

70063

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA DENEYSEL KARACİĞER NAKLİ MODELİNDE,
PENTOKSİFİLİN'İN NORMOTERMİK VE SOĞUK İSKEMİYE
KARŞI KORUYUCU ETKİSİ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF. DR. İBRAHİM ASTARCIOĞLU

UZMANLIK TEZİ

DR. HÜSEYİN ASTARCIOĞLU

70063

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İZMİR
1998

ÖNSÖZ

Oldukça özveri ve sabır gerektiren ancak, o derecede haz veren Cerrahi Mesleği'ni bana sevdiren, beraber çalışma imkanını bulabildiğim sürece büyük destek ve emeğini gördüğüm değerli hocam Prof Dr Kemal Astarcioglu'na, cerrahi eğitimim boyunca her zaman özverili destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof Dr İbrahim Astarcioglu'na, Prof Dr Ömer Harmancıoğlu'na, Prof Dr Mehmet Füzün'e, Prof Dr Hüseyin Gülay'a, Prof Dr İhsan Erdamar'a, Prof Dr Özcan Gökçe'ye, Prof Dr Öztekin Oto'ya, Doç Dr Serdar Saydam'a, Doç Dr Seymen Bora'ya, Doç Dr Ahmet Çoker'e, Yard Doç Dr Sedat Karademir'e, Yard Doç Dr Selman Sökmen'e, Yard Doç Dr Mehmet Ali Koçdor'a, Yard Doç Dr Gürkan Avcı'ya, zorlu cerrahi eğitimi süresince birlikte çalıştığım değerli asistan arkadaşlarıma, Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda büyük destek ve yakınlık gördüğüm Prof Dr Ataman Görel'i'ye, biyokimyasal ve patolojik değerlendirmelerin yapılmasında değerli yardımları olan Prof Dr Banu Önvural'a, Prof Dr Ali Küpelioglu'na, Yard Doç Dr Erdener Özer'e, Dr Serra Menekay'a, Dr Defne Özbek'e ve isimlerini buraya alamadığım, bu çalışmanın gerçekleşmesinde değerli katkıları olan tüm Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi personeline içten teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Hüseyin Astarcioglu

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Araştırma Görevlisi

Mayıs - 1998.

İÇİNDEKİLER

1- Giriş.....	1
2- Genel Bilgiler.....	5
3- İskemi-reperfüzyon biyokimyası.....	6
4- Hepatik iskemi-reperfüzyon hasarı.....	9
5- Lökosit-sinüzoidal hücre adheransı.....	10
6- Kalsiyum.....	11
1- Eikozanoidler.....	12
2- Lipid peroksidasyonu.....	14
3- Sitokinler.....	14
4- Endotoksin.....	15
5- Pentoksifilin.....	16
7- Gereç ve Yöntem.....	17
1- Cerrahi işlemler.....	17
2- Deney grupları.....	25
3- Donör ve alıcı sıçanların pentoksifilin ile tedavisi.....	25
4- Histopatolojik parametreler.....	26
5- Karaciğer enzimleri.....	26
6- Sağ kalım analizleri.....	26
7- İstatistik analizleri.....	26
8- Bulgular.....	27
1- Sağ kalım analizleri.....	27
2- Karaciğer enzimleri.....	27
3- Histopatolojik değişiklikler.....	32
9- Tartışma.....	38
10- Sonuç.....	44
11- Özet.....	45
12- Kaynaklar.....	46

1. GİRİŞ

Son yıllarda karaciğer transplantasyonu (KT), son dönem karaciğer yetmezlikli hastaların tedavisinde geçerli bir tedavi yöntemi olarak kabul edilmiştir. Batı ülkelerinde yapılan araştırmalarda, bir ülkenin senelik KT gereksinimi: $15 / 1.000.000$ nüfus / yıl + %10 retransplantasyon olarak hesaplanmıştır (1). Bu veriler doğrultusunda, 60 milyon nüfuslu ülkemiz için senelik gereksinim ($15 \times 60 + 15 \times 60/10 = 990$) yaklaşık 1000 KT'dir.

Günümüzde KT'nun giderek iyileşen sonuçları, organ talebini arttırmakta ve bulunabilen greftler bu talebi karşılamakta daha da yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle en gelişmiş merkezlerde bile transplantasyon adaylarının %10-30'u bekleme listesindeyken yaşamını yitirmektedir (2). Yapılan araştırmalara göre, 1988 yılında ortalama 34 gün olan bekleme süresi, 1993 yılında 142 güne yükselmiş olup, günümüzde bu sürenin yaklaşık 180 gün civarında olduğu sanılmaktadır (3). Ülkemizde, Organ Nakli Kuruluşları Koordinasyon Derneği'nin (ONKKD) belgelediği, son yıla ait KT'ile ilgili etkinlikler (1997'de derneğe üye kurumlarda toplam 23 nakil) göz önünde bulundurulduğunda, karaciğer nakli bekleme süresinin, ülkemizde, bu değerlerin çok üzerinde olduğu açıktır. Bulunabilen greft sayısının gereksinimin çok altında olması, daha önceden reddedilen marjinal greftlerin, (yaşlı donör, steatotik, harvest öncesi veya sırasında kardiyak arrest nedeniyle sıcak iskemiyeye maruz kalmış, boyut uyumsuzluğu olan) mortalite ve morbidite riskini bazı medikal, teknik ve farmakolojik yöntemlerle azaltarak, kullanımını zorlamaktadır.

Wisconsin solüsyonunun (UW solüsyonu) kullanıma girmesinden sonra, karaciğer greftlerinin daha uzun süreler, güvenli bir biçimde saklanması mümkün olabilmektedir (4-6). Buna rağmen harvest öncesi, harvest, perfüzyon ve prezervasyon aşamaları sırasında oluşan greft hasarı KT'nunda halen çok önemli bir klinik fenomen olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunun sonucu olarak, KT'u sonrasında %30'lara varan oranda primer greft nonfonksiyonu (PNF) veya disfonksiyonu gelişebilmektedir (7-11). Karaciğer greftleri harvest öncesinde veya sırasında, hipoksi, hipotansiyon ve kardiyak arrest gibi nedenlere sekonder olarak sıcak iskemiyeye, harvest sonrasında ise UW prezervasyon solüsyonu içerisinde soğuk iskemiyeye ve implantasyon sırasında tekrar sıcak iskemiyeye maruz kalmakta ve reperfüzyon ile birlikte 'oksijen paradoksu' olarak

bilinen ve sitotoksik oksijen türlerinin oluşturduğu iskemi-reperfüzyon hasarına (İRH) uğramaktadır (7,10,11,12,13,14).

