar adezyon moleküllerinin ekspresyonunu indüklemektedir (4).

Gomez ve ark. NHBD'ler ile HBD'lerin böbrek biopsilerini karşılaştırdıkları çalışmalarında; NHBD'lerin biopsilerinde daha yüksek düzeyde rantes, ICAM–I ve VCAM–I gen ekspresyonunu göstermişlerdir. Ayrıca transplantasyon öncesi yüksek rantes düzeyleri ile akut rejeksiyon arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir (4).

İskemik hücrelerde kanın reperfüzyonu vasküler ve parankimal hücrelerde yaralanmaya yol açan bir takım mekanizmaların aktifleşmesiyle sonuçlanmaktadır. Bunlar kompleman depolanması, adezyon moleküllerinin ekspresyonu, inflamatuar hücre infiltrasyonu ve sitokin salınımı ile karakterizedir.

İskemi reperfüzyon sürecinde mikrovasküler endotelde inflamasyon oluşur. Trombositlerden degranülasyon ile rantes açığa çıkar. Çoğu doku IL-1 ve TNF alfa gibi proinflamatuvar stimuluslara cevap olarak rantes üretmektedir. Rantes endotel yüzeyindeki reseptörlerine bağlanır ve dolaşan lökositleri yüzeye çeker (5).

Hücre hasarına neden olan endotelial hücreler ile inflamatuvar hücreler arasındaki etkileşimlerde; rantes, ICAM-I ve VCAM-I'in önemli rollerinin bulunduğu dair kanıtlar mevcuttur. Ayrıca Gomez ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sıcak iskemi ile bu molekül düzeyleri arasında pozitif bağlantı olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle sıcak iskemi süresinin uzun olduğu NHBD'lerde rantesin blokajının proinflamatuvar süreçleri hafifleteceği düşünülmektedir (4).

Bu çalışmada amaç, kontrollü NHBD modelinde kardiyak arreste maruz kalmış karaciğerde iskemik ve nekrotik değişikliklerin met-rantes ile azaltılması ve bu organların kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer

2.1.1. Embriyoloji

Karaciğer, ön barsağın (foregut) endoderminden ve septum transversumun mesoderminden köken alır. Dört haftalık embriyoda, ön barsağın daha sonra duodenumun gelişeceği ventral bölgesinde bir divertikül meydana gelir. Divertikülün kaudal bölümü duktus sistikus ve safra kesesi şeklinde gelişir. Kranial bölümden ise karaciğer meydana gelir (6).

2.1.2. Histoloji

Karaciğer, dolaşım sistemi ile sindirim sistemi arasında alış-veriş sağlayan bir geçiş bölgesidir. Vücuda sindirim sistemi ile giren sıvı, elektrolit ve gıda maddeleri karaciğer tarafından işlenerek hücreler ve dokuların kullanımına uygun hale getirilir. Bu maddelerin depolanıp gerektiğinde kana verilmesi yanında oluşan metabolitler ile açığa çıkan toksinlerin nötralizasyonu ve atılması aşamasında da kilit rol oynar. Bu görevleri yapabilmesi için sindirim sistemi ile dolaşım sisteminin birleşim noktasında bulunur (6).

Karaciğerin fonksiyonel histolojisi

Karaciğerin histolojisinde lobül adı verilen yapısal birimler görülür. Klasik lobül yapısında ortada bir hepatik ven dalı (santral ven veya terminal hepatik venül) bulunur. Bu ven dalından periferine doğru ışınal biçimde sinüzoidler ve parankim

hücreleri uzanır. Bu altıgen yapının köşelerinde içinde portal ven, hepatik arter ve safra kanalının uç dallarının bulunduğu portal triadlar yerleşmiştir (6–8).

Karaciğerin asıl yapısını hepatositler oluşturur. Hepatositler karaciğer hücre kitlesinin %60 ını oluştururlar. Sinüzoidler ortalama 10 mikrometre çapındadır. Portal ven ve hepatik arterin uç dalları sinüzoidlerle temas halindedir. Portal ven ve hepatik arter kanı sinüzoidlerde karışır. Sinüzoidler terminal hepatik venüllere drene olurlar. Terminal hepatik venüller birleşerek, sonunda hepatik venleri oluştururlar ve vena cava inferiora drene olurlar. Sinüzoidlerin endotel tabakası ile hepatositler arasında “Disse” aralığı denilen boşluk vardır, bu kısımda karaciğer lenf sıvısı oluşur. Endotel tabakası hücreleri arasında aktif fagositoz görevi olan Kupffer hücreleri bulunur, bu hücreler endotel hücrelerinin lümenine bakan yüzeyinde yerleşmiştir kupffer hücreleri tipik makrofajlardır (6, 9–14).

2.2. Karaciğerin anatomisi

2.2.1. Yapısal Anatomi

Karaciğer vücudun en büyük solid organı olması yanında, deriden sonraki ikinci en büyük organdır. Karında sağ üst kadranda diyafragmanın altında yerleşmiştir. Ağırlığı yetişkin erkekte 1400–1800 g, kadında 1200–1400 g arasında değişmektedir, bu da yetişkin vücut ağırlığının yaklaşık %2'sine karşılık gelir. Karaciğer yenidoğanda vücut ağırlığının %5'i iken bu oran yaş ilerledikçe azalır (15, 16).

Karaciğer bulunduğu bölgeye ligamentleri vasıtasıyla asılıdır. Karaciğeri falsiform, teres hepatis ve koronar ligamentler karın ön duvarına ve diafragmağa bağlar. Karaciğeri örten glisson kapsülü iki yaprağa ayrılarak diafragmağa yapışır, bu iki yaprak “anterior ve posterior koronar ligamentler” adını alır. Bu ligamentler sağda ve solda “triangüler” ligamentleri oluşturur, önde birleşerek “falsiform” ligamenti meydana getirirler. Falsiform ligament karaciğeri karın ön duvarına asar. Diğer bir ligament olan hepatoduodenal ligament içinde koledok, hepatik arter ve vena porta bulunur. Lig. hepatogastrikum da karaciğeri yerinde tutan ligamentlerden biridir (11, 15).

Portal pediküllerin dağılımı ve bunların hepatik venlerle olan ilişkisi, safra yolları ve arteryel anatomi göz önüne alınarak karaciğer segmentlere ayrılmıştır.

Buna göre sağ lobda segment 5, 6, 7, 8 ve sol lobda, segment 2, 3, 4 vardır. Segment 4, falsiform ligamentin sağında segment 2, 3 ise solunda yer alır (16, 17).

2.2.2. Vasküler anatomi

Karaciğere gelen kan diğer organların aksine arteriyel sistem kanı yanında, venöz kanı da içerir. Karaciğere dakikada 1500 ml. kan gelir. Bu miktarın %25'ini hepatik arter, %75'ini portal ven karşılar. Karaciğerin oksijen ihtiyacının %50'sini hepatik arter, %50'sini portal ven karşılar (1, 7). Splenik ven ve superior mezenterik ven pankreas boynu hizasında birleşirler, inferior mezenterik ven de bu venlere katılır ve portal ven oluşur. Mide, ince ve kalın barsaklar, pankreas ve dalaktan gelen venöz kanı karaciğere taşıır. Portal ven dalları karaciğer içinde segmentlere göre dağılım gösterir. Portal ven defalarca dallanarak portal triadlara ulaşır (7, 18, 19).

Karaciğerin venöz drenajını üç major hepatik ven sağlar. Sağ lobun kanı sağ hepatik ven ile inferior vena kavaya boşalır. Sol hepatik ven 2. ve 3. segmentlerin kanını alır, orta hepatik venle birleşmek üzere yukarı yönde parankim içinde oldukça yüzeysel bir durumda seyredir. Orta hepatik ven genellikle sol hepatik venle birleşip tek trunkus halinde inferior vena kavaya açılır Segment 1 (kaudat lob)'in venöz drenajı ise doğrudan vena kava inferioradır ve üç ana hepatik venden bağımsızdır (10, 11, 20–22).

2.3. Karaciğerin fizyolojisi

Karaciğer fizyolojik olarak birçok göreve sahiptir. Bunların başında kandan gelen besin maddelerinin alımı, depolanması ve dağılımı gelir. Ayrıca vücudun normal işlevleri için gerekli birçok endojen ve eksojen substratların sentezlenmesi, metabolizması ve atılımı ile vücuda zararlı toksinlerin temizlenmesi gibi fonksiyonlara da sahiptir (16, 23).

2.4. Karaciğerin görevleri

Karaciğerin karbonhidrat metabolizmasında glikojen depolama, glukoz yapımı, glukoneogenez ve karbonhidrat metabolizmasının kimyasal ürünlerinin organizmadan uzaklaştırılması gibi görevleri vardır. Yağ metabolizmasındaki görevleri yağ asitlerinin beta oksidasyonu ve asetoasetik asit oluşumu, lipo–

proteinlerin çoğunun yapımı, kolesterol ve fosfolipid sentezi, karbonhidrat ve proteinlerin yağa çevrilmesidir (24–27).

Karaciğerin aminoasitlerin deaminasyonu, plazma proteinlerinin sentezi, vücut sıvılarından amonyağın temizlenerek üre oluşumu ve değişik aminoasitlerin sentez ve birbirine dönüşümü gibi görevleri mevcuttur. Bu fonksiyonların sadece karaciğer tarafından yürütülmesi, başka organların bu fonksiyonları geçici veya kalıcı olarak yerine getirememesi, karaciğeri, protein metabolizması açısından alternatifsiz kılmaktadır (24).

Vücutta demir esas olarak hemoglobindeki hem molekülünde bulunur. Bu demir haricinde demirin büyük bir kısmı karaciğerde ferritin olarak depolanmaktadır. (7, 24). Karaciğer retikuloendotelial sistemdeki kupffer hücreleri aracılığı ile bakterilerin, boya maddelerinin ve diğer artıkların fagositoz yoluyla kandan temizlendikleri büyük bir filtre rolünü oynar. A, D, E, K ve B₁₂ vitaminlerinin ana deposu karaciğerdir (28).

Pıhtılaşma proteinlerinden; fibrinojen, protrombin ve V, VII, VIII, IX, X, XI ve XII. faktörlerin sentezi karaciğerde yapılır. Karaciğer safra asitlerini kolesterolden sentez eder ve safra, kolesterolün vücuttan atıldığı başlıca yoldur. Safranın hemen tamamı, başlıca distal ileumda olmak üzere, ince barsaklarda geri emilir ve günde altı–on kez olmak üzere enterohepatik dolaşıma girer (7, 24).

2.5. Karaciğer transplantasyonu

Organ transplantasyonları arasında karaciğer transplantasyonu önemli farklılıklar gösterir. Günümüze kadar transplantasyonu yapılan organlar arasında teknik açıdan en güç olanı şüphesiz ki karaciğer transplantasyonudur. Teknik özelliklerinin yanında karaciğer metabolizmasının oldukça kompleks olması transplantasyon sonrasında önemli sorunlara yol açmaktadır. Böbrek hastalıklarında uygulanabilen diyaliz gibi bir yöntemin karaciğer için olmaması transplantasyonu daha da güçleştirmektedir. Tüm bu güçlüklerle rağmen karaciğer transplantasyonu günümüzde başarı ile uygulanabilen altın standart tedavi modalitesidir. Karaciğer transplantasyonunun başarı ile yapılabilirliği şüphesiz immünsüpresyon ve teknikteki gelişmelere bağlıdır (29).

Karaciğer transplantasyonu literatürde ilk olarak Welch tarafından 1955'de köpek modelinde yapılmıştır. 1963'de Starzl tarafından insan karaciğer transplantasyonu çalışmaları başlatılmıştır ve insanda karaciğer transplantasyonu başarı ile yapılmıştır. 1960–70'lerde de Starzl ve Calne transplantasyon çalışmalarına devam etti. Survey oranları ilk yıllarda %50'nin altındaydı ancak teknik ve postopertatif hasta tedavi ve takibindeki gelişmelere paralel olarak survey oranları zamanla iyileşmiştir (1).

1980'li yıllarda siklosporin ile immunsupresyon ve teknikteki gelişmeler sağlandıkça (venö–venöz bypass ve Wisconsin üniversitesi solüsyonu) transplantasyon sonuçları da düzelmeye başladı (1).

1990'lı yıllarda karaciğer donör havuzunu genişletme çabalarına ağırlık verildi ve NHBD'ler ilgi odağı haline geldi. Günümüzde de bu tip marjinal donörlerin havuza dahil edilmesi konusunda karşıt fikirlerin tartışması devam etmektedir. Bu donörlerin havuza dahil edilmesi ile bekleyen hasta listelerinin kalabalıklığı azalmaktadır ve hastalar transplantasyon şanslarını durumları kötüleşmeden kullanabilmektedir. Transplantasyon modalitesinde bu tür greftlerin kullanılması geleceğe dönük umut vadetmektedir (1).

Ülkemizde de Haberal ve arkadaşları 1989 yılında karaciğer transplantasyonunu başarıyla uygulamaya başlamışlardır. Karaciğer ektopik bir lokalizasyonda ikinci bir organ olarak heterotopik veya hasta karaciğer çıkarılarak onun yerine ortotopik olarak transplante edilebilir. Bugün daha sıklıkla kullanılan ve sonuçları daha iyi olan ortotopik karaciğer transplantasyonudur (29).

Karaciğer transplantasyonu yapılan hastaların listesi giderek büyümektedir. Genel anlamda irreveribl yetmezliğe yol açan tüm hastalıklarda karaciğer transplantasyonu yapılabilmektedir. Erişkinlerde en sık endikasyonlar kronik aktif hepatit, kriptojenik siroz, primer bilier siroz ve konjenital metabolizma defektleridir. Çocuklarda ise bilier atrezi ilk sırayı alırken konjenital metabolizma defektleri ikinci sırayı almaktadır. Bunların yanında primer ve metastatik karaciğer tümörlerinde de transplantasyon başarıyla uygulanmaktadır (29).

Karaciğer transplantasyonu akut ya da fulminan hastalıklar dolayısıyla geri dönüşümsüz karaciğer yetmezliği tedavisinde, daha yaygın olarak da kronik

karaciğer hastalıkları tedavisinde endikedir. Fulminan hepatik yetmezliğin etyolojisi genellikle bilinmemektedir. Fakat viral hepatite, wilson hastalığına, hepatotoksik kimyasallara ve alkolik hepatite sekonder olarak gelişebilmektedir. Fulminan karaciğer yetmezliği olan hastalarda transplantasyonun prognozu kronik karaciğer yetmezliği olanlara göre daha kötüdür. Çünkü operasyon öncesi hastaların vitalleri stabil değildir ve sıklıkla kronik hastalara göre daha fazla ek problemlere sahiptirler. Fulminan hastalık için transplantasyon yapılanlarda survey oranı yıllık %70 civarındadır (1).

Alkolik karaciğer hastalığı olanlar potansiyel olarak transplantasyondan en fazla fayda gören hasta grubudur. Metabolik defektlere bağlı karaciğer hastalıklarında da başarılı sonuçlar alınabilmektedir. Doğuştan metabolizma bozukluklarında da altın standart tedavi modalitesi karaciğer transplantasyonudur (1).

Malign hastalıklar için yapılan transplantasyon sonuçları beklenildiği gibi benign nedenlerle yapılanlardan daha kötüdür. Hepatoma ve kolanjiokarsinomlar mikrometastazlar nedeniyle transplantasyon öncesinde yayılmış olabilirler ve bu da transplantasyon sonrası surveyi kötü yönde etkilemektedir. Karaciğer dışı maligniteye sahip hastalarda transplantasyon öncesi, karaciğer dışı malignite için mutlak 2 yıllık hastaliksız dönem sağlanmalıdır (1).

Multiorgan yetmezlikli hastalarda transplantasyon sonrası yüksek mortalite kaçınılmazdır. Karaciğer dışından kaynaklanan septik olaylar transplantasyon için kesin kontrendikasyon oluşturur. Ancak septik odak karaciğerde ise (karaciğer absesi, sirotik karaciğerde kolanjit) karaciğer transplantasyonu tedavi için uygundur.

İmmüsupresif tedaviye uyumsuzluk, medikal tedaviye uygunsuzluk da sonuçları kötüleştirir. Aktif alkolizm ve ilaç bağımlılığı rölatif kontrendikasyonlar olarak söylenebilir. Ciddi kardiyak ve pulmoner hastalıklar yüksek mortalite ile ilişkili olduğu için karaciğer transplantasyonu bu hastalarda kontrendikedir. Dissemine malignite varlığı transplantasyon için tartışılmaz kontrendikasyon oluşturmaktadır (1).

Yaşam beklentisini azaltan eşlik eden irreversibl kardiyak ve pulmoner hastalıklar gibi ciddi sağlık problemleri ve cilt kanseri hariç maligniteleri olan hastalarda transplantasyon kontrendikedir. Madde bağımlılığı, uyumsuz kişilik,

kontrol edilemeyen psikiyatrik hastalıklar psikososyal kontrendikasyonlar olarak sayılmaktadır. Hem portal hem de mezenterik venlerde geniş tromboz ve vücut kütle indeksinin 35'in üzerinde olması da teknik kontrendikasyonlar arasında sayılabilir (29).

2.6. Karaciğerde iskemi–reperfüzyon hasarı

İskemi–reperfüzyon hasarı cerrahi uygulamalarda sık karşılaşılan bir fenomendir. Oksijen yokluğunda oksidatif fosforilasyon yapılamaz ve ATP yapımı azalır. Anaerobik metabolizma ile laktik asit yapımı artar ve laktik asidoz gelişir (30, 31). İskemik dokuların reperfüzyonu ile dokunun enerji ihtiyacı sağlanır ve toksik metabolitler uzaklaştırılır. Ancak reperfüzyon ile toksik metabolitlerin sistemik dolaşıma geçmesi ciddi bir dizi metabolik patolojiye neden olabilir. Paradoksal olarak reperfüzyonla ortaya çıkan hasar, iskemik süreçteki hasardan daha fazla olmaktadır (32).

Karaciğer tarafından tolere edilebilen normotermik iskeminin üst süresi tam olarak bilinmemektedir. Günümüzde elektif şartlarda yapılan karaciğer rezeksiyonlarında, portal triad klempaj süresinin 90 dakikaya kadar uzatılabileceği kabul edilmektedir (33, 34). İskeminin 90 dk'dan uzun sürelerde, karaciğerde geri dönüşümsüz değişikliklere neden olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (35, 36).

Reperfüzyon hasarından sorumlu olduğu bilinen birçok spesifik mekanizma varken, özellikle karaciğerde reperfüzyon hasarı tam olarak aydınlatılamamıştır. Karaciğerdeki iskemi–reperfüzyon hasarı değişik mekanizmalarla açıklanmaya çalışılmıştır. Hasara neden olan faktörler; serbest oksijen radikalleri, lökosit migrasyonu ve aktivasyonu, sinüzoidal endotelial hücre hasarı, mikrosirkülasyondaki düzensizlikler, hücre adezyon moleküllerinin artması ve koagülasyon sisteminin aktivasyonu olarak özetlenebilir (37–40). İskemiye sekonder aktif transmembran transport yetmezliği, buna bağlı endotelial ve kupffer hücre şişmesi ve intrasellüler ödem ortaya çıkar. Vazokonstriksiyon, sinüzoidal lümeni daraltarak lökosit akışkanlığını azaltır, hepatik mikrosirkülasyondaki sinüzoidal akıma engel olur ve hipoksi süresi uzar (40). İskemi–reperfüzyon sırasında kupffer hücreleri ve nötrofiller aktive olur. Bu hücrelerden inflamatuvar sitokinler, proteazlar, TNF, lökotrienler gibi toksik mediatörler ortaya çıkar. Tüm bu maddelere de cevap

olarak hücre adezyon molekülleri ve rantes artmaktadır. Ayrıca aktive olmuş kupffer hücrelerinin prostoglandin ve tromboksanlar da salgıladığı bilinmektedir (41, 42).

Karmaşıklığa rağmen reperfüzyon hasarının, hepatik rezeksiyon ve transplantasyon yapılan deneysel çalışmalarda farmakolojik olarak baskılanması başarılmıştır. Bu da deneysel modellerin klinikte uygulanabileceği ümidini vermektedir (43, 44).

Normal koşullarda insan karaciğeri 3 gün içinde rejenerasyona başlar ve 6 ay içinde önceki boyutuna ulaşır. Sıçanlarda yapılan parsiyel hepatektomi sonrası rejenerasyon süreci saatler içinde başlar ve 7–10 gün içinde tamamlanır (45, 46).

PCNA, 36 kilodalton ağırlığında, asidik nükleer proteindir ve hücre çoğalması ve DNA onarımı sırasında salınır. PCNA, DNA polimeraz gama için gerekli bir protein olup hücre proliferasyonunun başlamasında son derece önemli rol oynamaktadır. PCNA boyanan hücreler normal karaciğer dokusunda oldukça az sayıda iken, rejenerasyon olan karaciğer dokusunda artar (47).

Bu proteinin ekspresyonu, hücre siklusunda S fazını temsil etmekte ve immünohistokimyasal olarak bu proteinin saptanması dokudaki proliferasyon olan hücre fraksiyonunu göstermesi nedeniyle önemli bir proliferasyon ve viabilite markeri olarak ortaya çıkmaktadır (48).

Apopitozis karaciğer greftlerinde akut rejeksiyon sırasında görülen hepatosit hücre ölüm yoludur. Hepatositlerin apopitozisindeki yönetici moleküllerden başlıcaları; Fas ligand/fas, TGF beta–1/ TGF beta–1 reseptörü, TNF alfa/TNF alfa reseptörü ve bcl–2'dir (49).

Apopitozis kontrol ve düzenlenme aşamasında ölüm reseptörleri, adaptör moleküller, caspase kaskadı, mitokondri ve bcl–2 ailesinin dahil olduğu ölüm sinyalleri ile bağlantıyı sağlayan çeşitli proteinler vardır (50, 51).

Bcl–2 karaciğerdeki esas anti–apoptotik gen olup sadece bilier hücrelerde üretilmektedir. Bcl–2'nin karaciğer rejenerasyonunda erken dönemde hepatositleri apopitozdan koruduğu ve karaciğer viabilitesinin devamında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (52). Bcl–2 hücre yaşamını apopitozisi bloke ederek uzatmaktadır.

İskemiye maruz kalan hücrelerin seçtikleri ölüm yolu olan apopitozisin baskılanması da karaciğer greftlerinde viabilitenin devamı için önemlidir (49, 53).

Hepatositlerin ve bilier hücrelerin apopitozisi greft rejeksiyonunda kilit noktada yer almaktadır. Apopitozis nedeniyle kaybedilen hücre sayısı ile rejeksiyonun şiddeti belirlenmektedir. Apopitozis sıklıkla iskemi ile indüklenen ölüm şekli olarak da tanımlanmaktadır. Apopitozis hücrenin maruz kaldığı akut iskemiye verilen geçici bir cevaptır. Atrofi ve hiperplazi ise kronik cevaplar olarak görülmektedir (54).

Bizim çalışmamızda iskemiye maruz kalan gruplar bcl-2 yönünden karşılaştırılmıştır. Literatür bilgisi göz önüne alındığında bcl-2 yönünden fazla boyanmanın iskemiye maruz kalındığının bir göstergesi olduğu söylenebilir. İskemiye maruz kalan ve apopitosize gidecek hücreler bcl-2 ekspresyonunu artırarak kendilerini iskemiden ve sonuç olarak apopitozisten korumaya çalışmaktadır.

2.7. Non-heart beating donörler

Donör organ azlığı; bekleyen hasta listelerinin kalabalıklaşmasının ve transplantasyon için beklerken ölen hasta sayısının artmasının ana nedenidir. Hastalar bekleme listesinde geçirdikleri zaman zarfında uygun grefte ulaşamadıkları için kaybedilmektedir. NHBD karaciğerleri donör havuzunu genişletmekte iyi bir potansiyeldir ancak yeni bir yaklaşım değildir. Beyin ölümü tanınmadan önce transplantasyon için organlar sadece kardiyak arrest sonrası alınmaktaydı. Bu prosedür de bir bakıma NHBD anlamına gelmektedir. Ancak beyin ölümü kriterleri belirlendikten sonra greftler HBD'lerden sağlanma yoluna gidilmiştir. Ancak günümüzde organ havuzunun azlığı, ilgiyi tekrar aslında farkında olunmadan daha önce kullanılan NHBD'ler üzerine odaklamıştır (55).

Heart beating donörün (HBD) ölümü, beyin sapı fonksiyonlarının irreversibl kesilmesine dayanmaktadır. NHBD'lerin ölümü ise sirkülatuar ve respiratuar fonksiyonların irreversibl durmasına dayandırılmaktadır. HBD'lerde ölüm nörolojik kriterlere dayanır. NHBD'lerde ise esas nokta kardiyak arrest olup olmadığıdır. En belirgin ana fark kardiyak arrest anına kadar NHBD'ler halen hayattadır ancak HBD'lerde beyin ölümü gerçekleşmiştir (56).

NHBD'ler iki gruba ayrılmaktadır (2).

Kontrolsüz NHBD'ler

*Acil servise eks duhul gelen hastalar
(Kategori I)

*Başarısız Resüsitasyon
(Kategori II)

Kontrollü NHBD'ler

*Kardiyak arrest gelişmesi beklenen
hastalar (Kategori III)

*Beyin ölümü gerçekleşmiş kardiyak
arrest gelişen hastalar (Kategori IV)

Kontrollü NHBD'lerde iskemik hasar daha azdır ve transplantasyon sonrası organ fonksiyonları daha iyidir. NHBD'ler son birkaç yıldır kadaverik donörlerin %5'ini oluşturmaktadır. Tahminler NHBD'lerin organ havuzuna her yıl yaklaşık 1000 donör eklenmesiyle kadaverik organ havuzunun potansiyel olarak %25–42 oranında artacağını göstermektedir (2, 3).

Böbrekler sıcak iskemiye en uzun süre dayanan organlardır ve süre yaklaşık 120 dk'dır. Karaciğerin sıcak iskemiye dayanma süresi günümüzde yaklaşık 20 dk olarak kabul edilmektedir ve 20 dk'dan sonra hepatositlerde hasar başlamaktadır (57).

Canlı donör transplantasyonları sıklıkla pediatrik yaş grubu hastalarında elektif olarak uygulanmaktadır. Kadaverik donörler de genellikle erişkin hasta grubunun greftlerini sağlamaktadır (58). Canlı donörlerden sağlanan greftler, karaciğer transplantasyonu için bekleme listelerinin fazlalığı ve organ azlığı nedeniyle sıklıkla kullanılan bir yöntem haline almıştır ancak bu prosedür; verici için yüksek mortalite ve morbitide riskleri içermektedir. Canlı donör transplantasyonları erişkin dönem transplantasyonlarının %5–10'nunu oluşturmaktadır. Buna karşın böbrek transplantasyonlarında canlı donörler tüm donörlerin çoğunluğunu oluşturmaktadır (59, 60).

'Primum–non–nocere' tüm tedavi yaklaşımlarında hekimin yapmak zorunda olduğu ilk adımdır. Canlı donör transplantasyonlarının az da olsa başarısız sonuçları tıp tarihinin bu en kesin filozofisi ile ters düşmektedir. Bu yüzden organ azlığı nedeniyle başvuru canlı donör transplantasyonlarına bakış açısı günümüzde de gitgide tartışılır hale gelmektedir (59, 60).

Canlı donör kısa iskemili optimal bir karaciğer greftini sağlamaktadır. Canlı organ donasyonunun başarısı ve kabul edilebilirliği donörün mortalite ve morbitidesinin azaltılmasına bağlıdır. Canlı donörün avantajları; elektif operasyonu sağlaması, greftin en iyi şartlarda hazırlanabilmesi ve bekleme sürecindeki ölüm hızını azaltmasıdır. Bu teknik temelde donör havuzunu genişletebilir ama tek başına da organ yetersizliğini çözememektedir. Sonuç olarak bu prosedür donör havuzunu genişletmesine rağmen soru işaretleri ile doludur (61–63).

Kategori I ve II, kontrolsüz NHBD'ler olarak sınıflandırılmaktadır. Bu tür donörlerde organ donasyonu için zaman yoktur. Bu hastalar genellikle acil departmanındadırlar. Ölüm kesinleştikten sonra organ donasyonuna karar verilmektedir. Ailenin izni genelde kardiyak arrestten sonra alınmaktadır. Organ alınma prosedürü ölüm deklarasyonunun hemen sonrasında başladığı için genelde bu iki grup organlar uzamış sıcak iskemiyeye maruz kalmaktadır. Kategori III NHBD'ler en fonksiyonel greft sağlanan gruptur. Ailenin izni ve ekibin hazırlığı için geçen süre kısadır. Çünkü planlanan durum eğer mümkün olacaksa aileye daha öncesinden haber verilmekte ve hazırlıklar başlamaktadır. Böylece bu gruptan elde edilen greftler çok daha kısa süre sıcak iskemiyeye maruz kalmaktadırlar. Kategori IV'deki donörler beyin ölümü gerçekleşmiş yoğun bakım şartlarında takip edilmekte olan ve ani kardiyak arrest gelişen hastalardan oluşmaktadır (56).

Sıcak iskeminin süresinin hangi noktada başladığı konusundaki tartışmalar halen devam etmektedir. 1995'de Hollanda'da Maastricht toplantısında sıcak iske mi süresi; kardiyak arrest anından soğuk yıkamanın başladığı ana kadar geçen zamandır olarak tanımlanmıştır. Literatürde karaciğer transplantasyonu için sıcak iskemiyeyi bütün ayrıntıları ile tanımlayan ortak bir fikir birliği yoktur. Sıcak iskeminin başlama anını kimi otörler organın alınmaya başladığı an olarak kabul etmektedir (56).

NHBD'lerden sağlanan organlar için ana problem uzamış sıcak iske mi zamanıdır. Organ prezervasyonu ve transplantasyonlarının iske mi–reperfüzyon injürisi ile doğrudan ilişkili olduğu kabul edilen bir görüştür. Soğuk ortamda organ hazırlanması (+4°C) metabolizmayı yavaşlatmakta ve iskemiyenin etkilerini sınırlandırmaktadır. ATP'nin azalması ve O₂ eksikliği anaerobik metabolizmayı aktifler. Laktat ve hipoksantin artmaya ve birikmeye başlar. Tüm bunlar sonucunda

da intrasellüler asidoz gelişmektedir. Reperfüzyon, SOR eşliğinde hipoksantin ve ürata dönüşmesini sağlamaktadır. Bu yolak lipid peroksidasyonu ile sonuçlanır. Fizyolojik olmayan bu sapmalar greft disfonksiyonunun en potent nedenlerinden birini oluşturmaktadır (55, 56).

SOR ürünleri, nitrik oksit ve proinflamatuvar sitokinlerin salınması ile kupffer hücreleri de aktive olmaktadır. Bu süreçte; adezyon moleküllerinin de salınması lökositlerin olay yerine toplanmasına neden olmaktadır. Tüm bu olaylarla eş zamanlı kompleman sisteminin aktivasyonu da hücrel ödem ve lökosit birikimini artırmakta ve tetiklemektedir. WU solüsyonu ile soğuk yıkama bu etkileri engellemek ve transplantasyon başarısını artırmak için tasarlanmıştır (56).

NHBD organlarında soğuk iskeminin etkileri sıcak iskemi sırasında oluşan injuriye eklenmektedir. Sıcak ve soğuk iskemi paterni arasında farklılıklar mevcuttur. Soğuk iskeminin başlaması injuri etkilerini sinüzoidal–endotelial hücrelerde gösterirken, sıcak iskemi esas olarak hepatositleri zedelemektedir(56, 60).

Kategori I NHBD’lerden organların transplantasyonları zordur. Çünkü kardiyak arrest nedeniyle organ viabilitesi ile bağdaşmayan iskemi süresi gerçekleşmiştir. Ayrıca bu tür vakalarda detaylı araştırmalara ve sorgulamalara rağmen çoğu zaman ölüm sonrası geçirdikleri iskemik periodun ne kadar olduğuna dair verilere ulaşılamamaktadır (64).

Kategori II NHBD’lerde bu bilgi tam olarak bilinmemektedir, çünkü hasta sağlık personeli ya da doktor gözetimindeyken kardiyak arrest geçirmektedir. Kardiyak arrest anı ve süresi belirlidir. Bu gruptaki organların ölüm sonrasında viabilitesi birkaç farklı prosedür ile sağlanmaya çalışılmaktadır. Tabii ki kardiyopulmoner destek mutlaktır. Ancak bu tip vakalarda resüsitasyon sırasında manuel olarak abdominal destek ile intravasküler volüm arttırılmaya çalışılmalıdır. Yani standart kardiyopulmoner resüsitasyona ek olarak abdomenin manuel olarak kompresyonu intravasküler basıncı belirgin anlamda artırmakta ve organ viabilitesinin sağlanması ve devamı açısından önemli faydalar sağlamaktadır. Bir diğer prosedür kardiyopulmoner bypasstır. Hasta; aileden ve kanuni izinler alınarak ölüm deklarasyonundan hemen sonra operasyon odasına alınmalıdır. Sağ femoral ven ve arter kanüle edilerek kardiyopulmoner bypass sistemine bağlanmalıdır ve bu şekilde organın viabilitesi sürdürülmeye çalışılmalıdır. Kategori II NHBD’lerin sonuçları

HBD'lere benzemektedir. Hasta surveyi açısından neredeyse aynıdır ancak greft surveyi açısından %20 daha kötü olarak gerçekleşmektedir. Bu oranın yüksek olması HBD'lere göre NHBD'lerde greftte daha fazla injuri olması ile açıklanabilir (64).

NHBD'lerde greft yetmezliğinin ve disfonksiyonunun en sık ve önemli nedeni sıcak iskemi süresinin uzunluğudur. Bu süre kabaca resüsitasyon sırasındaki süre olarak tanımlanabilir. Buna rağmen düşük akımlı sıcak iskemi hiç akımın olmadığı sıcak iskemiden daha az injuriye neden olmaktadır. Bu yüzden NHBD'lerde sirkülasyonun düşük akımlı da olsa bir miktar sağlanması greft viabilitesi açısından anlamlı faydalar sağlamaktadır. Ancak tüm müdahalelere rağmen günümüzde henüz bu injuri seviyesi HBD'lerden daha kötüdür (64).

Kardiyopulmoner resüsitasyonun (standart kardiyopulmoner resüsitasyon manevralarına ek olarak göğüsün mekanik, abdomenin manuel kompresyonunu içermelidir) efektif sağlanabildiği kategori II NHBD'lerde düşük akım sağlanmakta ve injürinin etkisi en aza indirilmeye çalışılmaktadır. NHBD karaciğer greftlerine özellikle bu abdominal destek sağlanabilirse greft viabilitesi açısından en iyi sonuçlar elde edilmektedir (64).

HBD'lerde uzamış soğuk iskemi bilier striktürler ile ilişkilidir ve bu sorun NHBD'lere göre daha sıklıkla karşılaşılan bir problem olarak ortaya çıkmaktadır. Bilier striktür ve iskemi için soğuk iskemi zaman sınırı 11 saat olarak kabul edilmektedir. Ancak Otero ve arkadaşlarının çalışmasında bu süre 7 saatle sınırlandırılmasına rağmen bilier iskeminin geliştiği de gösterilmiştir. Otero ve ark yaptıkları çalışmada NHBD ve HBD'lerin sıcak ve soğuk iskemi süreleri neredeyse eşit olmasına rağmen bilier iskemi ve striktür NHBD'lerde daha fazla gelişmiştir. Bu da bilier iskeminin sadece soğuk iskemi zamanı ile değil, daha farklı mekanizmalar ile açıklanması gerektiğini göstermektedir (64).

Otero ve ark çalışmasında kategori II NHBD'lerden alınan karaciğerler ile elde edilen %55'lik greft survey oranı kategori III ve IV NHBD'ler ve 70 yaşın üzerindeki HBD'lerden alınan karaciğer greft surveyleri ile karşılaştırılabilir düzeydedir. Kategori II NHBD vakalarının karaciğer greft kaynağı olarak gösterilebilmesi için hasta ve greft survey oranlarının HBD'lere yaklaştırılması gerekmektedir. Otero ve ark. çalışmalarında kategori II donörlerin sıcak iskemi süreleri; kardiyopulmoner resüsitasyon ve abdominal-göğüs duvarı kompresyonu eşliğinde 130 dk'yı aşmadığında sonuçlar HBD'ler ile karşılaştırılabilir düzeydedir (64).

Kategori III hastaları yaşam desteği alan yoğun bakım ünitelerindeki hastalar oluşturmaktadır. Yaşam desteğini sonlandıracak olan takım ile organ donasyon takımı birbirinden bağımsız çalışan farklı kişilerden oluşmalıdır. Bu tür durumlarda alınan kararlar ortak olmamalıdır. Eğer tüm kararlar aynı yönde ve fikir birliği sağlandıysa ailenin de izni mümkün oluyorsa kardiyopulmoner destek kesilir ve hasta planlı NHBD halini alır (65).

Kategori IV NHBD'ler beyin ölümü gelişmiş ancak donasyon işlemleri başlamadan ani kardiyak arrest olan hastalardan oluşmaktadır. Bu vakaların işlemleri daha komplekstir çünkü sıcak iske mi süreleri uzundur. Bu sorunlar da greft fonksiyonlarını önemli ölçüde etkilemektedir (65).

NHBD'ler sıcak iske miye maruz kaldıkları için primer greft nonfonksiyonu daha sıklıkla gelişmektedir. İskemik karaciğerin viabilitesini invivo değerlendirebilen kabul edilmiş uygun bir teknik olmaması nedeniyle NHBD greftlerinin kullanıldığı transplantasyon yapılan geniş serili deneysel modeller hazırlanarak NHBD'lerdeki bu en temel sorun olan sıcak iske mi konusundaki sorular cevaplanmalıdır. Literatürde karaciğerin sıcak iske miye toleransını araştıran çok az deneysel çalışma mevcuttur (66).

Sıcak iske mi süresi karaciğer transplantasyonunun sonuçlarını doğrudan etkilediği için karaciğer greftlerinin kalitesinin nasıl değerlendirilmesi gerektiği ve karaciğer greftleri için güvenli sıcak iske mi aralığının belirlenmesi önemlidir. NHBD'lerin kullanıldığı ülkelerde de sıcak iske mi süresi oldukça tartışmalı bir konu halinde devam etmektedir (66).

Sıcak iske mi süresi ne kadar uzun ise transaminazlardaki yükselme de o kadar erken başlamaktadır. Eğer AST yüksekliği erken dönemde geliyorsa o greft surveyi ve fonksiyonu için kötü bir gelecek oluşacağı söylenebilir. Sıcak iske minin kendisi karaciğer hasarına yol açmaktadır ki bu hasarı iske mi–reperfüzyon injurisi daha da artırmaktadır. Reperfüzyondan önce karaciğer spesmenlerinin incelendiği çalışmalarda sıcak iske minin kendi başına etkisi koagülasyon, hepatosit nekrozu ve vakuolizasyon ile kanıtlanmıştır (67, 68).