Son yirmibeş yıl içerisinde İRH'ını açıklamak üzere, adenosin trifosfat (ATP) kaybıyla hepatosit enerji düzeylerinin hızla azalması, otolitik sistemlerin aktivasyonu, hücrel membran hasarlanması ve hücrel asidoz, azalmış protein sentezi, mitokondrial fonksiyon kaybı gibi greft viabilitesini azaltan fenomenler üzerinde durulmuştur (15). İ/R sonrası hücre hasarının patogenezinde: 1-olası hücre ödemine bağlı mikrovasküler tekrar akımın gerçekleşmemesi fenomeni (no reflow phenomenon), 2-kalsiyumun hücre içine dengelenmemiş geçişi, 3-serbest oksijen radikallerinin (SOR) [süperoksit ($O_2^{\cdot -}$), hidrojen peroksit ($H_2 O_2$), hidroksil (OH^{\cdot})] reperfüzyon sırasında salınımı, 4-reperfüze olan dokuda biriken nötrofillerden açığa çıkan sitokinler ($TNF\alpha$, IL1, IL6 vs) sorumlu tutulmaktadır (7,10,12,13,15,16,17,18,19,20,21). Bu hasarın engellenmesi veya azaltılması, KT sonrası PNF'nun veya greft disfonksiyonunun önlenmesi açısından çok önemlidir.

Günümüzde, özellikle kültürel ya da alt yapı sorunları nedeniyle donör sıkıntısı çeken ülkelerde, donör havuzunun genişletilmesi amacıyla, kalp atımı olmayan (non heart-beating) donörlerden sağlanacak karaciğer greftleri, transplantasyon için ek bir potansiyel kaynak olarak düşünülmeye başlanmıştır (22-23). Ancak, sıcak iskemiye maruz kalmış bu greftlerin viabilitesini ve sağ kalımını iyileştirme koşullarını araştıran deneysel çalışmalar oldukça sınırlı olup, henüz klinik uygulamayı cesaretlendirecek düzeyde değildir. Klinik uygulamalar ise, çok az sayıda KT içeren ve sıcak iskemi süreleri çok kısa olan greftlerin oluşturduğu serilerdir (24-29). İsveçte, beyin ölümünün yasal olarak kabul edilmediği dönemde, organ bağıışı onaylanmış ve klinik beyin ölümü tanısı konmuş vericilerden, kardiyak arrestten hemen sonra (<30 dakika) perfüze edilerek ve diğer bazı merkezlerde, yasal beyin ölümü tanısı konmuş, harvest öncesinde ve sırasında gelişen kardiyak arresti (<30 dakika) takiben resüsitasyona gidilmeyip, doğrudan perfüzyona geçilmiş donörlerden elde edilen greftlerin sağ kalımı ile ilgili yayınlar, ender klinik uygulamalara örnektir (24-29). Bu nedenle, kalp atımı olmayan donörlerden elde edilecek karaciğer greftlerinin viabilitesini iyileştirerek, klinikte kullanımına olanak verecek, yeni yöntemlerin araştırılması gün geçtikçe önem kazanmaktadır.

SOR'nin sentez ve metabolizmasını değiştirip, kalsiyum dishomeostazını düzelterek, İRH'ından sorumlu olduğu düşünülen patofizyolojik mekanizmaları bloke

edeceği savunulan, çok sayıda hepatosit koruyucu ajan (SOR temizleyicisi ve/veya Kupffer hücre stabilizatörü: süperoksit dismutaz, allopürinol, alfa-tokoferol, mannitol, dopamin, prostoglandin, aktive karbon hemoperfüzyonu, glucagon, klorpromazin, aprotinin, metil prednizolon, deferoksamin, siklosporin, katalaz, aspartik asit, ubiquinon, dibenzyline, trombosit aktive edici faktör antagonistleri, ATP, verapamil, nifedipin, tirilazad mesylate) tanımlanmış ve bunların İRH üzerine iyileştirici etkileri, deneysel izole-perfüze karaciğer, sıcak veya soğuk iskemili KT ve normotermik hipoperfüzyon-reperfüzyon modellerinde araştırılmıştır (30-54).

Son 10-15 yılda giderek artan KT sonrası gelişen İRH ile ilgili çalışmalar incelendiğinde: 1- reperfüzyonun, hücre ATP'yi rejenere etmesi ve iskemi sonucu oluşan toksik metabolitlerin temizlenmesi, dolayısıyla hücrenin yaşamsallığını devam ettirebilmesi için mutlaka gerekli olmasına rağmen, paradoks olarak oldukça yaygın doku hasarına neden olduğu (7,10,15,21), 2- bu hasarda; a- reperfüze olan doku mikrosirkülasyonunda, önceden var olan ve reperfüzyon ile birlikte dokuda hızla biriken nötrofiller ile onlardan ve endotel hücrelerinden salınan sitokinler ve SOR'nin b- (Karaciğer için) Kupffer hücre aktivasyonu sonucu, bu hücrelerden salgılanan sitokinlerin en önemli rolü oynadığı, ortaya çıkmaktadır (21,55,56,57,58,59,60).

Pentoksifilin (Ptx), genellikle periferik vasküler hastalıkların sağaltımında kullanılan bir metilksantin derivativesidir (61). Bu farmakolojik ajanın, eritrosit deformabilitesini arttırıp, kan viskozitesini azaltarak ve mikrovasküler yatakta vazodilatasyona yol açarak, değişik organlarda İ/R sonrası iskemik alanlara kanın selektif olarak redistribüsyonunu düzenlediği, ayrıca, Kupffer hücre stabilizatörü olarak bu hücrelerden İ/R sonrası 'tumor necrosis factor' (TNF), interlökin 1 ve 6 (İL 1 ve 6) salınımını azalttığı bildirilmektedir (62-68). Sıçanlarda, sadece soğuk iskeminin söz konusu olduğu deneysel karaciğer nakli modelinde, alıcı sıçanların transplantasyon sonrası Ptx ile tedavi edilmesinin İRH azaltarak alıcı sağ kalımını arttırdığı gösterilmiştir (69-70). Ayrıca, Ptx'in deneysel olarak sıçanlarda normotermik hepatik iskemi sonrası reperfüzyon hasarını azalttığı bildirilmektedir (60,71).