Sıcak iske mi süresi limitasyonunda fikir birliği için bir çok çalışma literatürde devam etmektedir. Yi Ma ve ark. çalışmasında bu süre 30 dk olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada sıcak iske mi süresi arttıkça histolojik değişiklikler artmıştır. Yine bu çalışmada NHBD'lerde reperfüzyon sırasındaki injurinin sıcak iske mi süresi ile

pozitif ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada sonuç olarak sadece sıcak iskemiyeye maruz kalan greftlerde iskemi süresi 60 dk'nın altında ise hasar geri dönüşümlü olarak tanımlanmaktadır. Ancak hasarın reperfüzyon sırasında da arttığı bildirilmektedir. Bu yüzden sıcak iskemi süresi 30 dk olarak sağlanabilirse reperfüzyon sağlandıktan sonra bile hasar geri dönüşümlü olarak gerçekleşmektedir. Bu çalışmanın sonucunda özellikle sıçan karaciğer greftleri için sıcak iskemi süresinin 30 dk olarak sağlanması gerektiği vurgulanmaktadır (66).

HBD ve NHBD sorunları temelde farklılıklar göstermektedir. NHBD'ler adına kötü sonuçlar ile bağlantılı olan bir diğer sorun soğuk iskemi süresidir. Soğuk iskemi süresine eklenen her 1 saat greft yetmezliği riskini yaklaşık %17 artırmaktadır. NHBD'lerdeki greft yetmezliğinin HBD'lere göre %30 daha fazla görülmesinin ana nedeni budur. Soğuk iskemi süresi ortalama 12 saati geçtiğinde greft yetmezliği büyük oranda gelişmektedir. 8 saatin altındaki sürelerde ise greft yetmezliği nadiren gelişmektedir. 60 yaşın altında, sıcak iskemi süresi 30 dk'dan az ve soğuk iskemisi 8 saati geçmeyen NHBD'ler kullanıldığında daha yüz güldürücü sonuçlar elde edilmektedir. NHBD'lerin greft surveyleri kötü olmakta ancak hasta surveyleri açısından HBD'ler ile karşılaştırılabilir sonuçlar elde edilmektedir (69, 70).

Çalışmalar göstermektedir ki NHBD'lerin kullanıma girmesi ile donör organ sayısı yaklaşık %20–25 oranında artmaktadır. Organ hazırlanmasındaki, pre–postoperatif bakımdaki ve immüsupresyondaki teknolojik gelişmeler sayesinde bu tür greftlerin fonksiyon ve surveyleri optimize edilebilmektedir. Bu sayede NHBD'ler günümüzde transplantasyon modalitesi için umut vaat eder hale gelmiştir. Ayrıca NHBD'lerin donasyonunun temel prensipler göz önüne alındığında daha etik olması nedeniyle de ilgi her geçen gün artmaya devam etmektedir (69, 70).

Gomez ve ark. yaptıkları çalışmada 15 dk'dan fazla süren kardiyopulmoner arrest sürelerinde kötü greft fonksiyonlarının gelişeceğini bildirmişlerdir (4).

NHBD karaciğerleri için seçilen yıkama solüsyonu çoğu merkezde histidin triptofan ketoglutarat (HTK)'tır. Bu solüsyon koloidal maddeleri içermemesi nedeniyle viskozitesi düşüktür ve maliyeti diğer solüsyonlardan belirgin ölçüde azdır. Optimal prezervasyon için NHBD karaciğerlerinin efektif yıkanması major öneme sahiptir. Karaciğer içerisindeki kan artıklarının ve doku debrislerinin

temizlenmesi greft fonksiyonu ve surveyi açısından anahtar rol oynamaktadır. NHBD karaciğer greftleri iskemik olarak hasarlıdır ve hasarın azaltılıp fonksiyonların optimize edilebilmesi için prezervasyon şartlarının düzeltilmesi gerekmektedir. HTK, NHBD karaciğer greftleri için çoğu merkezde en yaygın olarak kullanılan yıkama solüsyonudur (71).

Bilier striktür küçük peribilier kapillerlerin doku ve kan artıklarından yetersiz temizlenmesine bağlıdır. Yüksek viskoziteli yıkama solüsyonları ile yıkanan greftlerde bu peribilier mikrokapillerler tam olarak temizlenememekte ve bilier striktürler bu greftlerde daha sıklıkla ortaya çıkmaktadır. Bizim çalışmamızda literatür bilgisi gözönüne alınarak yıkama solüsyonu olarak düşük viskoziteye sahip HTK solüsyonu kullanılmıştır.

2.8. Rantes ve Met-rantes

Rantes, geniş ve çeşitli proinflatuar hücre tiplerini bütünleme ve aktive etme yeteneğine sahip olan geniş sitokin ailesi üyelerinden biridir. Bunlar 8–10 kilodaltonluk küçük polipeptidlerdir ve sistein artıklarının aminoterminallerinin aralıklı dizilmesine dayanarak sınıflandırılan CxC veya CC kemokinleridir. CxC kemokinleri öncelikle nötrofilleri aktive eder. CC kemokinleri ise birçok lökosit tiplerine etkir (72, 73).

Rantes 68 aminoasitlik küçük bir proteindir. Lökosit göçünü, 7 transmembran G proteini olan spesifik reseptörlerine bağlanarak indüklemektedir. Bunların başlıcaları CCR1, CCR3, CCR4 ve CCR5'dir (74).

Rantes, in vitro ortamlarda T hücrelerinin (özellikle CD4, CD45) kemotaksisini ve aktive edilmesini sağlar ama nötrofillere etki etmez. Bu sonuçlar, rantes'lerin allerjenlerin geç faz deri reaksiyonları veya allerjik astım gibi hastalıklardaki rolünü göstermektedir. Bu hipotez, geniş rantes grubunun eozinofilden oldukça zengin nazal polip dokularında bulunmasıyla kuvvetlenmektedir (75).

Rantes, klasik olarak T hücreleri ya da monositler gibi lenfoid hücreleri etkilemektedir. Rantes; T lenfositler, monositler, bazofiller, eozinofiller ve Nk hücreleri arasında farklı kimokin reseptörleri vasıtasıyla alış verişe aracılık eden karaciğer ve böbrek hücrelerinde de reseptörü bulunan kemoatraktan bir kimokindir.

Ayrıca dentritik hücreler ve mast hücreleri üzerine de belirgin etkileri mevcuttur. CD8 T hücreler, epitelyal hücreler, fibroblastlar ve trombositler tarafından dominant olarak salınımı arttırılan rantesin kendisi de belirli konsantrasyonlardan sonra inflamasyonun bir parçası haline gelmektedir. Transplant rejeksiyonu, ateroskleroz, artrit, atopik dermatit, astım, kronik bronşit, gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonları, glomerulonefritler, endometriozis, Alzheimer hastalığı ve bazı malignitelerde rantesin rolü bulunmaktadır. Tüm bu patolojilerde rantes inflamasyon alanına lökositlerin akışını başlatmakta ve artırmaktadır. (74, 76).

Rekombinant rantes'deki başlangıç metioninin tutulması ve uzamasıyla agonist aktive göstermeyen bir protein oluşur. Üstelik fonksiyonel bir antagonist gibi davranır. Açığa çıkan bu madde, CC reseptör 1'e (CCR1) bağlanarak bir reseptör antagonisti gibi davranır. Met-Rantes, kemotaksiste rantes ve MIP1 α 'yı benzer güçle inhibe eder (75).

Tek bir aminoasit eklenmesiyle biyoaktivitede bu kadar belirgin bir değişikliğin olması, rantes'in aminoterminalinin önemini vurgular. Ancak proteinin yapısını baştanbaşa etkilemediği için yüksek etkin bir antagonist etki oluştururken, reseptör bağlanması bozulmaz. Bu hazır molekülle yapılacak invivo çalışmalar, lökositlerin inflamasyon alanlarına gidişinde rol alan rantes reseptörlerini bloke ederek inflamasyonun inhibe edilmesinde çok değerli bilgiler verecektir (75, 76).

Kemokin reseptör antagonisti olan met-rantes inflamatuvar hücrelerin renal allograft içerisine akışını suprese etmektedir. Renal transplant modelindeki bir çalışmada ek immüsupresif ajanlar kullanılmış met-rantes verilen hayvanlarda, verilmeyenlere oranla vasküler ve tübüler hasar skorlarında anlamlı iyileşmeler gösterilmiştir. Ayrıca rantes, insan ve sıçan transplant rejeksiyonlarında greft içerisinde yüksek oranda bulunmaktadır (5).

Kemotaktik aktivitelere ek olarak kimokinler hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu indüklerler. Sonuç olarak rantes adezyon moleküllerini artırmaktadır. Adezyon molekülleri de buldukları ortama inflamatuvar hücreleri çekmektedir (4).

Gröne ve ark çalışmasında mikrovasküler endotel üzerinde çeşitli adezyon moleküllerinin de salınmakta olduğu gösterilmiştir. Bunlar ICAM-1, VCAM-1 ve E selektin olarak bildirilmiştir. Bu adezyon molekülleri lökositlerin olay alanına

yapışmasında anahtar rol oynamaktadır. Rantes, bu moleküllerin ekspresyonunu artırmaktadır ve sonuçta inflamasyon alanına daha fazla lökosit çekilmekte ve rejeksiyon daha da şiddetli gelişmektedir. Rantesin blokajı çok erken safhada inflamasyonu başlatan ve devam ettiren hücreleri baskılamakta ve özellikle renal greftlerin rejeksiyonunda yarar sağlamaktadır. Sonuç olarak Gröne ve ark çalışmalarında kemokin reseptörlerinin bloke edilmesinin solid allogreft surveyi üzerine pozitif etkisi olduğunu göstermişlerdir (5).

Met–Rantes, kemokin reseptörleri CCR1 ve CCR5 üzerinden eozinofil fonksiyonlarını antagonize eder. Bu etkisi ile allerjik hastalıkların ve cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılabilir (77, 78).

Sıçanlarda trinitrobenzen sulfonik asit verilerek oluşturulan kolitte, met–rantesin akut safhada verilmesi ile akut fazdan kronik faza geçişinde CCR1 ve CCR5 reseptörlerini antagonize ederek inflamatuvar hadiseyi hem mikroskopik hem de makroskopik olarak azalttığı gösterilmiştir (79).

Astmatik, atopik hastalarda rantes, eozinofillerin birikiminde kritik rol oynarlar. Modifiye bir kemokin olan met–rantes, benzer şekilde CCR3 reseptörlerini bloke eder ve kemokinlere eozinofil kemotaktik cevabını önler. Bronşial epitelde viral enfeksiyonda salınımı artan proinflamatuvar sitokinler özellikle IL–8, IL–6, GMCSF, Rantes, IL–10’ dur. Bu sitokinlerde eozinofilik inflamasyonun oluşumunda önemlidir (80).

Kemokinler allogreft survey ve fonksiyonları üzerinde inflamatuvar süreçler yoluyla major role sahiptirler. CCR5’in sistemik konsantrasyonları karaciğer greft survey ve rejeksiyonu insidansı ile korele bulunmuştur (81, 82).

Kardiyak arreste maruz kalmış organların kullanımı organ havuzunu genişletmektedir. Kardiyak arrest sonrası geçen süre donörde iskemik değişikliklere ve organın viabilitesinin bozulmasına neden olmaktadır. Viabilitenin artırılması ve oluşan iskeminin ve nekrozun en aza indirilmesi üzerine odaklanılmalıdır. Bu hem bu şekildeki donörlerin yönetiminin geliştirilmesi ile hem de bu organları iskeminin irreversibl etkilerinden korunmasıyla mümkün olacaktır.

Karaciğerin fonksiyonlarını yerine getirebilmesi diğer organ sistemleri için de oldukça önemlidir. Çünkü karaciğer diğer organ sistemlerinin aktivitelerini de ilgilendiren çok önemli metabolik fonksiyonları üstlenmiş bir organdır. Bu nedenle karaciğer rezeksiyonları akut karaciğer yetmezliği; sepsis, böbrek yetmezliği,

akciğerde işlevsel bozukluklar, çoklu organ yetmezliği gibi majör komplikasyonları da beraberinde getirmektedir. Karaciğerin süratle rejenere olması ve işlevlerinin aksamaması hayati fonksiyonların devamı için gereklidir (5).

Bu nedenle kemokinlerin ve sitokinlerin anahtar rol oynadığı yolların organizma lehine değiştirilebilmesi birçok patolojik olayda organizmanın lehine sonuçlanacaktır. Rantesin blokajı ve inflamasyonun şiddetinin azaltılması ile özellikle karaciğer greftlerinin viabilitesinin devamı sağlanabilirse alıcılar marjinal donörlerden aldıkları greftler ile sağlıklarına kavuşabileceklerdir. Fonksiyon ve survey açısından diğer donörler ile karşılaştırıldıklarında daha kötü durumda olan NHBD'ler bu mekanizmalar ile daha kullanılabilir organ greft donörleri haline getirileceklerdir. NHBD'de iskemi–reperfüzyon periyodunda rantesin blokajı, bir çok inflamatuar basamağı ve lökosit ve lenfositik hücre infiltrasyonunu engelleyeceği için greftin fonksiyonu ve viabilitesi açısından önemli yararlar sağlayacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM), Ekim–Aralık 2006 tarihleri arasında yapıldı. Çalışma öncesinde Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun onayı alındı (Etik Kurul Karar Tarihi:07.02.2006, Karar No:01/71).

3.1. Deneysel model

Çalışmada ağırlığı 225–290 gram arasında değişen, erkek ve DEKAM laboratuvarlarında üretilerek standart sıçan diyetiyle beslenen 30 adet Wistar–Albino tipi sıçan kullanıldı. Sıçanlar randomize olarak 10’ar sayılık sham, kontrol ve çalışma gruplarına ayrıldı. Sıçanlara 0,2 ml intrakardiyak KCL verilerek kardiyak arrest sağlandı. Kardiyak arrest sonrası 30 dk beklenilerek cerrahi işlem gerçekleştirildi.

Sıçanlara kardiyak arrest yapıldığı için cerrahi işlem sırasında anestezi madde verilmedi. Kardiyak arrestten önce tüm sıçanlara 0,1 ml heparin sc olarak uygulandı. Kardiyak arrestten sonra sıçanların karnı traş makinası ile traş edildi ve povidon iyotla temizlendi. Steril şartlarda standart orta hat insizyonla laparotomi yapıldı. Sham grubu da dahil tüm sıçanlara total hepatektomi uygulandı. Falsiform ligament kesilerek karaciğer serbestleştirildi. Tüm bağları açılarak karaciğer total olarak disseke edildi. Yukarıda vena kava ve alt tarafta vena porta disseke edilerek serbestleştirildi. Daha sonra lumenine uygun (3,5 french) bir katater yardımıyla portal ven kateterize edildi. Bu kateter yardımıyla 50 ml euro collins solüsyonu ile invivo olarak karaciğer yıkandı. HTK solüsyonu ile perfüze edilmek üzere hepatektomi tamamlandı.

Çalışma grubuna monoklonal anti-rantes antibody (ab14066, Abcam plc, Cambridge, UK), kardiyak arrest yapılmadan 2 saat önce intraperitoneal olarak tek dozluk enjeksiyon ile uygulandı (0,1 µg/kg). Bu enjeksiyondan 2 saat sonra anlatıldığı gibi kardiyak arrest yapıldı.



Resim-1. Çıkarılan ve perfüzyon için hazırlanan (portal ven ve vena kava kateterize) karaciğer dokusu.

Grup I. Sham grubu (n=10): Bu grupta 10 sıçan kullanıldı. 0,2 ml KCL'ün intrakardiyak enjeksiyonu ile kardiyak arrest yapıldı. 30 dakikalık bekleme süresi dolduktan sonra laparotomi yapıldı ve total hepatektomi şeklinde karaciğer çıkarıldı. Herhangi bir invivo yıkama ve perfüzyon yapılmadan karaciğer formaldehit içerisine alınarak patolojide incelenmek üzere sabitlendi.

Grup II. Kontrol grubu (n=10): Bu gruptaki sıçanlara intrakardiyak KCL enjeksiyonundan 2 saat önce intraperitoneal 0,5 cc serum fizyolojik verildi. Kardiyak arrest sonrası 30 dk beklendikten sonra laparotomi yapılarak karaciğerler yıkama ve perfüzyona uygun şekilde disseke edilerek hazırlandı. Daha sonra 50 ml euro collins (Fresenius, Germany) solüsyonu ile karaciğerler portal ven aracılığıyla invivo yıkandı. Hepatektomi tamamlanarak karaciğer total olarak çıkarıldı. Karaciğerler 60 dk süreyle HTK (Custodiol, Germany) solüsyonu ile perfüze edildi. Karaciğerler patolojik tetkik için hazırlandı.

Grup III. Çalışma grubu (n=10): Bu gruptaki sıçanlara kontrol grubuyla aynı şekilde kardiyak arrestten 2 saat önce 1 µg/kg dozunda intraperitoneal met-rantes verilerek 30 dakikalık arrest bekleme süresi dolduruldu ve laparotomi yapıldı. Aynı şekilde euro collins solüsyonu ile invivo yıkandıktan sonra karaciğer total

olarak disseke edildi ve perfüzyona uygun olacak şekilde hepatektomi tamamlandı. Karaciğerler 60 dk süreyle HTK solüsyonu ile perfüze edildi. Karaciğerler patolojik tetkik için hazırlandı. Kontrol ve çalışma grubundaki sıçanların perfüzetleri daha sonra AST ve ALT çalışılmak için çalışma gününe kadar –80 C°'de saklandı.

3.2. Biyokimyasal parametreler

Karaciğer fonksiyon testleri

Alınan perfüzet örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen serumlar –80 C°'de çalışma gününe kadar saklandı. Çalışma günü oda ısısında çözünen serumlarda AST, ALT düzeyleri Konelab 60i (Thermo Clinical Labsystems, Espoo, Finland) otoanalizatör cihazında ölçüldü ve IU/L olarak birimlendirildi.

3.3. Histopatolojik parametreler

3.3.1. Histopatolojik analiz

%10'luk formol içinde saklanan karaciğer örnekleri histopatolojik takibe alındı. Parafin bloklara gömülen spesmenlerden 5–7 mikron kalınlığında kesitler alınarak H–E boyası ile boyandılar. Boyanan preparatlar ışık mikroskopisi altında değerlendirildi. Tüm histopatolojik değerlendirmelerde bakılan preparatın hangi gruba ait olduğu patolog tarafından bilinmemekteydi. İskemi–reperfüzyon hasarına bağlı karaciğerde oluşan histopatolojik değişiklikler Suzuki ve arkadaşlarının değerlendirmesine göre yapıldı (Tablo 1)(83).

Tablo–1. Karaciğerde oluşan hasara ait histopatolojik değişikliklerin derecelendirilmesi, Suzuki skorlaması (83).

Grade	Konjesyon	Vakuolizasyon	Nekroz
0	Yok	Yok	Yok
1	Az	Az	Basit hücre nekrozu
2	Orta	Orta	%0–30
3	Fazla	Fazla	%30–60
4	Çok fazla	Çok fazla	> %60

3.3.2. Prolifere olan hücre nükleer antijeni (PCNA) ile işaretlenme oranı

%10'luk formol içinde saklanan karaciğer dokusuna parafin emdirildikten sonra spesmenlerden 5 µm kalınlığındaki kesitler, yapıştırıcı madde olarak poli-L-lizin ile kaplanmış lamalar üzerine alındı. PCNA boyanacak preparatlar 60°C'lik etüvde bir saat bekletildikten sonra ksilol ve derecesi giderek azalan alkolden geçirilerek distile suda yıkandı. Kesitler sitrat buffer (ph:6,0) ile 20 dakika kaynatıldı. Spesifik olmayan boyamaları ve zemin boyamasını en aza indirmek için bütün preparatlara 15 dakika süreyle %3'lük H₂O₂ uygulandı. On dakika tamponlanmış salin (PBS) solüsyonunda yıkandı. Primer antikor olarak sıçan monoklonal antikor olan PCNA (clone PC10) (code no: 030602E, Lab Vision Corporation, USA) hazır kiti kullanıldı. Primer antikor uygulandıktan sonra 30 dk bekletildi. İmmünohistokimyasal boyamada streptavidin-biotin kiti (code no: K0679, Dako Corporation, USA) kullanılarak avidin-biotin-peroksidaz metodu uygulandı.