Klinik KT'unda, soğuk prezervasyon öncesi (harvest öncesi ve/veya harvest aşamasında) ve implantasyon sırasında karaciğer greftleri sıcak iskemik hasara uğramakta ve prezervasyonun soğuk iskemisi buna eklendiğinde, transplant sonrası greft disfonksiyonu veya kaybı gelişebilmektedir. 'Non heart-beating' tipi marjinal donörlerde ise, perfüzyon öncesi sıcak iskemi süresi 30 dak.'nın üzerinde olabileceğinden, greft disfonksiyon veya PNF olasılığı daha yüksektir. Biz bu

çalışmamızda, sıçanlarda deneysel KT modelinde, donörlerde kombine sıcak ve soğuk iskemi modeli oluşturduk; bu model çerçevesinde, 1/2 saat ve 1 saatlik sıcak iskemiye (kardiak arrest) maruz kalan donörlerden alınan karaciğer greftlerini, 1 saat ile 9 saatlik prezervasyon (soğuk iskemi) süreleri sonrasında, eşsoylu alıcılara (organ reddi fenomenini ortadan kaldırmak amacıyla) naklettik. Ptx'in hem sıcak, hem de soğuk İRH'nı iyileştirici özelliği olduğunu düşünerek, donör ve alıcıyı Ptx ile tedavi edip, bu ajanın, post-transplant dönemde hepatosit ve sinuzoidal hücre (endotel + Kupffer hücreleri) canlılığını korumadaki rolünü, dolayısıyla greft ve alıcı sağ kalımına etkisini, histolojik ve biyokimyasal kriterlerin temelinde göstermeyi amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

İskemi, hücre enerji düzeyinin düşmesine ve toksik metabolitlerin dokuda birikimine yol açarak, hücre disfonksiyonu ve sonrasında hücre ölümüne kadar gidebilen bir dizi biyokimyasal reaksiyonu başlatır. Yapılan çalışmalar, doku hasarının esas olarak, iskemi sonrası reperfüzyona sekonder geliştiği ve İRH'ında nötrofillerin önemli rolü oynadığını göstermiştir (21,58,59,60,72). İRH'nda, doku ödemi ve plazma proteinlerine mikrovasküler permeabilite artışı, mikrovasküler yatakta iskemi sonrası endotel hücrelerinden ya da otokton makrofajlardan salgılanan interlökinlerin ve sitokinlerin neden olduğu nötrofil akümülyasyonu ve adhezyon moleküllerinin bu hücrelerde ekspresyonunun artması ile nötrofil ve trombosit agregasyonu sonucu, parenkim ya da dokuda revaskülarizasyonun engellenmesi söz konusudur (15,21). Bu mekanizmaya klinikte ekstremitte iskemisi, solid organ transplantasyonu, myokard enfarktüsü, inme, hipovolemik şok gibi doku hipoperfüzyonu ve/veya tam iskemisi durumları örnek gösterilebilir (15,21,73,74,75). İRH'nda nötrofillerin rolünü açıklamaya yönelik yapılan çalışmalarda, koroner arterin geçici olarak klemplenmesiyle oluşturulan deneysel myokard enfarktüsü modelinde, reperfüzyon sonucunda, nihai enfarkt alanının büyüklüğü, önceden kan nötrofil sayıları azaltılmış hayvanlarda, kan nötrofil düzeyleri normal olanlara göre belirgin olarak azalmıştır (73,76).

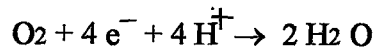
İRH, KT sonrasında karşılaşılan PNF veya greft disfonksiyonu gibi greft ve hasta sağ kalımını önemli oranda etkileyen sorunların etyopatogenezinde başlıca rolü oynamaktadır (7,10,12). Karaciğer greftleri harvest öncesinde, sırasında ve implantasyon esnasında sıcak iskemiyeye, prezervasyon sırasında ise soğuk iskemiyeye maruz kalmaktadırlar. Temelde, sıcak ve soğuk iskemiyeye sekonder gelişen doku hasarı aynı biyokimyasal mekanizmalarla oluşmaktadır. Ancak, hipotermi sonrasında enerji metabolizması ve enzim sistemlerinin aktivitesi oldukça yavaşlamakta, dolayısıyla sıcak iskemik hasar çok daha çabuk ve şiddetli olarak gelişmektedir. Şöyle ki, organizma ısısındaki her 10°C'lık ısı düşüşü için, çoğu enzim sisteminin aktivasyonu 1.5-2 kat azalmaktadır. Ayrıca, van't Hoff kanunlarına göre, ısı 37°C'dan 4°C'a düşürüldüğünde, metabolik hız ortalama 12-13 kez azalmaktadır (4). Yapılan çalışmalarda, izole perfüze hepatosit modelinde, UW solüsyonunda 4°C'da, 24 ve 48 saat prezervasyon sonrasında, hücre ATP miktarlarının sırasıyla %50 ve %70 oranında düştüğü gösterilmiştir. Buna

karşılık, sadece 120 dakikalık sıcak iskemi sonrasında hepatosit ATP miktarları %87 oranında azalmaktadır (77,78).

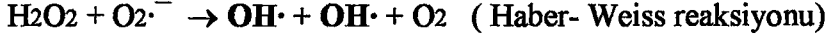
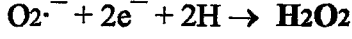
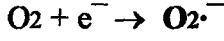
Hipotermik karaciğer hasarı, anahatlarıyla nötrofillerin ve trombositlerin dokuda akümülyasyonları ile sonuçlanan sinüsoidal endotel hasarı ve intravasküler koagülyasyonu olarak tanımlanabilir (7,10). Araştırmalar, Kupffer ve endotel hücrelerinin aktivasyonu sonucu salınan birtakım mediatörlerin bu olaya neden olduğunu göstermiştir (7,10,22,79,80). Soğuk iskemik prezervasyon sırasında, UW solüsyonu, İRH ve hücre enerji sakımına karşı koruyucu etkisiyle karaciğer greftlerinin uzun süreler (24-30 saate kadar) güvenli bir biçimde prezervasyonunu mümkün kılar. Solüsyonun, azalan hücre ATP miktarını karşılamak için yüksek-enerjili fosfat bileşikleri içermesi, intrasellüler asidozu ve reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu azaltma özelliğinin olması, hipotermiye sekonder gelişen hücre şişmesini engelleyebilmesi, karaciğer greftlerinin uzun süre prezervasyonuna olanak veren faktörlerdir (4,81).

2.1 İskemi-Reperfüzyonun Biyokimyası (15,21,57,82,83,84,)

Normal memeli hücreleri, oksidatif fosforilasyon yolu ile enerji üretebilmek için moleküler oksijene gereksinim duyar. Oksijenin yokluğunda (iskemi veya hipoksemi) hücre enerji depoları tükenmeye başlar, toksik metabolitler ortaya çıkar ve sonrasında hızla hücre ölümü meydana gelir. Normal koşullar altında, moleküler oksijenin büyük bir kısmı hücre içi sitokrom oksidaz sistemi ile dört-değerli indirgenmeye uğrayarak suya dönüşür.



Ancak İR durumunda sadece bir elektron (e^-) transferi ile tek-değerli indirgenme olur ve oldukça reaktif serbest radikaller meydana gelir. Serbest radikal, herhangi bir atom veya molekülün dış yörüngesinde çift oluşturmamış bir elektron (e^-) içermesi durumu olarak tanımlanır. İskemi sırasında oluşan bir takım biyokimyasal olaylar sonucunda, reperfüzyon ile birlikte, İRH gelişiminde önemli rol oynayan süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hipoklorus asidi (HOCl) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi SOR oluşur. Moleküler oksijen her aşamada indirgenmeye uğrayarak yukarıda tanımladığımız reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumuna yol açar. $O_2^{\cdot-}$, tek başına hücre yıkımına yol açan reaksiyonları başlatabildiği gibi, esas olarak daha reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna yol açarak hücre toksisitesinde rol oynamaktadır.

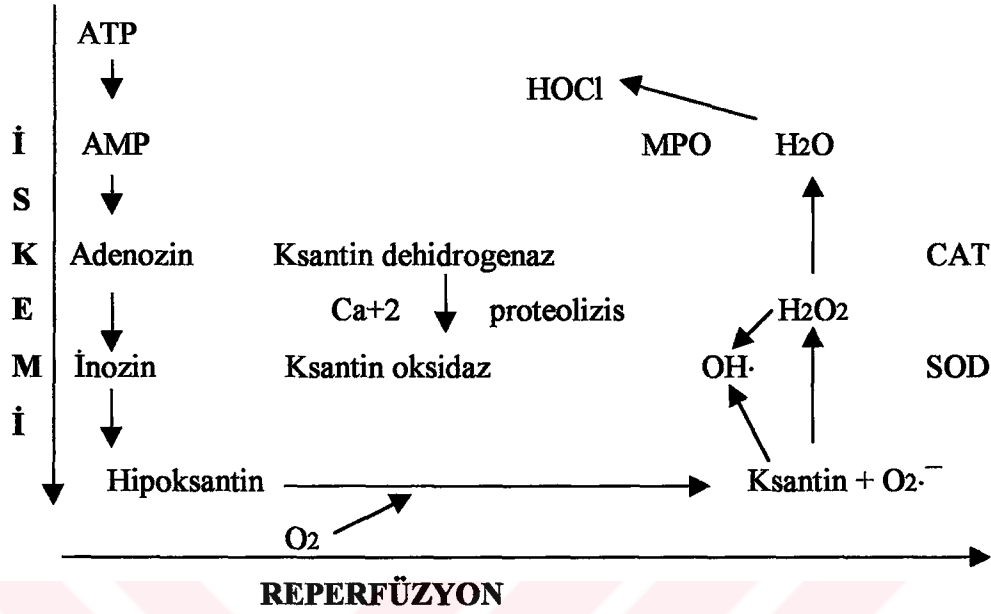


Bu oksijen radikallerinin oluşumu, dokularda bulunan bütün biyomoleküllerin (nükleik asitler, membran lipidleri, enzimler, reseptörler vs) hasara uğraması demektir. Kendine yönelik yıkıma ve letal potansiyele karşı, organizmanın, doğal korunma mekanizmasını harekete geçirmesi olağandır. Bu korunma, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi endojen temizleyiciler ile gerçekleşir. Bu endojen temizleyiciler, SOR ile reaksiyona girerek onları toksik olmayan bileşikler haline çevirirler.



İRH'nda adenozin trifosfat (ATP), sırasıyla adenozin monofosfat (AMP), adenozin, inozin, ve nihayet hipoksantine dönüşür. (şekil 1). Oksidatif ortamda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz (XD) enzimi tarafından, okside nikotinamid-adenin dinükleotid (NAD⁺) katalizörlüğünde (NAD⁺ → NADH), ksantine çevrilir ve bu reaksiyon sonucunda SOR açığa çıkmaz. Ancak, iskemi durumunda XD, ksantin oksidaza (XO) dönüşür. Bu enzimatik 'D'-nin 'O' ya dönüşümü, SOR sonucu oluşan IRH'nın başlıca sorumlusudur. İskemi sürecinde bir diğer önemli nokta, hücre düzeyinde aşırı miktarda hipoksantin birikimidir. Şöyle ki; XD iskemik süreç sonunda XO'ya dönüşmüştür ve oluşan XO, substrat olarak NAD⁺ yerine, oksijeni kullanmaktadır; dolayısıyla iskemik ortamda kullanılabilir oksijen olmadığı için, hipoksantin ksantine dönüşümünü katalize edememektedir. Reperfüzyona kadar hipoksantin ve ksantin oksidazın artmış düzeylerinin zararı yoktur. Doku tekrar oksijen ile buluştuğunda (reperfüzyon), XO, hipoksantini çok miktarda süperoksit anyonunun (O₂^{·-}) ortaya çıktığı bir reaksiyonla ksantine çevirir. Bu süperoksit üretim patlaması, bir zincirleme reaksiyon dizisi başlatarak, H₂O₂'nin ve diğer oksijen serbest radikallerinin, endotel hücrelerinden salınımına yol açar. H₂O₂'nin bir kısmı katalaz varlığında su ve oksijene çevrilerek ortamdaki temizlenebildiği gibi, önemli bir bölümü (iskemi sürecinin uzunluğuna paralel olarak) metal şelatların katalizörlüğünde O₂^{·-} ile etkileşerek, yüksek

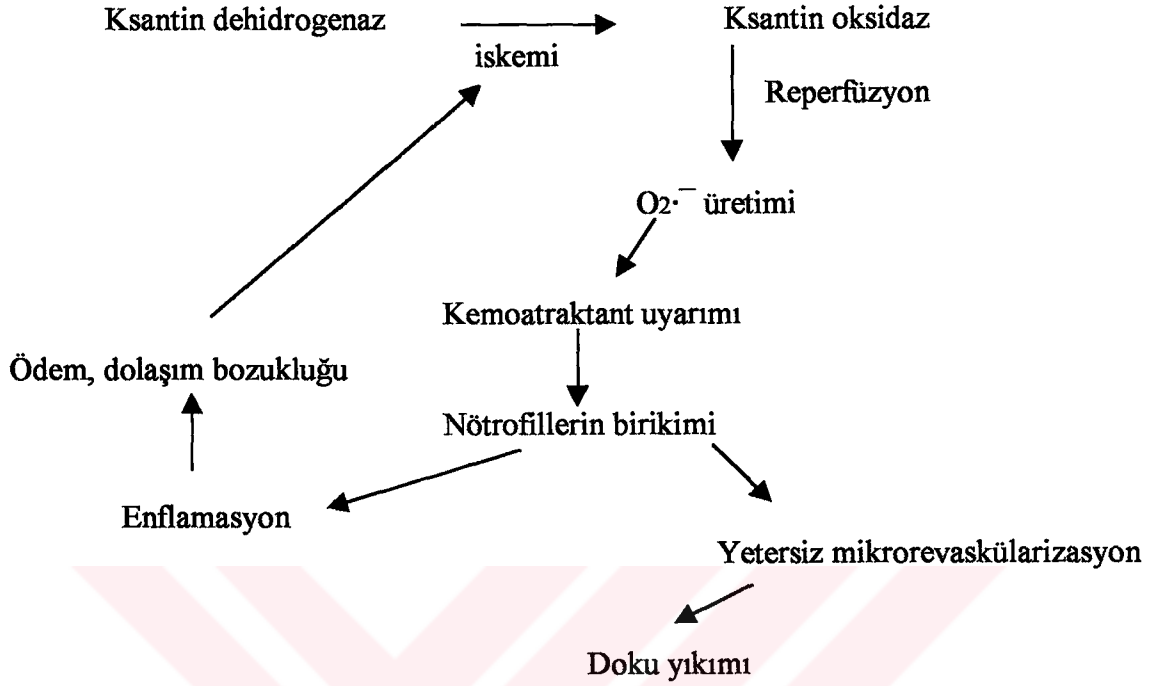
reaktivite gösteren (nötrofil çekici özelliği olan) hidroksil radikallerinin ($\text{OH}\cdot$) oluşumuna yol açar (Haber-Weiss reaksiyonu).