İmmünohistokimyasal boyamaya şu şekilde devam edildi:10 dakika fosfatla tamponlanmış salin solüsyonu (PBS) ile yıkandı,10 dakika biotinlenmiş sekonder antikor uygulandı, 10 dakika streptavidin peroksidaz konjugatı uygulandı, 10 dakika PBS ile yıkandı, 15 dakika DAB kromojen uygulandı, 5 dakika PBS ile yıkandı, 5 dakika deiyonize su ile yıkandı, 1 dakika Mayer'in hematoksileni ile zıt boya yapıldı, 2 dakika distile suda yıkandı, derecesi giderek azalan alkollerden geçirilerek, ksilolde bekletildi, kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Otuz büyük büyütme sahasındaki PCNA ile boyanmış hücre sayısı ve total hepatosit sayısı hesaplandı ve her 1000 hücreye oranı şeklinde tanımlandı (84).

3.3.3. Bcl-2 ile işaretlenme oranı

%10'luk formol içinde saklanan karaciğer dokusuna parafin emdirildikten sonra spesmenlerden 5 µm kalınlığındaki kesitler, yapıştırıcı madde olarak poli-L-lizin ile kaplanmış lamalar üzerine alındı. Bcl-2 boyanacak preparatlar 60°C'lik etüvde bir saat bekletildikten sonra ksilol ve derecesi giderek azalan alkolden geçirilerek distile suda yıkandı. Kesitler sitrat buffer (ph:6,0) ile 20 dakika kaynatıldı. Spesifik olmayan boyamaları ve zemin boyamasını en aza indirmek için bütün preparatlara 15 dakika süreyle %3'lük H₂O₂ uygulandı. On dakika tamponlanmış salin (PBS) solüsyonunda yıkandı. Primer antikor olarak sıçan monoklonal antikor olan bcl-2 alfa (clone 8C8, code no: 020503J, Lab Vision

Corporation, USA) kiti kullanıldı. Primer antikor uygulandıktan sonra 30 dk bekletildi. İmmünohistokimyasal boyamada streptavidin–biotin kiti (code no: K0679, Dako Corporation, USA) kullanılarak avidin–biotin–peroksidaz metodu uygulandı. İmmünohistokimyasal boyamaya PCNA’da olduğu gibi devam edildi. Otuz büyük büyütme sahasındaki bcl–2 ile boyanmış hücre sayısı ve total hepatosit sayısı hesaplandı ve her 1000 hücreye oranı şeklinde tanımlandı (84).

Pozitif kontrol olarak PCNA ve bcl–2 için normal tonsil dokusu kullanıldı. Kesitlerin kurumaması için işlemlerin tümü oda ısısında ve nemli bir ortamda gerçekleştirildi. Hazırlanan kesitler ışık mikroskopunda değerlendirildi. Kesitlerin değerlendirilmesi, randomize olarak ve uzman bir patoloğun preparatın hangi gruba ait olduğunu bilmeden yapıldı.

İstatistiksel analiz

Veriler ortalama \pm standart sapma ($X \pm SD$) olarak gösterildi. Grupların ve histopatolojik değerlerin karşılaştırılmasında Oneway (ANOVA) ve Chi–Square testleri kullanıldı. PCNA, AST ve ALT çalışmanın ölçülebilen değerleriydi ve bu üç parametrenin normal dağılıma uygunluk testi ile uygun oldukları tespit edildi. İstatistik, Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows (11.0 version) programında yapıldı. $P < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal bulgular

4.1.1. AST sonuçları

Kontrol ve çalışma grubundaki sıçanların karaciğerleri sirkülatuar bir sistem yardımıyla perfüze edilirken perfüzyon sıvıları uygun koşullarda elde edildi. Perfüzetlerden AST çalışıldı. Kontrol grubunda AST 'ın median değeri 532,9 IU/l, çalışma grubunda da 216,4 IU/L olarak tespit edildi. Kontrol ve çalışma grubunun AST değerleri karşılaştırıldığında kontrol ve çalışma grupları arasında fark istatistiksel olarak anlamlıydı (Tablo 2) ($p<0,05$).

4.1.2. ALT sonuçları

Kontrol ve çalışma grubundaki sıçanların karaciğerleri sirkülatuar bir sistem yardımıyla perfüze edilirken perfüzyon sıvıları uygun koşullarda elde edildi. Perfüzetlerden ALT çalışıldı. Kontrol grubunda ALT'ın median değeri 799,59 IU/l, çalışma grubunda da 273,2 IU/L olarak tespit edildi. Kontrol ve çalışma grublarının ALT değerleri karşılaştırıldığında kontrol ve çalışma grupları arasında fark istatistiksel olarak anlamlıydı (Tablo 2) ($p<0,05$) (Grafik I).

4.2. Histopatolojik Sonuçlar

4.2.1. Prolifere olan hücre nükleer antijen (PCNA) sonuçları

Sham, kontrol ve çalışma gruplarında saptanan PCNA değerleri karşılaştırıldığında her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (Tablo 3) ($p>0,05$) (Resim 2).

4.2.2. Bcl-2 sonuçları

Sham, kontrol ve çalışma gruplarında saptanan bcl-2 boyanma yüzdeleri karşılaştırıldığında her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,05$). Kontrol ve çalışma grupları kendi içlerinde değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi (Tablo 4) ($p<0,05$) (Resim 3) (Grafik II).

4.2.3. Konjesyon sonuçları

Sham, kontrol ve çalışma gruplarında saptanan konjesyon sonuçları karşılaştırıldığında her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,05$). Kontrol ve çalışma grupları kendi içlerinde değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi (Tablo 5) ($p<0,05$) (Resim 4, 5, 6) (Grafik III).

4.2.4. Vakuolizasyon sonuçları

Sham, kontrol ve çalışma gruplarında saptanan vakuolizasyon sonuçları karşılaştırıldığında her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,05$). Kontrol ve çalışma grupları kendi içlerinde değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi (Tablo 6) ($p<0,05$) (Grafik IV).

4.2.5. Nekroz sonuçları

Sham, kontrol ve çalışma gruplarında saptanan nekroz sonuçları karşılaştırıldığında her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (Tablo 7) ($p>0,05$) (Resim 7) (Grafik V).

Tablo–2. Kontrol ve çalışma gruplarında perfüzeatların AST ve ALT değerleri

	KONTROL GRUBU	ÇALIŞMA GRUBU	T	p
	X±SD	X±SD		
AST	532±63,1	216±26,4	14,6	p<0,05
ALT	799±130,50	273±29,9	12,4	p<0,05

Tablo–3. Sham, kontrol ve çalışma gruplarının PCNA değerleri

	SHAM GURUBU	KONTROL GRUBU	ÇALIŞMA GRUBU	F	p
	X±SD	X±SD	X±SD		
PCNA	0,30±0,11	0,24±0,23	0,25±0,14	0,30	p>0,05

Tablo–4. Sham, kontrol ve çalışma gruplarının bcl–2 boyanma yüzdeleri

Bcl–2 boyanma oranı	Sham grubu n (%)	Kontrol grubu n (%)	Çalışma grubu n (%)	Toplam n (%)
<%1	—	—	6(%100)	6(%100)
%1–10	1(%12,5)	3(%37,5)	4(%50)	8(%100)
%10–25	5(%41,7)	7(%58,3)	—	12(%100)
%25–50	4(%100)	—	—	4(%100)
Toplam	10(%33,3)	10(%33,3)	10(%33,3)	30(%100)

X^2 : 28,2 **p<0,05**

Tablo-5. Sham, kontrol ve çalışma gruplarının konjesyon oranları

Konjesyon	Sham grubu n (%)	Kontrol grubu n (%)	Çalışma grubu n (%)	Toplam n (%)
Yok	—	—	7(%100)	7(%100)
Az	—	—	3(%100)	3(%100)
Orta	1(%16,7)	5(%83,3)	—	6(%100)
Fazla	5(%50)	5(%50)	—	10(%100)
Çok fazla	4(%100)	—	—	4(%100)
Toplam	10(%33,3)	10(%33,3)	10(%33,3)	30(%100)

X^2 : 40,0 $p < 0,05$

Tablo-6. Sham, kontrol ve çalışma gruplarının vakuolizasyon oranları

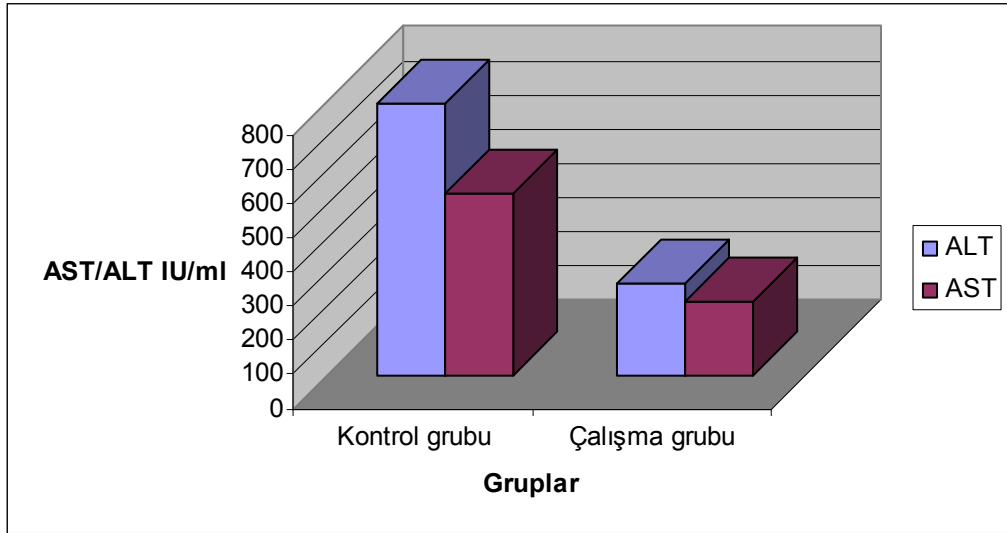
Vakuolizasyon	Sham grubu n (%)	Kontrol grubu n (%)	Çalışma grubu n (%)	Toplam n (%)
Yok	—	1(%11,1)	8(%88,9)	9(%100)
Az	2(%28,6)	3(%42,9)	2(%28,6)	7(%100)
Orta	2(%33,3)	4(%66,7)	—	6(%100)
Fazla	6(%75)	2(%25)	—	8(%100)
Toplam	10(%33,3)	10(%33,3)	10(%33,3)	30(%100)

X^2 : 23,95 $p < 0,05$

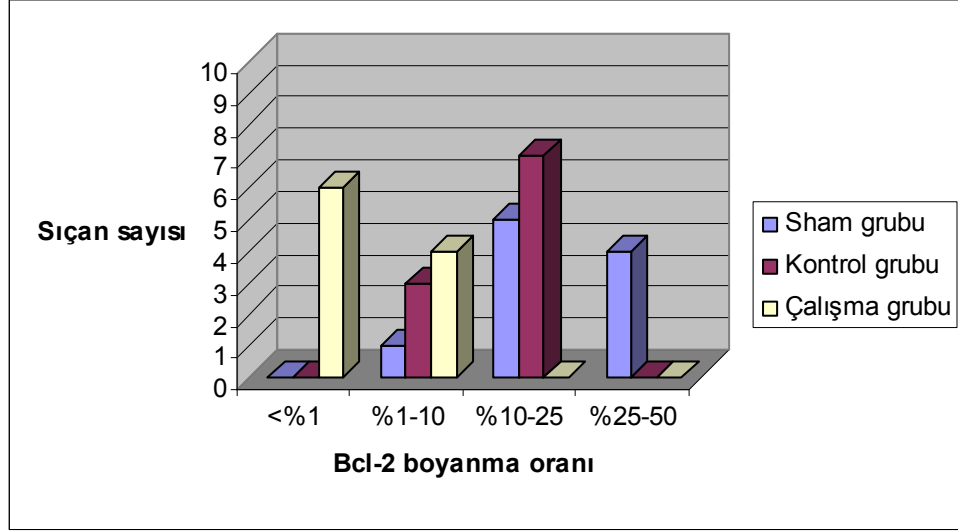
Tablo-7. Sham, kontrol ve çalışma gruplarının nekroz oranları

Nekroz	Sham grubu n (%)	Kontrol grubu n (%)	Çalışma grubu n (%)	Toplam N (%)
Yok	6(%25)	8(%33,3)	10(%41,7)	24(%100)
Basit hücre nekrozu	4(%66,7)	2(%33,3)	—	6(%100)
Ciddi nekroz	—	—	—	—
Toplam	10(%33,3)	10(%33,3)	10(%33,3)	30(%100)

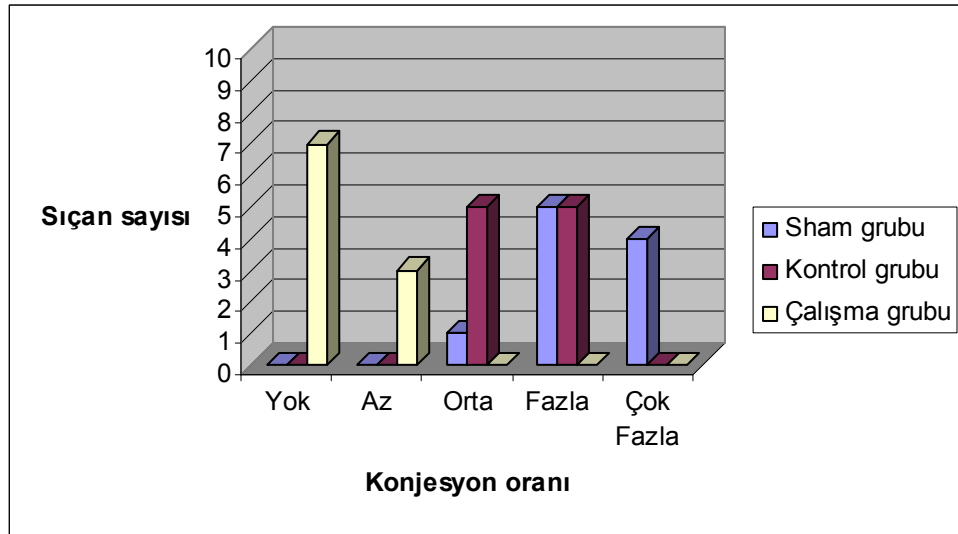
$X^2: 5,0$ $p>0,05$



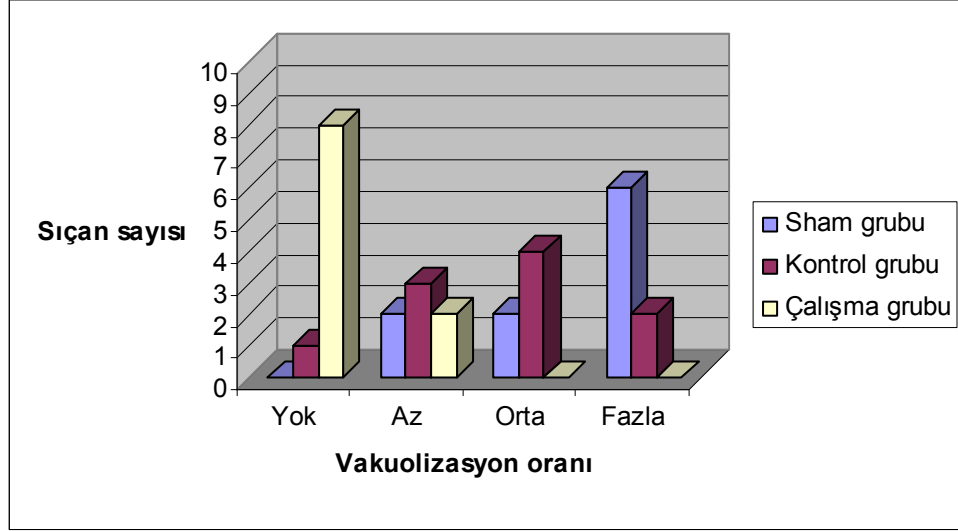
Grafik-1. Kontrol ve çalışma grupları prefüatların AST ve ALT değerlerinin karşılaştırılması



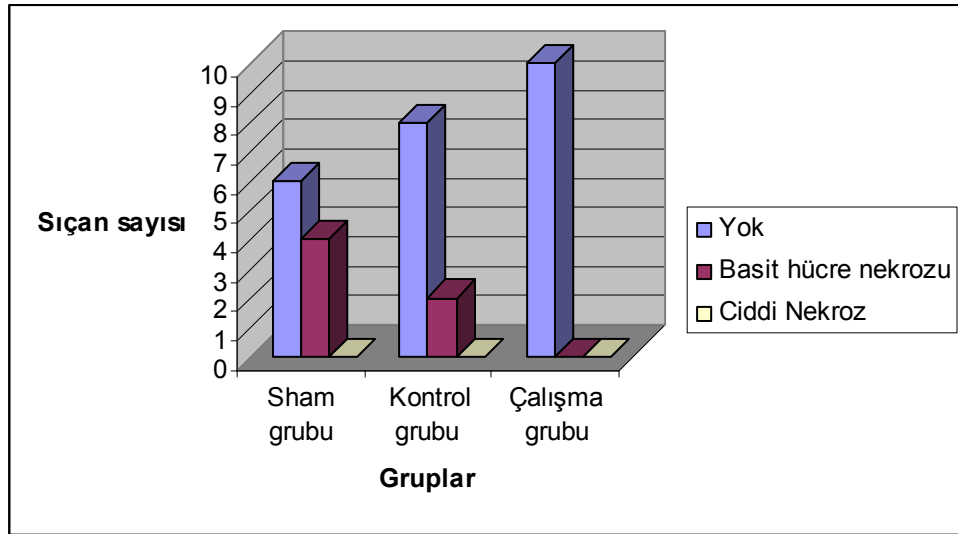
Grafik-2. Sham, kontrol ve çalışma gruplarında bcl-2 boyanma yüzdelerinin karşılaştırılması



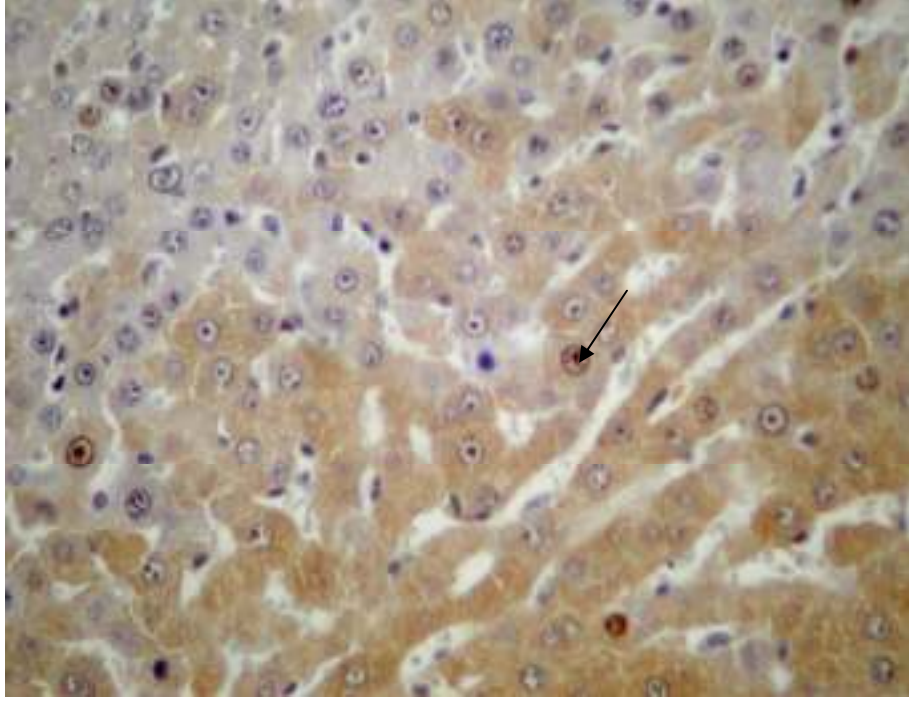
Grafik-3. Sham, kontrol ve çalışma gruplarında konjesyon derecelerinin karşılaştırılması



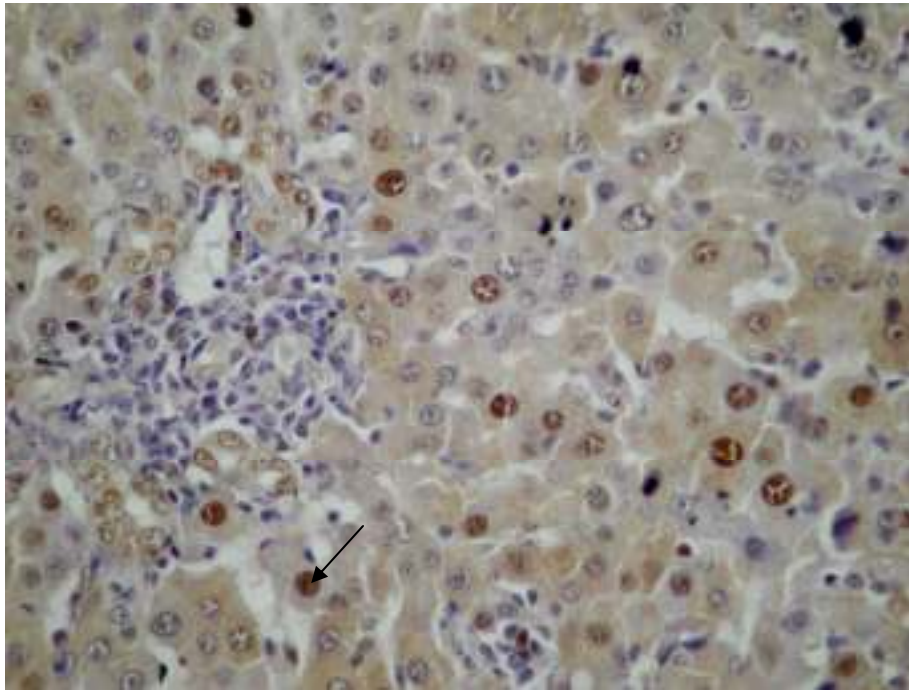
Grafik-4. Sham, kontrol ve çalışma gruplarında vakuolizasyon derecelerinin karşılaştırılması



Grafik-5. Sham, kontrol ve çalışma gruplarında nekroz derecelerinin karşılaştırılması



A

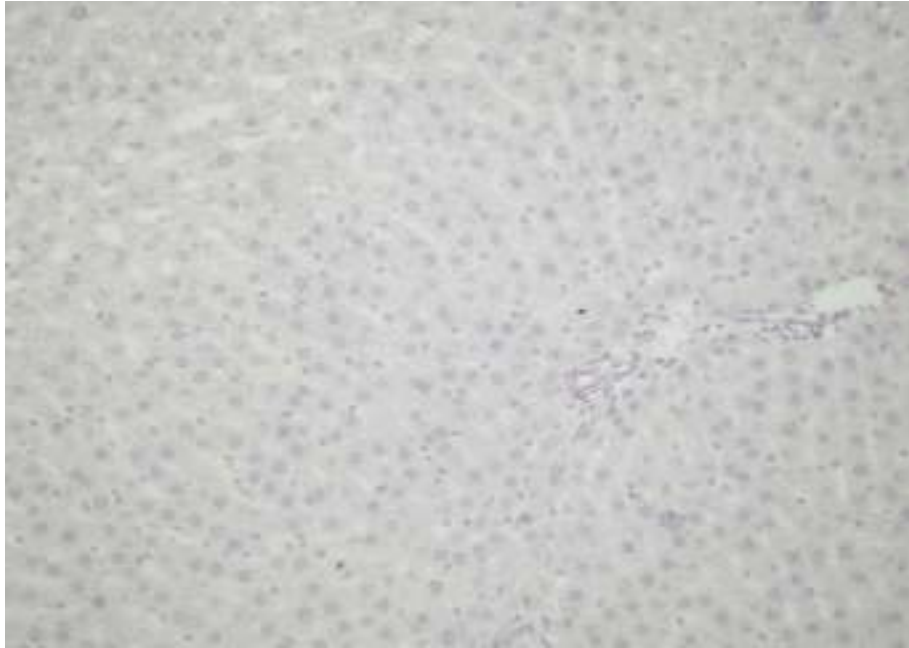


B

Resim-2. PCNA ile işaretli hepatositler (İHKx400). Sham grubu (A) ve çalışma grubu (B).

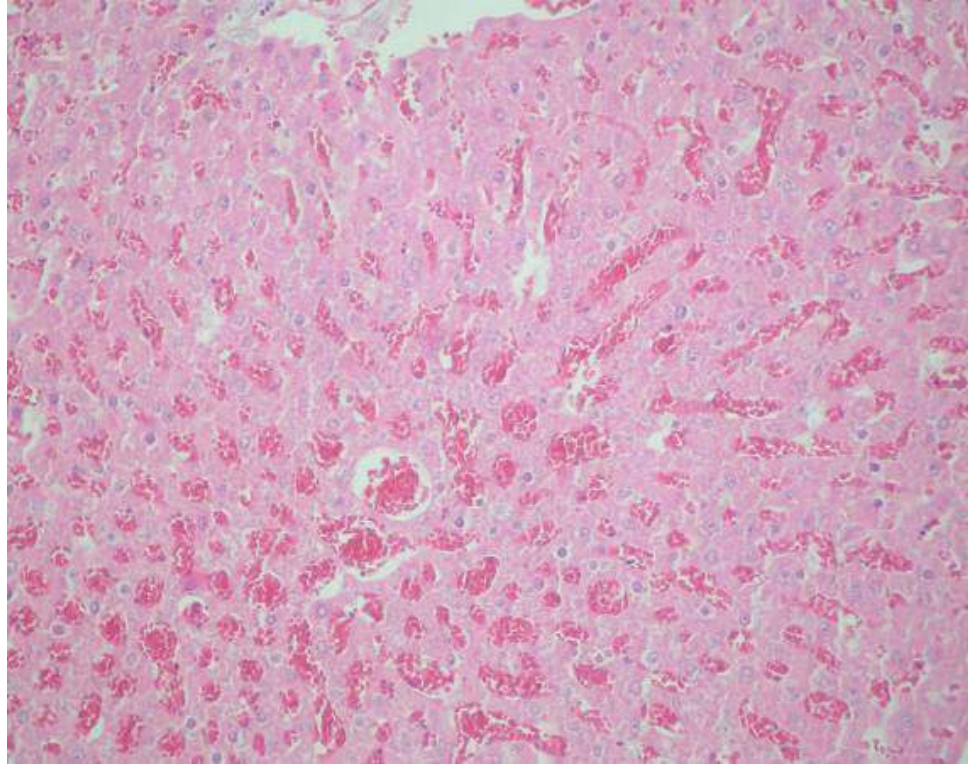


A

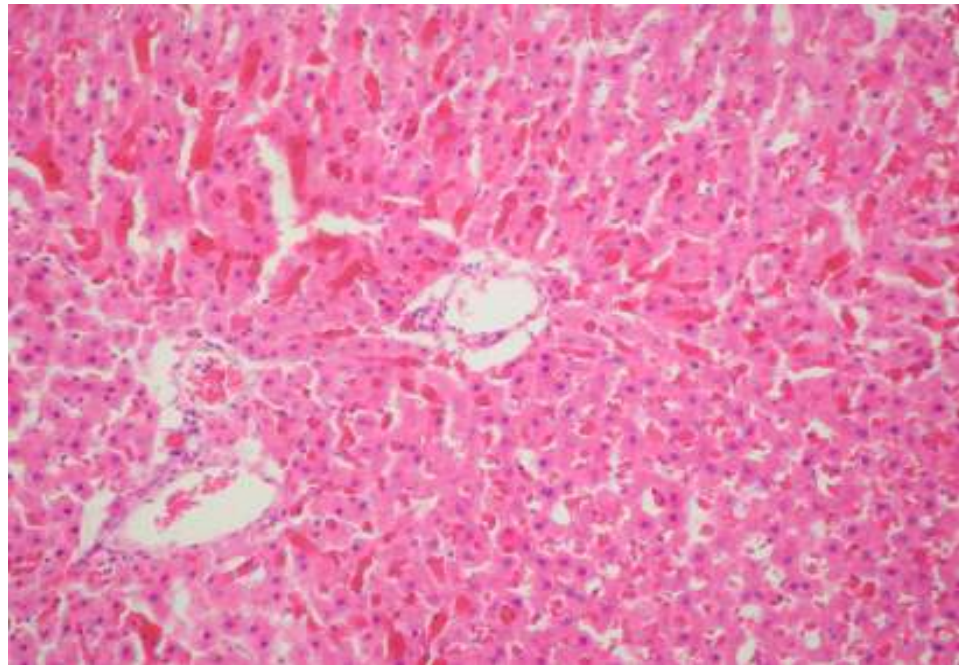


B

Resim-3. Bcl-2 ile işaretli hepatositler Sham grubu (İHKx200). (A) ve çalışma grubu (İHKx100)(B).

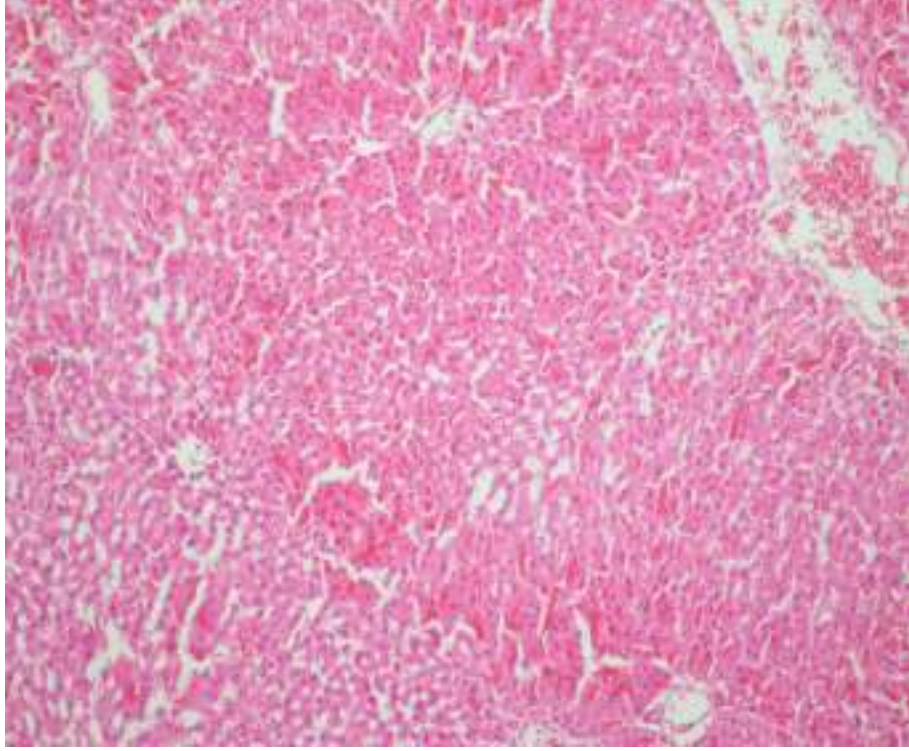


A

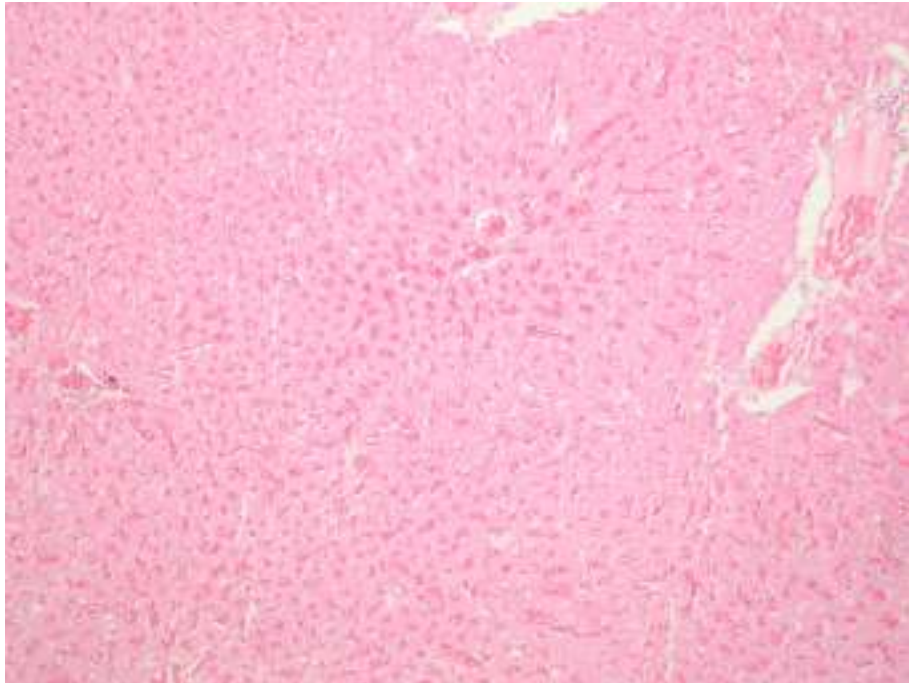


B

Resim-4. Sham grubu konjesyon IM A (x100), B (x200).

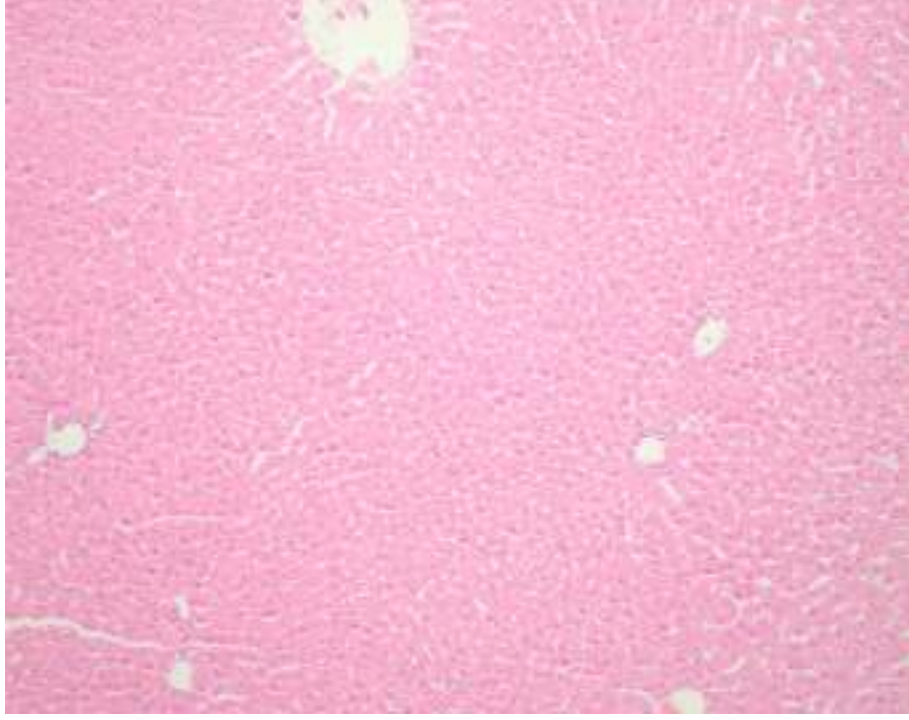


A

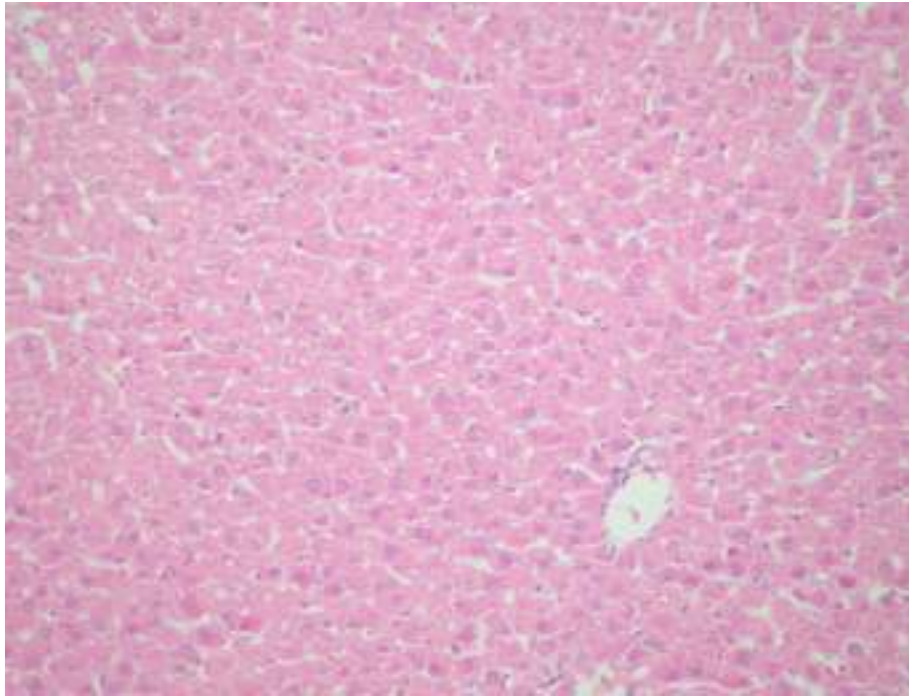


B

Resim-5. Kontrol grubu konjesyon IM A (x100), B (x200).

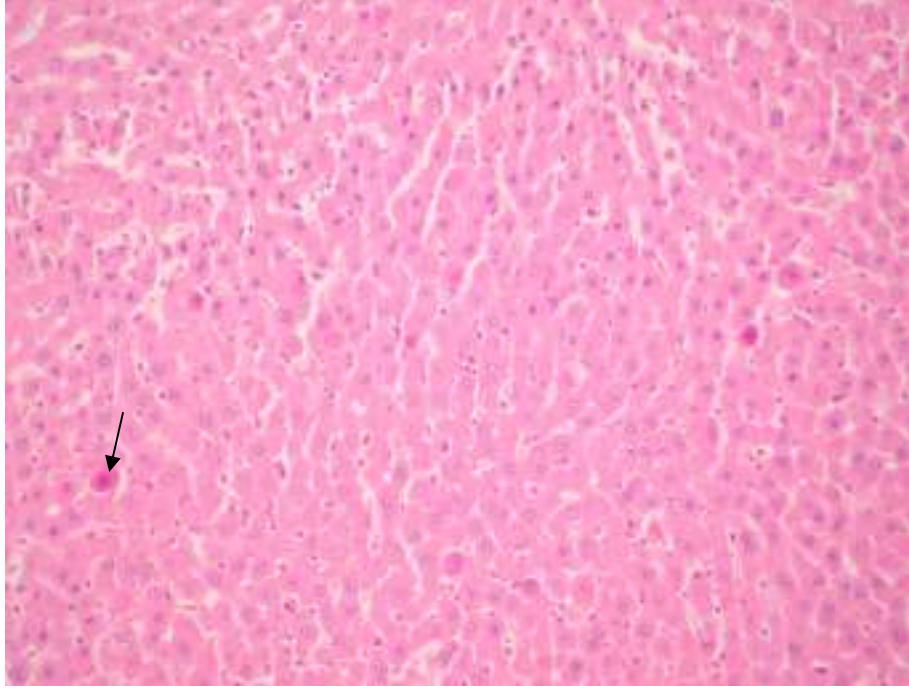


A



B

Resim-6. Çalışma grubu normal karaciğer dokusu IM A(x100), B (x200).