Şekil 1: *iskemi sonucu oluşan hipoksantin, oksijenin tekrar dolaşımına katılımıyla ksantin oksidaz ile etkileşir ve endotel hücrelerinde $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve diğer reaktif oksijen metabolitleri ortaya çıkar. $\text{OH}\cdot$ ise, Fe^{+2} veya Cu^{+2} katalizörlüğünde Haber-Weiss reaksiyonu ile veya sadece Fe^{+2} katalizörlüğünde, H_2O_2 ile etkileşerek (Fenton reaksiyonu) ortaya çıkar. Nötrofil aktivasyonu sonrasında, myeloperoksidaz (MPO) nötrofillerde HOCl oluşumuna yol açar*

Bununla beraber, SOR tek başına doku hasarının yaygınlığından sorumlu değildir. Önceden nötrofillerin sayı veya endotele yapışma yeteneklerinin azaltıldığı deneysel modellerde, İRH'nın büyük ölçüde önlenbildiğinin gösterilmesi, bu hipotezi desteklemektedir. Bu hipotezi savunan başka bir olay da, reperfüzyon öncesi oksijen radikal inhibitörleri veya endojen temizleyicilerle yapılan tedavi sonucunda, reperfüze dokudaki nötrofil sayısının oldukça azalmasıdır. Sonuç olarak, SOR'nin (kendileri hücre yıkımına yol açabildikleri gibi) ana patolojik etkisi, reperfüze dokuyu hedef alan nötrofil göçü için kemotaktik aktivitenin tetiğini çekmek ve bunun sonucu mikrovasküler yatağın revaskülarizasyonunu engellemektir. (Şekil 2).

Nötrofil kemotaksisi sonrası oluşan enflamasyon ve ödem, dolaşım bozukluğu ve iskemiyi daha da arttırarak, kısır döngü oluşturacak ve daha çok sitotoksik oksijen türleri ve dolayısıyla doku hasarı oluşacaktır.



Şekil 2: İ/R ve enflamasyon arasındaki kısır döngü

2.2 Hepatik İskemi-Reperfüzyon Hasarı

İ/R ile birlikte karaciğer sinüzoid endotel hücrelerinde viabilite azalması veya kaybı ile Kupffer hücrelerinde aktivasyon meydana gelir (7,10,12). Endotel hücrelerinin viabilitesini yitirmesi, önemli oranda mikrosirkülasyon düzensizliğine, lökosit ve trombosit adhezyonunun artmasına, kan akımında azalmaya ve dolayısıyla iskemik sürecin devam etmesine neden olur (7,10,12,80).

Yapılan araştırmalarda, transplantasyon sonrası IRH'na bağlı gelişen greft kaybında, aktive olan Kupffer hücrelerinden salınan serbest oksijen radikallerinin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Kupffer hücrelerinin bu radikallerin kaynağı olduğu bugün histokimyasal olarak kanıtlanmıştır (7,10,12,67,80). Kupffer hücreleri, aktive olduktan sonra, serbest radikallerin yanı sıra, 'tumor necrosis factor' (TNF), IL 1, IL 6, eikozanoidler ve nitrik oksit (NO) gibi proinflatuar mediatörler salgılayabilmektedir. Bu maddeler, iskemik sürecin uzunluğuna bağlı olarak, transplante olmuş greftte doku hasarını giderek arttırarak, 'Sistemik Enflamatuar Yanıt Sendromu'nun (SIRS)' gelişimine ve sonuçta greft kaybına neden olurlar (7,10,12,67,68,79,80).

Hepatik İRH'nın bir diğer nedeni, uzamış anoksi sonucu gelişen metabolik distrestir. Şöyle ki, sıcak ve soğuk iskemik süreç sonunda ATP hidrolizi ve anaerobik glikoliz sonucunda doku pH'ı düşer ve metabolik asidoz ortaya çıkar (7,10,80). Anoksik süreçte asidotik pH'ın, hücre viabilitesini koruyucu etkisi vardır. Ancak, reperfüzyon ile birlikte doku pH'ının normale dönmesi, latent pH-bağımlı proteazları ve fosfolipazları aktive ederek hücre ölümüne neden olur. Doku pH'ının fizyolojik seviyelere dönmesiyle, doku hasarının artmasına 'pH paradoksu' adı verilmektedir (7,10,80,85). pH'ın bu şekilde yükselmesi aynı zamanda mitokondrial membran hasarına da yol açarak, oksidatif fosforilasyonu bozmaktadır. Yapılan araştırmalarda, reperfüzyon solüsyonunun hafif asidotik pH'ta olmasının, greft viabilitesini önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (7).

2.3 Lökosit-Sinüsoidal Endotel Hücre Adheransı

Deneysel çalışmalarda, nötrofil sayısının azaltılması veya çeşitli farmakolojik ajanlarla nötrofil kemotaksisinin önlenmesinin, kalp, akciğer, ince barsak, karaciğer gibi organlarda İRH'nı önemli oranda azalttığı gösterilmiştir (10,21,58,73,74,75,76). Post-iskemik karaciğerin, lökosit akümülyasyonuna oldukça duyarlı olduğu ve bunun İRH'nın oluşumu açısından önemi günümüzde bilinmektedir (7,10,12).