Resim-7. Sham grubu tek hücre nekrozları IM (x200).

5. TARTIŞMA

Çok çeşitli nedenler ile gelişen son dönem karaciğer hastalığında hastalar için tek tedavi şansı karaciğer transplantasyonudur. Ancak tüm hastalar bu tedavi şansını kullanamamaktadır. Organ bekleyen hasta sayısının giderek artması ve donör sayısının buna paralel bir artış göstermemesi transplantasyonu sınırlamaktadır. Transplantasyon modalitesinin önündeki en temel sorunlardan birisi olan donör sayı azlığının çözümlenmesi için çok çeşitli yaklaşımlar geliştirilmektedir. Son yıllarda donör havuzunu genişletmeye yönelik olarak kardiorespiratuar arrest gelişmiş donörler önem kazanmış ve NHBD'ler ilgi odağı haline gelmiştir. NHBD'lerin böbrek ve karaciğer transplantasyonlarında kullanıma girmesi ile organ havuzu yaklaşık %20 oranında arttırılmıştır (2).

Günümüzde transplantasyonu yapılan organlar arasında şüphesiz ki en güç olanı karaciğer transplantasyonudur. Karaciğer transplantasyonu diğer transplantasyonlardan önemli farklılıklar gösterir. Karaciğer metabolizmasının diğer organlarla da bağlantılı kompleks yapısı transplantasyon sonrasında önemli sorunlara yol açmaktadır. Tüm bu güçlüklerle rağmen karaciğer transplantasyonu günümüzde başarı ile uygulanan altın standart tedavi modalitesidir. Transplantasyonun başarı ile yapılabilirliği immüsupresyon, teknikteki gelişmeler ile donör azlığının efektif olarak giderilmesine bağlıdır (29).

Yeterli sayıda greftin bulunamaması bekleme listelerinin kalabalıklaşmasına ve hastaların bekleme sürecinde kaybedilmelerine neden olmaktadır. Bu yüzden günümüzde tüm çalışmalar donör organ sayısı azlığı üzerine yoğunlaşmıştır. Geçmişte beyin ölümü kriterlerinin tanımlanmadığı dönemlerde farkında olunmadan

kullanılan NHBD'ler organ havuzunun genişletilmesinde iyi bir potansiyeldir. Bu donörlerin karmaşık süreçlerinin greft survey ve fonksiyonlarına yansıyan kötü yanları geliştirilen stratejiler ile düzeltilebilirse NHBD'ler organ havuzunu çözmekte çok daha önemli rol oynayacaklardır. Tahminler, NHBD'lerin organ havuzuna her yıl yaklaşık 1000 donör eklenmesiyle kadaverik organ havuzunu potansiyel olarak %25–42 oranında arttıracığını göstermektedir (2, 3, 55).

Canlı donörlerden sağlanan greftler, karaciğer transplantasyonu için bekleme listelerinin yoğunluğu ve organ azlığı nedeniyle sıklıkla kullanılan bir yöntem halini almıştır ancak bu prosedür; verici için mortalite ve yüksek morbitide riskleri içermektedir. Canlı donör transplantasyonları erişkin yaş grubu böbrek transplantasyonlarının çoğunluğunu buna karşın karaciğer transplantasyonlarının %5–10'nunu oluşturmaktadır (59, 60).

2002 yılında bir canlı donörün operasyon sonrasında kaybedilmesi, dünyadaki tüm merkezlerde canlı donör transplantasyonlarını sınırlamıştır. Tüm tartışmalara rağmen son dönem karaciğer yetmezliği olanlarda canlı donör transplantasyonları halen başarı ile uygulanmaktadır. Çünkü bekleme listesinde geçen zamanda, karaciğer yetmezlikli hastalarda morbidite artmakta ve bazen de transplantasyon şansını kullanamadan hastalar kaybedilmektedir. Tüm sonuçlara karşı konu tartışmalıdır ve canlı donörün taşıdığı riskler halen minimize edilememiştir (59, 60).

NHBD'ler transplantasyonlardaki organ havuzuna ek bir kaynak sağlamaktadır. Prosedürleri daha kompleksdir ve buna karşın sonuçları HBD'lere göre daha kötüdür. Donör havuzunu genişletmedeki rolleri umut vadetmektedir. Acile geldiğinde eks olan, hastanede ani kardiyak arrest geçirerek kaybedilen hastaların greft kaynakları olarak kullanılabilmesi NHBD'ler sayesinde olmaktadır (55).

Merkezler arasında ölüm ile organ çıkarılması arasındaki süre değişmektedir ve bu konu halen tartışmalıdır. Kardiyopulmoner arrest sonrası hiçbir otoresüsitasyonun olmadığına garantilenmesi gerekmektedir. Günümüzdeki çalışmalar doğrultusunda bu sürenin 2 dk olduğu kabul edilmiştir. 2 dk'dan sonra otoresüsitasyon olma olasılığı neredeyse imkansız olarak kabul edilmektedir. Tüm tartışmalara rağmen bu prosedürde alıcının lehine kararlardan çok vericinin hakları gözetilerek uygulanmalıdır (85).

Manzarbeitia ve arkadaşlarının çalışmalarına göre NHBD'lerden alınan organlar beyin ölümlü hastalardan alınan organlar ile benzer özellikte survey ve fonksiyon göstermektedirler. Ve yaptıkları çalışma ile uzun dönem survey sonuçları açısından NHBD'ler ile diğer donörler arasında benzer sonuçların olduğunu yayınlamışlardır (86).

NHBD organlarının iyi tarafı beyin ölümü dolayısıyla oluşan sitokin cevabına bağlı iskemik etkilere maruz kalmamış olmalarıdır. Hayvan modelleri ile yapılan transplantasyonlarda transplantasyon öncesi ve sonrası dönemde beyin ölümü nedeniyle inflamatuvar markerların arttığı gösterilmiştir. Beyin ölümünün gerçekleşmesi artmış adezyon molekülleri ve sitokinlerin vasıtası ile karaciğere lenfosit ve makrofaj infiltrasyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu da transplantasyon sonrası dönemde greft ve hasta surveyini azaltmaktadır. İnsanlarda yapılan klinik karaciğer transplantasyonları kontrollü NHBD'lerde HBD'lere oranla intrasellüler adezyon molekülü I'in daha az salındığını göstermektedir. Lökosit, makrofaj ve monosit infiltrasyonları iki grup arasında benzerdir (55, 56).

NHBD'ler daha az ideal organlardır. Çünkü perfüzyon öncesi uzamış sirkülatuar arrest nedeniyle organlar iskemiye maruz kalmaktadırlar (3). NHBD'lerin kullanıma girebilmesi için bu organlardaki iskemi ve iskemi-reperfüzyon etkilerinin azaltılması yönündeki çalışmalar devam etmektedir. Kontrollü NHBD'lerde iskemik hasar daha azdır ve transplantasyon sonrası organ fonksiyonları daha iyidir. Tüm bu çabalar sayesinde NHBD'ler son birkaç yıldır kadaverik donörlerin %5'ini oluşturmaktadırlar (2, 3). Böbrekler sıcak iskemiye en uzun süre dayanan organlardır ve süre yaklaşık 120 dk'dır. Karaciğerin sıcak iskemiye dayanma süresi günümüzde yaklaşık 20 dk olarak kabul edilmektedir ve 20 dk'dan sonra hepatositlerde hasar başlamaktadır (57).

Transplantasyon dünyası halen hızla gelişmesini sürdürmektedir. İlk zamanlarda sıcak iskemi için kabul edilebilir üst sınır yaklaşık 10 dk olarak benimsenmiştir. Daha fazla olduğunda greft viabilitesinin önemli ölçüde etkilendiğini savunan yayınlar mevcuttur. Bu süre gözönüne alındığında bir çok donör karaciğer kullanılamaz hale gelmektedir. Bu da zaten sayıca az olan donör sayısı problemini daha da belirgin hale getirmektedir. Günümüzde bu sürenin

uzatılması ve yaklaşık 30 dk olarak kabul edilmesi yönünde tam olmasa da fikir birliği sağlanmış durumdadır. Böylece biraz olsun donör azlığı problemi aşılmaya çalışılmaktadır (66).

Monbaliu ve ark NHBD'lerle yaptıkları geniş serili deneysel bir çalışmada karaciğerin sıcak iskemiye tolerans zamanını belirlemeye ve ortak bir fikir oluşturmaya çalışmışlardır. Monbaliu ve ark çalışmalarında, 15–30–45 ve 60 dk'lık sıcak iskemi sürelerine maruz kalan greftler arasında farklılıkları araştırmışlardır. 60 dk sıcak iskemiye maruz kalan grupta anlamlı olarak daha fazla primer greft nonfonksiyonu geliştiğini; 30 ve 45 dk sıcak iskemiye maruz kalan gruplarda da kısmen kabul edilebilir fonksiyon bozuklukları geliştiğini göstermişlerdir. Monbaliu ve ark çalışmalarında karaciğer için kabul edilebilir sıcak iskemi süresinin 15–45 dk arasında olduğunu bildirmişlerdir (87).

NHBD'lerden sağlanan greftlerde uzun sıcak iskemi süresi kaçınılmazdır. Bu greftler renal transplantasyonlarda güvenli ve fonksiyonel şekilde kullanılabilirken; maruz kaldıkları sıcak iskemi nedeniyle karaciğer açısından daha fazla oranda primer nonfonksiyon ve yüksek insidanda bilier striktür ile karşımıza çıkmaktadırlar. Bu NHBD'lerin karaciğer greft havuzu açısından kullanılabilirliğini tartışmalı hale getirmektedir. Bu nedenle NHBD'lerin karaciğer transplantasyonu için tam anlamıyla kullanıma girmesinden önce sıcak iskemi ve benzer konulardaki sorular deneysel modeller ile cevaplanmalıdır. Bu sorular; karaciğerin kabul edilebilir sıcak iskemi toleransı nedir, karaciğerin implantasyon öncesi viabilitesini değerlendirebilecek teknikler geliştirilebilir mi, karaciğer greftlerinin sıcak iskemiye dayanıklılığını arttırabilecek ajanlar kullanılabilir mi? gibi sorulardır. Bu soruların cevapları deneysel modeller ile verilebilirse NHBD'lerin karaciğer transplantasyonu için kullanılabilirliği tartışmasız hale getirilebilir (87).

Karaciğerin 15–20 dakikaya kadar olan klasik normotermik iskemiye iyi tolere ettiği bilinmesine rağmen, iskemi süresinin artmasının cerrahi sonuçları ne oranda etkilediği hala tartışma konusudur. Günümüzde elektif şartlarda yapılan karaciğer rezeksiyonlarında portal triadın klempaj süresinin 90 dakikaya kadar uzatılabileceği savunulmaktadır. İskemi ve reperfüzyonun karaciğer üzerindeki etkileri iskeminin devamlılığı ile ilişkilidir. Karaciğerde 30–60 dakikalık iskemi geri dönüşümlü hasara neden olurken, 90–120 dakikalık iskemi geri dönüşümsüz hasara neden olur (36).

Takada ve ark yaptıkları çalışmada da karaciğer greftleri için sıcak iskeminin 60 dk ya kadar uzatılabileceği gösterilmiştir (88). Valdecassas ve ark ve Valero ve ark karaciğer greftleri için tolere edilebilir sıcak iskemi süresini 20 dk olarak bildirmişlerdir (89, 90).

Sıcak iskemi süresi limitasyonunda fikir birliği için bir çok çalışma literatürde devam etmektedir. Yi Ma ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada bu süre 30 dk olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada sıcak iskemi süresi arttıkça histolojik değişiklikler artmıştır. Bu çalışmada sonuç olarak sadece sıcak iskemiye maruz kalan greftlerde iskemi süresi 60 dk'nın altında ise hasar geri dönüşümlü olarak tanımlanmaktadır. Ancak hasarın reperfüzyon sırasında da arttığı bildirilmektedir. Bu yüzden sıcak iskemi süresi 30 dk olarak sağlanabilirse reperfüzyondan sonra bile hasar geri dönüşümlü olarak gerçekleşmektedir. Bu çalışmanın sonucunda özellikle sıçan karaciğer greftleri için sıcak iskemi süresinin 30 dk olarak sağlanması gerektiği vurgulanmaktadır. Böylece reperfüzyon sağlandığında bile, reperfüzyonun ek injürisine rağmen hasar geri dönüşümlü olarak gerçekleşmektedir (66).

Literatür bilgisi göz önüne alınarak bizim çalışmamızda, kardiyak arrest sonrası 30 dk'lık süre geçirildikten sonra cerrahi işleme başlandı. Çalışma ve kontrol gruplarına kardiyak arrestten 2 saat önce met-rantes ve SF verildi. Rantes blokajının karaciğer greft viabilitesine etkisi bahsedilen parametreler ışığında araştırıldı.

Otero ve ark çalışmasında kategori II NHBD'lerden alınan karaciğerler ile elde ettikleri %55'lik greft survey oranı kategori III ve IV NHBD'ler ve 70 yaşın üzerindeki HBD'lerden alınan karaciğer greft surveyleri ile karşılaştırılabilir düzeydedir. Kategori II NHBD vakaların karaciğer greft kaynağı olarak gösterilebilmesi için hasta ve greft survey oranlarının HBD'lere yaklaştırılması gerekmektedir. Otero ve ark. çalışmalarında kategori II donörlerin sıcak iskemi süreleri; kardiyopulmoner resüsitasyon ve abdominal-göğüs duvarı kompresyonu eşliğinde 130 dk'yı aşmadığında sonuçlar HBD'ler ile karşılaştırılabilir olduğunu bildirmektedirler (64).

Literatürde pek çok çalışma ile 15-60 dk arası sıcak iskemi sürelerinin greft üzerine etkileri araştırılmıştır. 15 dk dan 60 dk'ya doğru sıcak iskemi toleransının karaciğer greftlerinin fonksiyon ve surveyleri için anlamlı olarak kötüleştiği bildirilmektedir. 60 dk'lık sıcak iskemiye maruz kalan karaciğer greftlerinde primer

non-fonksiyon neredeyse kaçınılmaz olarak gerçekleşmektedir (87). Bizim çalışmamızda kardiyak arrest sonrası bekleme süresi 30 dk olarak gerçekleştirildi ve 30 dk sonunda karaciğer yıkama için hazırlanarak perfüzyona başlandı.

Delva ve arkadaşları 60–90 dakikalık iskemi sonrası AST ve ALT düzeylerinin arttığını ve 7. gün normale yakın seviyelere geldiğini bildirmişlerdir (33). Aminotransferazlardan AST ve ALT, akut hepatosellüler hasarın en iyi serum göstergeleridir. Sitoplazmik ve mitokondrial bir enzim olan AST, karaciğer dışında kalp, iskelet kası, böbrek, beyin gibi bir çok dokuda bulunurken, sitoplazmik bir enzim olan ALT başlıca karaciğerde bulunur ve AST'ye göre daha özgündür. Bu enzimler parankim hasarının olduğu dönemden itibaren yükselmeye başlar. Enzimlerin serum değerlerindeki yükselme hepatosellüler hasarın boyutlarını yansıtır. İskemi–reperfüzyon hasarının belirlenmesinde en sık kullanılan laboratuvar parametreleridirler (1, 33, 44).

Bizim çalışmamızda hepatektomi sonrası perfüze edilen kontrol ve çalışma grubu karaciğerlerin perfüze ediliş koşulları uygun koşullarda saklandı ve daha sonra AST ve ALT değerleri ölçüldü. Perfüzyon sırasında düşük viskoziteye sahip yıkama solüsyonu kullanıldı. Her iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark tespit edildi. Çalışma grubundaki değerler kontrol grubuna göre belirgin olarak daha düşüktü. Met–rantes grubunda AST ve ALT değerlerinin düşük bulunması, rantesin blokajının inflamasyonun bir çok basamağının bloke edilmesi nedeniyle karaciğer hücre hasarının daha az gerçekleştiğinin kanıtı olarak söylenebilir. Bu görüş ile yola çıkıldığında AST ve ALT değerlerinin düşük olduğu met–rantes grubunda karaciğer hücre viabilitesinin daha iyi olduğu ve greft survey ve fonksiyonu açısından daha iyi sonuçlar verebileceği öngörülebilir.

Marjinal donörlerin kullanıma girmesi ve greft surveyleri için; yıkama solüsyonlarının major önemi mevcuttur. NHBD karaciğer greftleri iskemik olarak hasarlıdır ve hasarın azaltılıp fonksiyonların optimize edilebilmesi için prezervasyon şartlarının düzeltilmesi gerekmektedir. NHBD'ler için en hayati prosedürlerden birisi greftin kan artıklarından ve doku kalıntılarında tamamen temizlenmesi için yıkama işleminin efektif olmasıdır (71).

Bessems ve ark.nın yaptığı, yıkama solüsyonlarının karşılaştırıldığı çalışmalarında ringer laktat, HTK ve polisol kullanılmıştır. Üç ayrı solüsyonun karaciğer hasarını önleyici etkileri karşılaştırılmıştır. Karaciğer hasarının AST ve ALT düzeyleri ile belirlendiği bu çalışmada, hepatosellüler hasar ringer laktat grubunda belirgin olarak yüksek diğer iki grupta yaklaşık aynı düzeyde bulunmuştur (71).

Tojimbara ve ark NHBD modeli ile yaptıkları sıçan deneylerinde düşük viskoziteli yıkama solüsyonu kullanıldığında vasküler rezistansın azaldığını, iskemi–reperfüzyon injurisinin iyileştiğini ve greft surveyinin daha iyi olduğunu göstermişlerdir (91).

Pirrenne ve ark çalışmalarında yüksek viskoziteli yıkama solüsyonları ile düşük viskoziteli solüsyonları karşılaştırmışlardır ve bilier striktür insidansının yüksek viskoziteli solüsyonlar ile yıkanan greftlerde daha yüksek oranda gerçekleştiğini göstermişlerdir (92).

Bizim çalışmamızda da literatür bilgisine paralel olarak düşük viskoziteli yıkama solüsyonu olan HTK kullanıldı. Transplantasyon modeli oluşturulmadığı için bilier striktür ve karaciğer greft surveyleri araştırılmadı. Çalışmamızda karaciğer viabilitesini arttırmaya yönelik kardiyak arrest öncesi met–rantes verilerek 30 dk'lık süre geçirildi ve karaciğer greftleri 60 dk süreyle HTK solüsyonu ile perfüze edildi.

Karaciğer ile ilgili cerrahi girişimler sırasında, iskemi ve iskemi–reperfüzyon modeline uyan değişiklikler olmaktadır. İskemik dönemde hücre hasarı olurken, hipoksik periyodu izleyen reperfüzyon döneminde bu hasar daha da artmaktadır (37, 38). Hasara neden olan faktörler serbest oksijen radikalleri, lökosit migrasyonu ve aktivasyonu, sinüzoidal endotelyal hücre hasarı, mikrosirkülasyondaki düzensizlikler, koagülasyon sisteminin aktivasyonu olarak özetlenebilir (37, 39, 40).