İ/R sonrasında, XO-kaynaklı oksidanlar oluşmakta ve bunlar mikrovasküler endotelyuma lökositlerin kemotaksisini ve adhezyonunu sağlayan çeşitli mediatörlerin salınımına neden olmaktadır. XO inhibitörü olan allopurinol, SOD ve CAT gibi endojen temizleyicilerin, reperfüzyon sonrasında iskemik karaciğerde lökositlerin birikimini ve endotele adhezyonunu azalttığı yapılan deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (19,21,86). Oluşan serbest oksijen radikalleri, aynı zamanda çeşitli adhezyon moleküllerinin (granül membrane protein GMP140 vs.) ekspresyonunu da arttırarak lökosit adhezyonunu stimüle etmektedir (10,21).

Reperfüzyon sırasında nötrofillerin ortamda bulunmasından ziyade, endotele adhezyonları, mikrovasküler hasarın oluşmasında en önemli nedeni oluşturmaktadır (10,21,87). Reperfüzyon sonrası doku hasarında adhezyon olayının rolünü araştırmaya yönelik yapılan çalışmalarda, denek hayvanlarının, CD 18 kompleksi adı verilen nötrofil adheziv glikoproteinine karşı oluşturulan monoklonal antikorlar ile tedavisinin, intestinal iskemi sonrasında gelişen mukozal hasarı önlediği gösterilmiştir (88). Bu antikor, nötrofillerin endotele yapışmasını büyük ölçüde engelleyerek, reperfüze olan intestinal mukozada nötrofillerin etkisini azaltmıştır (89-91). Benzer çalışmalar, kalp,

iskelet kası ve akciğerlerde de yapılmış ve aynı sonuçlar alınmıştır. Buna ek olarak, CD 18 endotelial ligand'ından başka, 'hücreler arası adhezyon molekülü-1'in de [(intercellular adhesion molecule-1), (ICAM-1, CD 54)] reperfüzyon hasarında rol oynadığı ve bu proteine karşı gelişmiş antikor ile tedavinin, enfarkt alanını sınırladığı ve CD 18'e benzer etki gösterdiği anlaşılmıştır (92-97). Bu adhezyon moleküllerinin yanısıra, VCAM 1 (vascular cell adhezyon molecule 1), ELAM 1 (endothelial leucocyte adhesion molecule 1) ve GMP 140 (granule membrane protein 140) endotel lökosit adhezyonunda kritik rol oynayan diğer ligandlardır. Ayrıca, İ/R ile birlikte hücre içi kalsiyum düzeyinin yükselmesiyle, TNF α , IL 1 ve γ interferon (γ IFN) bu ligandları aktive eder ve lökosit endotel adhezyonu daha da artar (88-97).

Nötrofil-endotel adhezyonunun, potent hasarlayıcı ajanların yüksek konsantrasyonda birarada bulunduğu bir mikroçevre oluşturduğu düşünülmektedir (21). Nötrofil, CD-18 ve ICAM-1 proteinlerinin endotele adhezyonu, ekstraselüler mikroçevreye H₂O₂ ve proteazların salınımı için güçlü bir sinyal oluşturmaktadır.

Nötrofiller, endotel üzerinde iki alana yapışarak hasara yol açmaktadırlar: 1- prekapiller sfinkter , 2- postkapiller venül. Aktive olan nötrofiller daha visköz bir yapı kazandıkları için bazen prekapiller sfinkterden geçememektedirler (21). Sonuçta, kapillerler öncesinde ve içerisinde bir nötrofil tıkaçı oluşmakta ve anoksik hasarı daha arttıran, reperfüzyon sonrası 'tekrar akımın gerçekleşmemesi' fenomeni (no reflow phenomenon) meydana gelmektedir (21,76). Ancak nötrofiller genellikle endotel içerisinde post kapiller venüllere yapışmaktadırlar (21,76). Nötrofillerin, reperfüzyon sonrası hasara yol açmaları, esas olarak elastaz gibi proteolitik enzimlerin salınımını artırmalarının yanısıra, HOCl ve H₂O₂ gibi toksik oksijen metabolitlerinin, sitokinlerin ve trombosit aktive edici faktörün (platelet activating factor PAF) oluşumunu indüklemeleriyle gerçekleşir. Sonuçta elastin gibi esansiyel yapısal matriks proteinleri lizise uğramakta ve mikrovasküler geçirgenlik bozulmaktadır (21,39).

2.4 Kalsiyum (10,31,32,38,98,99,100)

Doku hasarıyla sonuçlanan serbest oksijen radikal formasyonunun, hücresel kalsiyum homeostazını bozarak da etkili olduğu bilinmektedir. Hücre içi Ca⁺²'un belli bir kısmı endoplazmik retikulum ve mitokondriumda sekestre halde bulunmaktadır. Sitozol, ekstraselüler boşluk ve endoplazmik retikulum arasındaki Ca⁺² gradienti, Ca⁺²-pompalayan adenozin trifosfataz'larca (ATP'az) dengelenir. Bu sistem dolaylı

olarak, değişik hormonların etkisiyle Ca^{+2} katalizörlüğünün gerekli olduğu adenilat siklaz, proteaz ve fosfolipazlar gibi enzimlerin aktivitelerini düzenler.

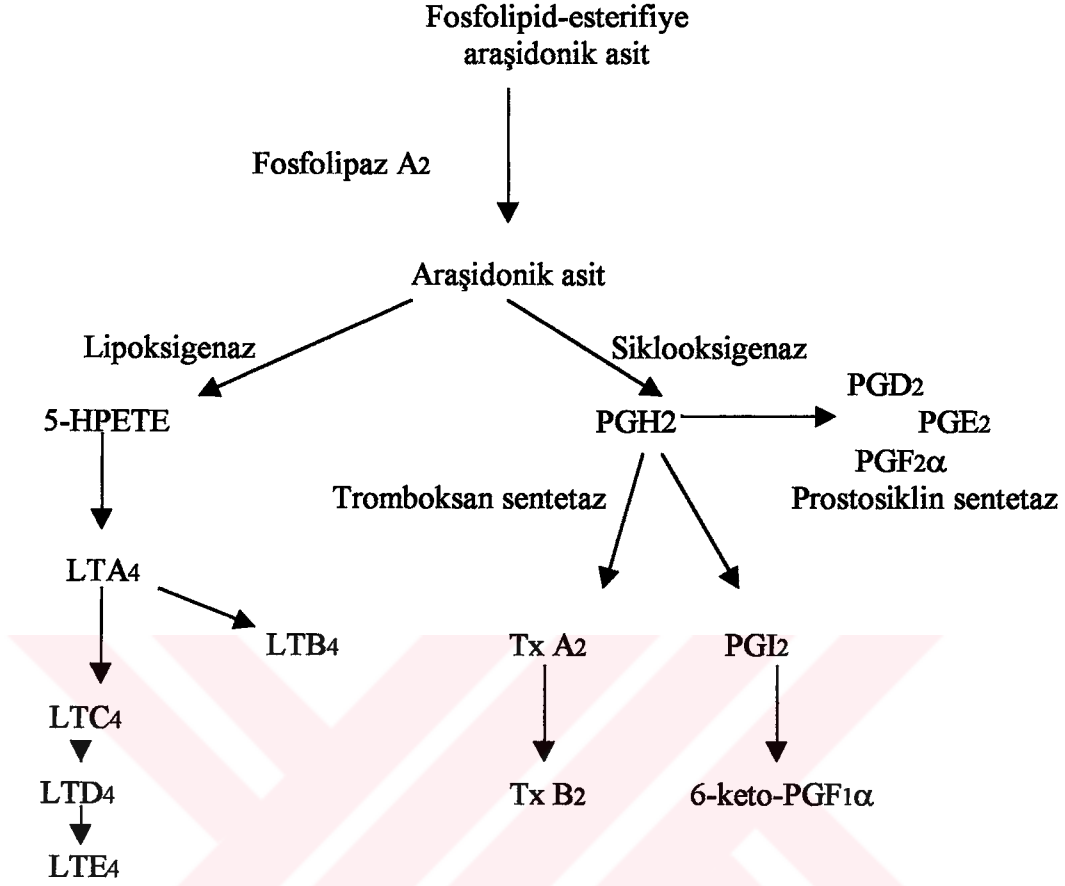
Oksidatif stres sonucu açığa çıkan SOR, glutasyon redüktaz (GSH) düzeyini düşürerek, intrasellüler Ca^{+2} dağılımını bozar. Daha sonra Ca^{+2} ATP'az inaktivasyonuna bağlı olarak, endoplazmik retikulum ve mitokondriumlardan Ca^{+2} serbestleşmesi olur ve sitozolik Ca^{+2} düzeyi yükselir. Plazma-membran Ca^{+2} ATP'az sisteminin de inaktivasyonu, ekstrasellüler kalsiyumun hücre içine akımı izlenir. Sonuçta sitozolik ve mitokondrial kalsiyum içeriği daha da artar. Bu da mitokondrial disfonksiyona yol açar ve hücreyi ölüme götüren kaskad sistemlerinin tetiğini çeker. Bu durum, temel olarak hücre ATP'nin ve dolayısıyla hücre enerji düzeyinin azalmasına sekonder gelişmektedir.

Artan sitozolik Ca^{+2} 'un iki temel etkisi söz konusudur: **1- sitozolik kalsiyum-bağımlı proteazların aktivasyonu:** aktive olan proteazlardan biri hücre yüzeyini balonlaştırarak hücre iskeletinin çökmesine neden olur. Kalsiyum ile aktive edilen ve 'kalpein' olarak tanımlanan ikinci sitozolik proteaz ise, ksantin dehidrogenaz'dan ksantin oksidaz oluşumunu indükler ('D'nin 'O'ya dönüşümü), **2- fosfolipaz A2'nin harekete geçirilmesi:** fosfolipaz A2'nin aktive olması, fosfolipidlerden araşidonik asit salınımı ile sonuçlanır. Araşidonik asit çağlayanının tetiğinin çekilmesiyle lökotrien B4 (LTB4), tromboksan A2, B2 (TxA2 – TxB2) gibi potent kemoatraktant ve vazokonstrüktör maddeler açığa çıkar. Bu maddeler, nötrofillerin endoteliuma adhezyonunu arttırarak, İRH'nin oluşmasında önemli rol oynarlar. İ/R sonrasında artan hücre içi Ca^{+2} ayrıca, karaciğerde Kupffer hücrelerini aktive ederek, bu hücrelerden TNF α , IL1, IL6 salınımını da arttırır. Bunun sonucu, adhezyon moleküllerinin endoteliumdaki ekspresyonları, mikrovasküler yatakta nötrofil ve trombosit agregasyonu da artar. Prezervasyon solüsyonuna konulan kalsiyum kanal blokörlerinin, lökosit adhezyonunu önleyerek greft sağ kalımını arttırdığı deneysel araştırmalarda gösterilmiştir.

2.5 Eikozanoidler (10,21)

Yapılan çalışmalarda, iskemik dokunun reperfüzyonu sonrasında, araşidonik asit son ürünlerinin (eikozanoidler) plazma konsantrasyonunun arttığı saptanmıştır. Eikozanoidler, esas olarak Kupffer hücrelerinden salınırlar. SOR'nin salınımı sonucunda hücre içi artan Ca^{+2} miktarı, plasma membran fosfolipaz A2 aktivasyonuna

neden olur. Fosfolipaz A2 hücre membran fosfolipidlerini araşidonik asite çevirerek, eikozanoid üretiminin tetiğini çeker (Şekil 3).



Şekil 3: Lökotrien, prostoglandin ve tromboksan gibi eikozanoidlerin oluşumunu gösteren araşidonik asit kaskad sistemi

Araşidonik asit ürünlerinin, reperfüzyon hasarı sırasında, nötrofilleri temel olarak üç mekanizma ile etkiledikleri bildirilmektedir: 1- Güçlü birer kemoatraktant rolü oynayarak nötrofil akümülyasyonunu sağlarlar ve endotele nötrofillerin adhezyonunu arttırlar. (LTB₄ ve TxA₂'nin oldukça potent kemoatraktantlar olduğu günümüzde bilinmektedir). Yapılan çalışmalarda, LTB₄ ve TxA₂ inhibisyonunun, deneysel myokard enfarktüsü ve ekstremiteye turnike ile iskemi uygulanması sonrasında, nötrofil diapedezini önemli oranda engellediği gösterilmiştir. 2-Araşidonik asit ürünleri, nötrofilleri aktive ederek, daha fazla oranda oksijen radikali ve proteolitik enzim üretmelerine neden olurlar. LTB₄'ün, nötrofillerden H₂O₂ ve elastaz salınımında ve nötrofillerin, in vitro ve in vivo olarak, endotelial geçirgenliğini arttırmasında, potent bir stimulatör olduğu gösterilmiştir. TxA₂ ise, İ/R sonrasında nötrofilleri aktive ederek H₂O₂ üretmelerini stimüle eder, 3- lökotrienler ve tromboksanlar, ayrıca, mikrovasküler

yatağa doğrudan vazokonstrüktör etki ile reperfüzyon sonrasında yetersiz kapiller akıma yol açarlar.