Greft rejeksiyonuna neden olan temel olay alıcının makrofaj ve lökositlerinin greft alanına akışı ve inflamasyonu başlatmasıdır. Bunlar greft içerisine girerek adezyon moleküllerine bağlanırlar ve salgıladıkları ürünler nedeniyle hasara ve sonuçta rejeksiyona neden olurlar. Buna göre greft sonuçlarını etkileyen inflamatuvar ve immün cevaplar üzerinde kemokinlerin rolü olduğu söylenebilir (93).

Eosinofiller akut rejeksiyon sürecinde anahtar rol oynamaktadır. Greft eosinofilisi pek çok merkezde karaciğer allogreftlerinde akut rejeksiyon için diagnostik bir kriter olarak kabul edilmektedir. Eosinofiller etkilerinin muhtemelen IL-5 ve rantes üzerinden göstermektedirler. İnsan renal allogreftlerinde rantesin T hücre apoptozisine neden olduğunu ayrıca greft eosinofilisinin rantes üzerinden akut rejeksiyon ile bağlantılı olduğunu bilinmektedir (94).

İskemi-reperfüzyonda otokrin, parakrin ve hormonal mekanizmalarla inflamatuvar mediatörler, sitokinler, adezyon molekülleri ve kemokinler gibi maddeler ortaya çıkar, ve sonuçta hücre hasarı artırır (32).

Gomez ve ark.'nın yaptıkları çalışmada NHBD'ler ile HBD'ler, böbrek biopsileri açısından karşılaştırıldığında; NHBD'lerin biopsilerinde daha yüksek düzeyde rantes, ICAM-I ve VCAM-I gen ekspresyonunu göstermişlerdir. Ayrıca transplantasyon öncesi yüksek rantes düzeyleri ile akut rejeksiyon arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir (4).

Anselmo ve ark. ları çalışmalarında T lenfosit infiltrasyonunun inhibisyonuna yönelik immunsupresif bir ajan olan FTY 720'yi kullanmışlardır. Çalışma grubunda sıcak iske mi hasarının ve T hücre infiltrasyonunun belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca transplantasyon surveyleri de çalışma grubunda anlamlı olarak uzun bulunmuştur (95).

Bhatia ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, farelerde serulin hiperstimülasyonu ile oluşturulan pankreatitte met-rantesin akciğer tahribatını ve pankreatik tahribatı azaltmada etkisi olduğunu göstermişlerdir (96).

Stojanovic ve arkadaşları sıçanlarda allogenik ince barsak transplantasyonu sonrasında 5 gün Met-Rantes vererek, akut rejeksiyonda endotelial hücrelerdeki mukozal perfüzyondaki harabiyeti azalttıklarını göstermişlerdir (97).

Gröne ve ark çalışmasında met-rantes renal transplantasyon sonrası akut rejeksiyon sırasındaki vasküler ve tübüler hasarı monosit aktivasyonunu bloke ederek azaltmaktadır. Rantes reseptörlerinin met-rantes ile bloke edilmesiyle erken inflamatuvar olaylarda azalma sağlanmakta ve bu da akut rejeksiyonun önlenmesinde anahtar rol oynamaktadır (5).

Schröppel ve ark çalışmalarında bu tür kemokinlerin karaciğer transplantasyonu sonrasında rejeksiyon üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada invitro olarak artmış rantes düzeylerinin CD4 T hücrelerini aktive ettiği ve rantesin blokajının deneysel çalışmalarda böbrek ve akciğer transplantasyonlarından sonra greft rejeksiyonunu inhibe ederek azalttığını göstermişlerdir. Sonuç olarak Schröppel ve ark çalışmalarında; rantesin engellenmesi ile greft surveyleri arttırılmış ve rejeksiyonlar engellenmiştir (98).

Ajuebor ve ark çalışmalarında rantesin blokajının hepatik injüriyi azalttığını göstermişlerdir (99).

TNF- α ve IL-1 hepatik iskemi-reperfüzyon hasarında en sık rol oynayan sitokinlerdir. İskemi reperfüzyon sürecinde, mikrovasküler endotelde inflamasyon oluşur. Trombositlerden degranülasyon ile rantes açığa çıkar. Çoğu doku IL-1 ve TNF alfa gibi proinflamatuvar stimuluslara cevap olarak rantes üretmektedir. Rantes endotel yüzeyindeki reseptörlerine bağlanır ve dolaşan lökositleri yüzeye çeker (5).

Hücre hasarına neden olan endoteliyal hücreler ile inflamatuvar hücreler arasındaki mekanizmalarda; rantes, ICAM-1 ve VCAM-1'in önemli rollerinin bulunduğu dair kanıtlar mevcuttur. Gomez ve ark. yaptığı bir çalışmada sıcak iskemi ile bu molekül düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir (4). Bu nedenle sıcak iskemi süresinin uzun olduğu NHBD'lerde rantesin blokajının proinflamatuvar süreçleri hafifleteceği düşünülebilir. NHBD'lerin maruz kaldığı iskemik sürecin etkilerinin minimize edilmesi bu organlar ile yapılan transplantasyonlarda sıklıkla görülen primer greft disfonksiyonunu ve kötü survey sonuçlarını olumlu yönde etkileyecektir. Rantesin blokajı bir çok basamakta iskeminin etkilerini bloke etmesi açısından anahtar rol oynamaktadır.

Bu nedenle bizim çalışmamızda deneysel kontrollü NHBD modeli oluşturularak rantesin etkileri met-rantes ile bloke edilmiş, bu blokajın da karaciğer hücre viabilitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Planlanan kardiyak arrest vakalarında, karaciğerin maruz kalacağı iskemik hasar minimize edilebilirse greft fonksiyonu açısından önemli yararlar sağlanacaktır. Böylece marjinal olarak adlandırılan, greft survey ve fonksiyonu açısından kötü karaciğer greftleri, daha kullanılabilir hale gelecektir. Transplantasyon modalitesinin önündeki en önemli engellerden biri olan organ havuzu sıkıntısı belirgin ölçüde aşılmış olacaktır. Çalışmamızda met-rantes

verilerek sitokin ve kimokinlerin etkileri azaltılmaya çalışılmış ve çalışmada kullanılan parametreler ile bu durumun karaciğer dokusuna yansımaları değerlendirilmiştir.

Sıcak iskemiyin kendisi karaciğer hasarına yol açmaktadır ki bu hasarı iskemi–reperfüzyon injurisi daha da artırmaktadır. Reperfüzyondan önce karaciğer spesmenlerinin incelendiği çalışmalarda sıcak iskemiyin kendi başına etkisi koagülasyon, konjesyon, hepatosit nekrozu ve vakuolizasyon ile kanıtlanmıştır (67, 68).

Yi Ma ve ark. çalışmasında donör karaciğerlerinin histolojik durumları incelenmiştir. Histolojik yapı sıcak iskemi süresi 30 dk'dan kısa olduğunda daha hafif değişiklikler göstermiştir. 30 dk'dan uzun sıcak iskemi sürelerinde sitoplazma kaybolmuş, hücre ödemi gelişmiş ve hücre lobülasyonları belirginleşmiştir. Portal sahada lökosit infiltrasyonu ve hücrelerde asidofilik cisimcikler görülmeye başlamıştır. Bu çalışmada sıcak iskemi 60 dk'dan uzun sürdüğünde hücre dejenerasyonu kaçınılmaz hale gelmiştir. Dejenerasyon derecesi sıcak iskemi süresi ile doğrudan ilişkilidir. Nekroze alanlar dikkati çekmeye başlamaktadır. Reperfüzyondan 6–24 saat sonrasında karaciğerdeki iskemi daha da belirginleşmeye başlamıştır. Yi Ma ve ark. çalışmalarında sıcak iskemiyin süresi 30 dk'yı geçtiğinde greftte glukozun azaldığını, ATPaz ve siklooksijenaz aktivitelerinin düştüğünü göstermişlerdir. Ayrıca 30 dk'dan uzun sıcak iskemi sürelerinde hücresel boyutta vakuolizasyon ve konjesyon geliştiğini göstermişlerdir (66).

Monbaliu ve ark çalışmalarında sıcak iskemi sonrası hepatositlerde vakuolizasyon geliştiğini gösterdiler. 60 dk'lık sıcak iskemi sonrasında ise değişiklikler tüm lobülde görülmüştür. 30 ve 45 dk'lık gruplarda değişiklikler orta düzeyde gerçekleşmiştir. Mikroskopik değişikliklerin reperfüzyon sonrasında bir saatte neredeyse tama yakın düzeldiğini göstermişlerdir (87).

Yapılan çalışmalarda iskemiyeye maruz kalan karaciğer hücrelerinde bir takım histopatolojik değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Suzuki ve arkadaşları bu değişiklikleri derecelendirmek suretiyle sınıflandırmıştır (Tablo 1) (83). Bizim çalışmamızda da sıcak iskemiyin etkilerini göstermek için Suzuki skorlaması kullanıldı. Gruplar konjesyon, vakuolizasyon ve nekroz açısından derecelendirilerek birbirleriyle karşılaştırıldı.

Gruplar konjesyon açısından karşılaştırıldığında her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi. Çalışma grubunda konjesyon istatistiksel olarak anlamlı az görüldü. Vakuolizasyon açısından da her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi. Vakuolizasyon ve konjesyonun iskemiye yanıt olarak gerçekleştiği düşünüldüğünde çalışma grubunda her iki parametrenin de anlamlı olarak düşük oranda gerçekleşmesi, rantesin blokajının karaciğer hücre canlılığının devamı açısından faydalı olabileceği sonucuna varılabilir.

Sham ve kontrol gruplarında nekroz basit hücre nekrozu şeklinde gerçekleşti. Kardiyak arrest sonrası 30 dk beklenilmesine rağmen nekrozun basit hücre nekrozundan daha fazla ileriye gitmediği görüldü. Çalışma grubunda ise basit hücre nekrozu dahil hiç nekroz görülmedi. Bu durum kardiyak arrest sonrası bekleme süresinin kısa olması ve karaciğerlerin efektif reperfüze edilmesi ile açıklanabilir. Çalışma grubunda nekroz, hiç görülmemesine rağmen nekroz açısından gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilemedi. Bu durum da sham ve kontrol gruplarında ciddi nekrotik alanların oluşmamasına bağlanabilir.

Normal karaciğerde PCNA antikoru ile immünohistokimyasal inceleme sonrası önemsenmeyecek kadar az sayıda hücrede boyanma saptanırken, rejenerasyon olan karaciğerde son derece yüksek sayıda hücrede pozitif boyanma saptanmaktadır (48). Yamano ve ark. portal ven ligasyonu sonrası rejenerasyonu uyardıkları çalışmada portal ven ligasyonu yapılmamış olan ve rejenerasyon oluşan lobda, artmış PCNA aktivitesini göstermişlerdir (100).

Bu çalışmada her üç grupta PCNA değerlerine bakılarak, rejenerasyon açısından değerlendirilmesi amaçlandı ancak PCNA açısından karşılaştırıldığında her üç grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi. Karaciğer rejenerasyonunun iskemi–reperfüzyon sürecine bağlı olarak geliştiği düşünülürse; bu durum da, deneysel olarak oluşturulan NHBD modelinde tam anlamıyla iskemi–reperfüzyon sürecinin oluşmaması ile açıklanabilir.

Bcl-2 hücre yaşamını apoptozisi bloke ederek uzatmaktadır. İskemiye maruz kalan hücrelerin seçtikleri ölüm yolu olan apoptozisin baskılanması da karaciğer greftlerinde viabilitenin devamı için önemlidir (49).

Yamamoto ve ark tarafından yapılan çalışmada, sıçan karaciğerlerinin rejeksiyon sırasında apoptozise rezistans gösterdiklerini ve hepatositlerin canlılıklarını korumaya çalıştıklarını göstermişlerdir. Herhangi bir nedenle iskemiye maruz kalan hücrenin apoptozisten korunmak için bcl-2 eksprese ettiğini yayınlamışlardır (101).

Gapany ve ark. çalışmalarında karaciğer allogreft rejeksiyonlarında safra kanalı hücrelerinin apoptozisinin bcl-2'nin seviyeleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (102). Hepatositlerin ve bilier hücrelerin apoptozisi greft rejeksiyonunda kilit noktada yer almaktadır. Apoptozis nedeniyle kaybedilen hücre sayısı ile rejeksiyonun şiddeti belirlenmektedir.

Her üç grup karşılaştırıldığında bcl-2 boyanma yüzdeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi. Sham ve kontrol gruplarında bcl-2 daha fazla yüzdeyle boyanırken, çalışma grubunda bcl-2 boyanma yüzdesi %10 seviyesinde gerçekleşti. Bcl-2 ekspresyonunun hücrenin iskemiye maruz kaldığını gösterdiği bilindiğinden; çalışma grubunda daha düşük yüzdeli bcl-2 boyanması, bu grupta rantesin blokajının hepatositleri iskeminin etkilerinden koruduğu şeklinde yorumlanabilir. Çalışmamızda grupların kardiyak arrest sonrası bekleme süreleri eşit olarak gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle bu istatistiksel olarak anlamlı fark, met-rantesin greft viabilitesi koruduğu yönündeki fikrimizi desteklemektedir.

Abt ve ark. çalışmasında NHBD'lerin gelecekte devam edecek olan karaciğer greft sorununun çözümünde anahtar rol oynayacakları savunulmaktadır. Bu çalışmada NHBD karaciğer surveylerinin daha az olduğu gösterilmiştir. Ancak soğuk iskemi süresinin minimize edilmesi ile bu surveylerin de HBD ile karşılaştırılabilir seviyelerde gerçekleşeceği bildirilmektedir (103).

D'Alessandro ve ark. çalışmasının sonuçlarına göre kontrollü NHBD'lerle yapılan transplantasyon sonuçları hasta surveyi ve transplantasyon sonrası komplikasyonlar açısından HBD'ler ile karşılaştırılabilir düzeydedir. Bununla birlikte primer nonfonksiyon NHBD'lerden alınan greftlerin kullanıldığı alıcılarda daha sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Buna benzer olarak 3 yıl sonraki greft surveyleri de NHBD'lerde daha düşük olarak bulunmuştur. Ancak tüm sonuçlara rağmen gelişmelere paralel olarak kontrollü NHBD'ler karaciğer transplantasyonu için cesaret ve umut vericidir (104).

Çalışmalar göstermektedir ki NHBD'lerin kullanıma girmesi ile donör organ sayısı yaklaşık %20–25 oranında artmaktadır. Organ hazırlanmasındaki, pre–postoperatif bakımdaki ve immüsupresyondaki teknolojik gelişmeler sayesinde bu tür greftlerin fonksiyon ve surveyleri optimize edilebilmektedir. Bu sayede NHBD'ler günümüzde transplantasyon modalitesi için umut vaat eder hale gelmiştir.

Ayrıca NHBD'lerin donasyonunun temel prensipler göz önüne alındığında daha etik olması nedeniyle de ilgi her geçen gün artmaya devam etmektedir (104). Kontrolsüz NHBD'ler organ havuzunun en potansiyel grubudur ve her yıl bu gruba yaklaşık 5000 yeni donör eklenmektedir. Ancak kontrolsüz olmaları da bir sürü ek problemi yanında getirmektedir. Kontrollü NHBD'ler de havuza her yıl yaklaşık 1000 yeni donör sağlamaktadırlar (69, 103).

Bu nedenle; oldukça büyük bir donör havuzu sağlayacak olan NHBD'lerin transplantasyon için kullanıma girmesi greft sıkıntısını önemli ölçüde giderecektir. Bizim çalışmamızda met–rantes verilen çalışma grubunda; met–rantesin morfolojik ve biyokimyasal olarak hepatosit viabilitesini iskemiye karşı koruduğu gösterilmiştir. Bu durum NHBD greftlerinde sağlanabilirse greft survey ve fonksiyonu açısından önemli yararlar sağlayacaktır. NHBD'lerdeki en temel sorun olarak görülen uzamış iskemiye bağlı etkilerin bu teknikle kısmen de olsa azaltılabileceği öngörülebilir.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre; met–rantes, NHBD karaciğer greftlerinde hepatosit viabilitesinin arttırılması ve devamı için faydalı bir ajan olarak umut vadetmektedir.

6. SONUÇLAR

Ekim–Aralık 2006 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yapılan, deneysel kontrollü non–heart beating donör modelinde met–rantesin karaciğer viabilitesine etkisi ve bu greftlerin kullanılabilirliğinin araştırıldığı bu çalışmada elde edilen sonuçlar şu şeklide sıralanabilir:

1. Bu çalışmada biyokimyasal olarak karaciğer hasarının belirgin göstergelerinden olan serum AST ve ALT düzeyleri araştırılmıştır. Kontrol ve çalışma gruplarının karaciğer perfüzyon sıvılarından çalışılan bu değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. Bu biyokimyasal sonuçlar non–heart beating donörlerdeki en temel sorun olan sıcak iskemi süresinin hepatositler üzerindeki yıkıcı etkisinin met–rantes ile rantes blokajının yapıldığı çalışma grubunda daha az gerçekleştiğini ve met–rantesin hepatosit viabilitesinin devamlılığında koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.

2. S fazındaki hücrede eksprese edilen PCNA, hücrenin proliferasyonu olduğunu immünohistokimyasal kanıttır. Proliferasyon sürecini yaşayan hücrelerden salınan PCNA bir anlamda hücrenin viabilitesini koruduğunun göstergesidir. Bizim çalışmamızda da hücre için proliferasyon ve viabilite markeri olarak nitelendirilebilecek PCNA her 3 grupta boyanarak karşılaştırıldı. PCNA değerleri açısından her 3 grup karşılaştırıldığında çalışma grubunda daha fazla hepatositin PCNA ile boyandığı görüldü. Met–rantes’in kısmen de olsa hücreleri proliferasyona sürüklediği söylenebilir ancak gruplar arasında istatistiksel olarak fark tespit edilemedi.

3. İskemiye maruz kalan hücreler, eğer iskemi sonlanmaz ise belli bir sürenin sonunda nekroza uğramaktadır. Donörlerdeki en önemli problemlerden biri de iskemi nedeniyle hepatosit nekrozunun gelişmesidir. Bu çalışmada da gruplar nekroz açısından karşılaştırıldı. Her 3 grupta da eşit iskemi süreleri sağlandı. Sham ve kontrol gruplarında basit hücre nekrozları görüldü. Met-rantes verilen çalışma grubunda basit hücre nekrozu hiç görülmemesine rağmen nekroz açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Met-rantes'in hepatositleri iskeminin başlıca etkilerinden olan nekrozdaki koruduğu söylenebilir ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmaması met-rantes'in bu etkisini desteklememektedir. Bu durum sham ve kontrol grubunda efektif perfüzyon nedeniyle ciddi nekroz alanlarının oluşmamasına bağlanabilir.

4. İskeminin hepatositler üzerindeki etkilerini gösteren konjesyon ve vakuolizasyon açısından gruplar karşılaştırıldığında her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi. Met-rantes verilen çalışma grubunda 7 denekte konjesyon ve 8 denekte vakuolizasyon görüldü. Bu sonuç met-rantesin hepatositlerin iskemiye dayanıklılığını arttırdığını göstermektedir.

5. Bcl-2, çeşitli nedenlerle iskemiye maruz kalan hücrelerde apoptozisten korunma amaçlı salgılanan bir proteindir. Bcl-2 salgılayan hücrenin iskemiye maruz kaldığı söylenebilir. Bcl-2 boyanma yüzdeleri açısından gruplar karşılaştırıldığında her 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü. Kontrol ve çalışma grubu kendi içlerinde değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farkın devam ettiği tespit edildi. Bu çalışmada bcl-2'nin çalışma grubunda, istatistiksel olarak anlamlı daha az boyandığı görüldü. Her üç grubun iskemi süreleri eşit gerçekleştirildiğinden; hücrede iskemi etkisi ile apoptozisten korunmak için eksprese edilen bcl-2'nin met-rantes verilen çalışma grubunda daha az boyanması, met-rantes'in hepatositleri iskeminin kötü etkilerinden koruduğunu göstermektedir.

Tüm bu sonuçlar, sıcak iskemi zamanının en temel sorun olduğu NHBD'lerde met-rantes ile rantes blokajının, hepatositlerin iskemiye dayanıklılığını arttırdığını göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Schwartz SI. Liver. In: Timothy S, Steven AC (eds), Schwartz's Principles of Surgery (8th ed) McGraw–Hill, Philadelphia 2004,pp.1139-1187.
2. Kimber RM, Metcalfe MS, White SA, Nicholson ML. Use of non–heart–beating donors in renal transplantation. Postgrad Med J. 2001;77:681–85.
3. Reich DJ, Munoz SJ, Rothstein KD et al. Controlled non heart–beating donor liver transplantation: a successful single center experience, with topic update. Transplantation. 2000;70:1159–66.
4. Gomez del Moral M, Aviles B, Colberger IK et al. Expression of adhesion molecules and RANTES in kidney transplant from non heart–beating donors. Transpl Int. 2005;18:333–40.
5. Gröne HJ, Weber C, Weber KS et al. Met–RANTES reduces vascular and tubular damage during acute renal transplant rejection: blocking monocyte arrest and recruitment. FASEB J. 1999;13:1371–83.
6. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic histology (10th ed). Lange, Connecticut 2002,pp.307–20.
7. Townsend MC, Beauchamp RD, Evers BM. Liver. In: Meyers WC, Chan RS (eds), Sabiston Textbook of Surgery (17th ed) WB Saunders Company, Philadelphia 2004,pp.997–1059.

8. Jarnagin WR, Fong Y, Blumgart LH, Launois B. Hepatic resection. In: Schein M, Wise L (eds), *Crucial controversies in surgery* Karger Landes Systems, Swiszerland 1997, pp.201–16.
9. Terblanche J, Launois B. Liver resection. In: Terblanche J (eds), *Hepatobiliary malignancy its multidisciplinary management* Edward Arnold Company, London 1994,pp.506–55.
10. Bismuth H. Surgical anatomy of the liver. In: Bengmark S, Blumgart LH (eds), *Liver surgery* Churchill Livingstone, Edinburgh 1986,pp.1–7.
11. Meyers WC, Jones RS. Anatomy. In: Meyers WC, Jones RS (eds), *Textbook of liver and biliary surgery* JB Lippincott Company, Philadelphia 1990,pp.18–38.
12. Norton JA, Bollinger RR, Chang AE. Liver. In: Hemming A, Gallinger S (eds), *Surgery Basic Science and Clinical Evidence* Springer, New York 2004,pp.585–616.
13. Gerbe MA, Swan NT. Histology of the liver. *Am J Surg Pathol* 1987;11:709–22.
14. Ito T, Shibasaki S. Electron microscopic study on the hepatic sinusoidal wall and the fat-storing cells in the human normal liver. *Arch Histol Jpn* 1968;29:137–41.
15. Kuran O. *Sistematik Anatomi. Filiz Kitabevi, İstanbul* 1983;sf.429–43.
16. Lafortune M, Madore F, Patriguin H. Segmental anatomy of the liver. *Radiology* 1991;181:443–8.
17. Fasel JH, Selle D, Evertsz CJ. Segmental anatomy of the liver; poor correlation with CT. *Radiology* 1988;206:151–7.
18. Delattre JF, Avisse C, Flament JB. Anatomic basis of hepatic surgery. *Surg Clin N Am* 2000;80:345–62.
19. Dominiononi L, Chiappa A, Cuffari S, Dionigi R. Vascular occlusions during resection of the liver. In: Dionigi R, Madariaga J (eds). *New technologies for liver resections*. Karger Landes Systems Basel 1997; pp. 68–94.

20. Skandalakis JE. Liver. In: Gray SW, Rowe JS (eds), *Surgical Anatomy and Technique* (2nd ed.) Springer, New York 2002,pp.531–73.
21. Huguet C, Addario–Chieco P, Gavelli A, Arrigo E, Harb J, Clement RR. Technique of hepatic vascular exclusion for extensive liver resection. *Am J Surg* 1992;163:602–5.
22. Launois B, Jamieson GG. *Modern operative techniques in liver surgery* Churchill Livingstone, Edinburgh 1993,pp.673–9.
23. Emre A. Karaciğerin cerrahi anatomisi. Kalaycı G (ed). *Genel cerrahi*. Nobel Tıp Kitabevi 2002;sf.1083–9.
24. Guyton AC. Liver. In: Guyton AC, Hall JC (eds), *Textbook of medical physiology* (11th ed) WB Saunders Company, Philadelphia 2005,pp.896–912.
25. Gall EA, Mostofi FK. *The liver*. Krieger Publishing Company, New York 1980,pp.136–44.
26. Kraus–Friedman N. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Physiol.* 1984;64:170–1.
27. Keppens S, Vandekerckhove A, Moshage H, Yap HS, Aerts R, De Wulf H. Regulation of glycogen phosphorylase activity in isolated human hepatocytes. *Hepatology* 1993;17:610–4.
28. Ratych RE, Smith GW. *Anatomy and Physiology of the Liver*. In: Zuidema GD, Orringer MB, Ritchie WB (eds), *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract* (4th ed) WB Saunders, Philadelphia 1996,pp.357–73.
29. Sayek İ, Karaciğer Transplantasyonu, Abbasoğlu O, Kaynaroğlu V, Kalayoğlu M, *Temel Cerrahi*, Güneş Kitabevi, 3. Baskı, 2004,sf.774–80.
30. Fink MP. Shock. In: Rippe JM (eds), *Intensive Care Medicine* Little, Brown and Company, Boston 1991,pp.1417–34.
31. Shoemaker WC. *Diagnosis and Treatment of the Shock Syndromes*. In: Ayres SM, Grenvik A, Holbrook P (eds), *Textbook of Critical Care* (4th ed.) WB Saunders Company, Philadelphia 2000,pp.85–102.

32. Grace PA. Ischemia–reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81:637–47.
33. Delva E, Camus Y, Nordlinger B, et al. Vascular occlusions for liver resections. *Ann Surg* 1989;209:211–18.
34. Eidelman Y, Glat PM, Pachter HL, Cabrera R, Rosenberg C. The effects of topical hypothermia and steroids on ATP levels in an in vivo liver ischemia model. *J Trauma* 1994;37:677–81.
35. Karwinski W, Ulvik R, Farstad M, Svardal A, Berge R, Soreide O. Effect of allopurinol on the concentration of endogenous glutathione in hepatocytes after an hour of normothermic liver ischemia. *Eur J Surg* 1993;159:355–59.
36. Foschi D, Castoldi L, Lesma A, Musazzi M, Benevento A, Trabucchi E. Effect of ischemia and reperfusion on liver regeneration in rats. *Eur J Surg* 1993;159:393–98.
37. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN. Role of oxygen free radicals in shock, ischemia and organ preservation. *Surgery* 1983;94:428–32.
38. Usami M, Furuchi K, Shiroiwa H, Saitoh Y. Effect of repeated portal triad cross clamping during partial hepatectomy on hepatic regeneration in normal and cirrhotic rats. *J Surg Res* 1994;57:541–43.
39. Fujii Y, Johnson ME, Gores GJ. Mitochondrial dysfunction during anoxia–reoxygenation injury of liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 1994;20:177–85.
40. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant for liver dysfunction in warm ischemia–reperfusion. *Am J Pathol* 1994;145:1421–23.
41. Bremer C, Bradford BU, Hunt KJ, et al. Role of Kupffer cell in the pathogenesis of hepatic reperfusion injury. *Am J Physiol* 1994;267:630–36.
42. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, et al. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 1996;23:506–14.

43. Serracino–Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia–reperfusion injury. *Am J Surg* 2001;181:160–66.
44. Huguet C, Gavelli A, Chieco A, et al. Liver ischemia for hepatic resection: Where is the limit. *Surgery* 1992;111:251–59.
45. Court FG, Wemyss–Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg* 2002;89:1089–95.
46. Okano T, Tsubouchi T, Yamashita Y, et al. Hepatic protein synthesis in the regenerating rat liver after hepato­pancreatectomy. *Surg Today* 1997;27:511–17.
47. Nakamura T, Tomita Y, Hirai R, Yamaoka K, Kaji K, Ichiara A. Inhibitory effect of transforming growth factor–B on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1975;133:1042–50.
48. Tanno M, Taguchi T. Proliferating cell nuclear antigen in normal and regenerating rat livers. *Exp Mol Pathol* 1999;67:192–200.
49. Hiroyasu S, Shiraishi M, Koji T, et al. Analysis of the Fas system and Bcl–2 in rat liver allograft rejection. *J Surg Res.* 1999;15:204–11.
50. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 2001;92:57–70.
51. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Cellular pathology I: cell injury and cell death. In: Kumar V, Fausto N, Abbas A (eds), *Robbins Pathologic Basis of Disease* (7th ed) WB Saunders Company, Philadelphia 2004,pp.1–41.
52. Tzung SP, Fausto N, Hockenbery DM. Expression of Bcl–XL family during liver regeneration and identification of Bcl–XL as a delayed early response gene. *Am J Pathol* 1997;150:1985–95.
53. Bergese SD, Klenotic SM, Wakely ME, Sedmak DD, Orosz CG. Apoptosis in murine cardiac grafts. *Transplantation.* 1997;63:320–25.
54. Kanzler S, Galle PR. Apoptosis and liver. *Cancer Biology* 2000;10:173–84

55. Lopez–Navidad A, Caballero F. Extended criteria for organ acceptance. Strategies for achieving organ safety and for increasing organ pool. *Clin Transplant*. 2003;17:308–24.
56. Reddy S, Zilvetti M, Brockmann J, McLaren A, Friend P. Liver transplantation from non–heart–beating donors: current status and future prospects. *Liver Transpl*. 2004;10:1223–32.
57. Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec–Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury—a fresh look. *Exp Mol Pathol*. 2003;74:86–93.
58. Bernal W, Wendon J. Liver transplantation in adults with acute liver failure. *J Hepatol*. 2004;40:192–97.
59. Russo MW, Brown RS. Adult living donor liver transplantation. *Am J Transplant*. 2004;4:458–65.
60. Scott LD Living donor liver transplant is the horse already out of the barn? *Am J Gastroenterol*. 2006;101:686–88.
61. Broelsch CE, Frilling A, Testa G, Malago M. Living donor liver transplantation in adults. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003;15:3–6.
62. Schemmer P, Mehrabi A, Friess H, et al. Living related liver transplantation: the ultimate technique to expand the donor pool? *Transplantation*. 2005;27:138–41.
63. Williams RS, Alisa AA, Karani JB, Muiesan P, Rela SM. Adult–to–adult living donor liver transplant: UK experience. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003;15:3–6.
64. Otero A, Gomez–Gutierrez M, Suarez F, et al. Liver transplantation from Maastricht category 2 non–heart–beating donors: a source to increase the donor pool? *Transplant Proc*. 2004;36:747–50.
65. Doig CJ, Rocker G. Retrieving organs from non–heart–beating organ donors: a review of medical and ethical issues *Can J Anaesth*. 2003;50:1069–76.

66. Ma Y, Wang GD, Wu LW, Hu RD. Dynamical changing patterns of histological structure and ultrastructure of liver graft undergoing warm ischemia injury from non-heart-beating donor in rats. *World J Gastroenterol.* 2006;12:4902–5.
67. Kootstra G, Daemen JH, Oomen AP. Categories of non-heart-beating donors. *Transplant Proc.* 1995;27:2893–4.
68. Sanchez-Fructuoso AI, Prats D, Torrente J, et al. Renal transplantation from non heart-beating donors: a promising alternative to enlarge the donor pool. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11:350–8.
69. Muiesan P, Girlanda R, Jassem W, et al. Single-center experience with liver transplantation from controlled non-heartbeating donors: a viable source of grafts. *Ann Surg.* 2005;242:732–8.
70. Valero R, Garca-Valdecasas, Juan C, et al. L-arginine reduces liver and biliary tract damage after liver transplantation from non heart beating donor pigs. *Transplantation.* 2000;70:730–37.
71. Bessems M, Doorschodt BM, Albers PS, Meijer AJ, van Gullik TM. Wash-out of the non-heart-beating donor liver: a comparison between ringer lactate, HTK, and polysol. *Transplant Proc.* 2005;37:395–8.
72. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392:565–68.
73. Luster AD. Chemokines and chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N.Eng J Med.* 1998;338:436–45.
74. Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* 2001;22:83–7.
75. Proudfoot AE, Power CA, Hoogwerf AJ. Extension of recombinant human Rantes by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J Biol Chem* 1996;271:2599–603.
76. Elsner J, Petering H, Hochstetter R, et al. The CC Chemokine antagonist Met-RANTES inhibits eosinophil effector functions through the chemokine receptors CCR 1 and CCR. *Eur J Immunol* 1997;27:2892–98.

77. Ajuebor MN, Hogoboam CM, Kunkel SL, Proudfoot AE, Wallace JL. The chemokine RANTES is a crucial mediator of the progression from acute to chronic colitis in the rat. *J Immunology* 2001;166:552–68.
78. Chvatchko Y, Proudfoot AE, Buser R, et al. Inhibition of airway inflammation by amino-terminally modified RANTES /CC chemokine ligand 5 analogues is not mediated through CCR3. *J Immunol* 2003;171:5498–506.
79. Küçük C, Sözüer E, Gürsoy Ş. Treatment with Metrantes reduces translocation in experimental colitis. *Am J Surg* 2006;191:77–83.
80. Elsner J, Petering H, Kimmig D, Wells TN, Proudfoot AE, Kapp A. The CC Chemokine receptor antagonist Met-Rantes inhibits eosinophil effector functions. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:462–65.
81. Botella C, Marin L, Moya-Quiles R, et al. Lack of association between the –403G/A promoter polymorphism in the human CCL5/RANTES chemokine gene in liver transplant outcome. *Transpl Int.* 2006;19:98–104.
82. Yun JJ, Whiting D, Fischbein MP, et al. Combined blockade of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 attenuates chronic rejection. *Circulation.* 2004;109:932–7.
83. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation* 1993;55:1265–72.
84. Selzner M, Clavien PA. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: Disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology* 2000;31:35–42.
85. Fukumori T, Kato T, Levi D, et al. Use of older controlled non-heart-beating donors for liver transplantation. *Transplantation.* 2003;75:1171–74.
86. Manzarbeitia CY, Ortiz JA, Jeon H, et al. Long-term outcome of controlled, non-heart-beating donor liver transplantation. *Transplantation.* 2004;78:211–15.

87. Monbaliu D, Crabbe T, Roskams T, Fevery J, Verwaest C, Pirenne J. Livers from non-heart-beating donors tolerate short periods of warm ischemia. *Transplantation*. 2005;79:1226–30.
88. Takada Y, Taniguchi H, Fukunaga K, et al. Hepatic allograft procurement from non-heart-beating donors: limits of warm ischemia in porcine liver transplantation. *Transplantation*. 1997;63:369–73
89. Garcia-Valdecasas JC, Tabet J, Valero R, et al. Liver conditioning after cardiac arrest: the use of normothermic recirculation in an experimental animal model. *Transpl Int*. 1998;11:424–32.
90. Valero R, Garcia-Valdecasas JC, Tabet J, et al. Hepatic blood flow and oxygen extraction ratio during normothermic recirculation and total body cooling as viability predictors in non-heart-beating donor pigs. *Transplantation* 1998;66:170–176
91. Tojimbara T, Wicomb WN, Garcia-Kennedy R, et al. Liver transplantation from non-heart beating donors in rats: influence of viscosity and temperature of initial flushing solutions on graft function. *Liver Transpl Surg*. 1997;3:39–45.
92. Pirenne J, Van Gelder F, Coosemans W, et al. Type of donor aortic preservation solution and cold ischemia time is a major determinant of biliary strictures after liver transplantation. *Liver Transpl*. 2001;7:540–5.
93. Schenk M, Zipfel A, Schulz C, Becker HD, Viebahn R. RANTES in the postoperative course after liver transplantation. *Transpl Int*. 2000;13 Suppl 1:147–9.
94. Racca A, Bailat A, Garcia MI, Soutullo A, Gaite L, Marel Boren I. Participation of RANTES and T-cell apoptosis in human renal allograft. *Scand J Immunol*. 2005;61:157–64.
95. Anselmo DM, Amersi FF, Shen XD, et al. FTY 720 pretreatment reduces warm hepatic ischemia reperfusion injury through inhibition of T-lymphocyte infiltration. *Am J Transplant*. 2002;2:843–9.

96. Bhatia M, Proudfoot A.E, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Treatment with Met-rantes reduces lung injury in caerulein-induced pancreatitis. *Br J Sur* 2003;90:698-704.
97. Stojanovic T, Bedke J, Grone HJ. Met-RANTES inhibition of mucosal perfusion failure in acute intestinal transplant rejection-role of endothelial cell-lekocyte interaction. *J Vasc Res* 2002;39:51-8.
98. Schröppel B, Fischereder M, Lin M, et al. Analysis of gene polymorphisms in the regulatory region of MCP-1, RANTES, and CCR5 in liver transplant recipients. *J Clin Immunol.* 2002;22:381-5.
99. Ajuebor MN, Hogaboam CM, Le T, Proudfoot AE, Swain MG. CCL3/MIP-1alpha is pro-inflammatory in murine T cell-mediated hepatitis by recruiting CCR1-expressing CD4(+) T cells to the liver. *Eur J Immunol.* 2004;34:2907-18.
100. Yamano T, Hirai R, Hato S, Uemura T, Shimizu N. Delayed liver regeneration with negative regulation of hepatocyte growth factor and positive regulation of transforming growth factor-beta 1 RNA after portal branch ligation in biliary obstructed rats. *Surgery* 2002;131:163-71.
101. Yamamoto H, Ohdan H, Shintaku S, et al. Expression of Bcl-2/Bax mRNA in grafted liver during acute rejection after rat liver transplantation. *Transplant Proc* 1998;30:2950-51.
102. Gapany C, Zhao M, Zimmermann A. The apoptosis protector, bcl-2 protein, is downregulated in bile duct epithelial cells of human liver allografts. *Hepatology* 1997;26:535-42.
103. Abt PL, Desai NM, Crawford MD, et al. Survival following liver transplantation from non-heart-beating donors. *Ann Surg.* 2004;239:87-92.
104. D'alessandro AM, Hoffmann RM, Knechtle SJ, et al. Liver transplantation from controlled non-heart-beating donors. *Surgery* 2000;128:579-88.

T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Arş. Gör. Dr. Bilsay Akalın'a ait, "Deneyel Kontrollü Non-Heart Beating Donör Modelinde Met-Rantesin Karaciğer Hasarını Önleyici Etkisi" adlı çalışma, jürimiz tarafından Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih : 15/03/ 2007

Başkan : Prof. Dr. YÜCEL ARITAŞ

İmza



Üye : Prof. Dr. TAHİR PATIROĞLU



Üye : Prof. Dr. ZEKİ YILMAZ



Üye : Prof. Dr. ERDOĞAN SÖZÜER



Üye : Doç. Dr. ENGİN OK