2.6 Lipid Peroksidasyonu (7,10,15,80)

Reperfüzyon sırasında oluşan H_2O_2 , ferröz iyonlarla reaksiyona girerek $OH\cdot$ oluşumunu gerçekleştirir (Haber-Weiss reaksiyonu). Hidroksil radikallerin karakteristik özelliği, membranda yer alan doymamış yağ asitlerinden, metilen hidrojen atomlarını çıkartarak, lipid peroksidasyonunu başlatmalarıdır. Bu süreç sonunda konjuge dienler, lipid hidroperoksit radikalleri, lipid hidroperoksitler gibi lipid-kökenli serbest oksijen radikalleri oluşur. Kendileri aktif birer okside edici ajan olan bu lipid parçalanma ürünleri, hücre membranına ağır hasar verirler, bunun sonucunda, hücre esnekliğini kaybeder ve transmembranöz iyon gradientinin bozulmasıyla hücrenin salgısal fonksiyonu ve bütünlüğü bozulur.

2.7 Sitokinler (10)

Sitokinler esas olarak Kupffer hücreleri ve endotele tutunmuş lökositler tarafından salınırlar. İ/R hasarında en önemli olanları $TNF\alpha$, IL 1, IL6, IL 8 ve γ IFN'dur ().

TNF α : Endotel hücrelerini birçok yolla aktive eder. Ortamda prokoagulant aktivitenin ve adhezyon moleküllerinin aktivitesi artırır. IL 1, 8 ve LTB₄'ün salınımını hızlandırır. Nötrofillerden serbest oksijen radikallerinin salınımını provoke eder, nötrofil agregasyonunu, endotele yapışma yeteneğini ve fagositozu artırır. Endotelden NO salınımına yol açar. NO superoksit ile reaksiyona girerek toksik peroksinitrit radikallerinin oluşumuna yol açar.

IL 1: En çok Kupffer hücreleri tarafından salınır. Diğer sitokinlerin salınımını başlatır. Sinüsoid endotelinde protrombotik ve proinflamatuvar bir ortam hazırlar.

IL 6: Kupffer hücreleri ve sinüsoid endotelial hücrelerden salınır. Endotoksine hassastır. Hepatositlerden akut faz reaktantlarının (C-reaktif protein, α 1 antitripsin, fibrinojen) salınımını indükler.

γ IFN: Büyük granüler lenfositler ve bazı T-hücreleri tarafından salınır. $TNF\alpha$, IL 1 salınımını ve endotel hücrelerinde major histokompatibilite antijen (MHC) sınıf II ekspresyonunu artırır. Endotele lenfosit adhezyonunu ve antijen prezentasyonunu

provoke eder. TNF α ve IL 1 ile birlikte proteaz/antiproteaz balansını bozarak, endotel hücreleri tarafından bazal membran protein degradasyonunun oluşumunu indükler.

IL 8: Nötrofil hareketlerini stimüle eden güçlü bir kemokindir.

Sitokinler, İRH'nın oluşmasında önemli rol oynayan mediatörlerdir. Etkilerini, tek başlarına ya da belirli bir etkileşim zinciri çerçevesine etkileşip, birbirlerinin etkisini arttırarak gösterirler.

2.8 Endotoksin (10,21,88,101,102)

Karaciğerin transplantasyonunda, alıcıda oluşan endotoksineminin başlıca kaynakları major gastrointestinal manüpülasyon, anhepatik faz, portal oklüzyon, ve en önemlisi portal deklempej sonrası, hem greftte hemde barsakta gelişen iskemi-reperfüzyon fenomenidir.

Deneysel çalışmalarda, İRH'na uğramış karaciğerde, endotoksinin Kupffer hücrelerinden SOR ve TNF α salınımını arttırıcı etkisi olduğu ve nötrofillerin endotele adhezyonunu provoke ettiği bildirilmektedir.

İRH'nda, Kupffer hücrelerinin endotoksini bloke etme kapasiteleri azalır. Kan düzeyi oldukça yükselen ve karaciğerde Kupffer hücreleri tarafından tutulamayan endotoksin, akciğer alveoler makrofajlarınca tutularak, etkilerini akciğerde gösterir. İ/R sonrasında akciğerde endotoksin kaynaklı gelişen bu olaya 'erişkin solunum zorluğu sendromu' (ARDS) adı verilir. Bu olay, akciğerde, proteinlere karşı mikrovasküler permeabilite artışı olarak tanımlanabilir. İskemik doku kitlesi ne kadar geniş ve iskemi süresi ne kadar uzun olursa, bu sendromun gelişme riski o kadar yüksek olmaktadır.

Bunlara ek olarak, ARDS'nin, aktive olmuş nötrofillerin pulmoner mikrovaskülatuar yapıda sekestrasyonuna, sekonder olarak da gelişebildiği bildirilmektedir. Çünkü organizmanın nötrofil sayısının azaltılmasının ve nötrofil aktivasyonunun engellenmesinin, pulmoner ödemi oldukça önemli oranda önlediği, deneysel modellerde gösterilmiştir. İ/R sonrasında, nötrofillerin neden selektif olarak akciğerde akümüle olup, ARDS'nin gelişimine yol açtığı günümüzde henüz tam olarak aydınlatılamamakla beraber, birtakım sitokinlerin akciğer endoteline nötrofil adhezyonunu spesifik olarak stimüle ettiği düşünülmektedir. Bu sitokinler, nötrofil aktivasyonu yanısıra, akciğer endotelini de uyararak endoteli nötrofillere karşı daha adheziv kılmaktadırlar.

2.9 Pentoksifilin (61-71)

Pentoksifilin (Ptx) genellikle periferik vasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan ksantin türevi fosfodiesteraz inhibitörü bir farmakolojik ajandır. Yapılan çalışmalarda, sıçanlarda deneysel karaciğer nakli modelinde, alıcı sıçanların Ptx ile tedavisi sonucunda soğuk İRH'nın önemli oranda azaldığı ve post-transplant dönemde greft fonksiyonlarının oldukça iyileştiği gözlenmiştir. Aynı zamanda Ptx, deneysel normotermik karaciğer İ/R modellerinde de çalışılmış olup, karaciğer fonksiyonlarını ve sağ kalımı iyileştirici etkileri olduğu saptanmıştır.

Ptx, İ/R sonrasında, karaciğerde aktive olan Kupffer hücrelerini stabilize ederek, bu hücrelerden başta TNF, İL 1, İL 6 olmak üzere İRH'ında oldukça önemli etkileri olan bir dizi sitokinin salınımını suprese eder. Aynı zamanda, Ptx'in lipopolisakkarit (LPS)-nedenli TNF salınımını suprese ettiğine yönelik çalışmalar da vardır.

Ptx'in bir diğer etkisi mikrosirkülasyon düzenleyici özelliğidir. Bilindiği gibi İ/R sonrasında tüm organlarda olduğu gibi karaciğerde de mikrosirkülasyon bozulmakta, reperfüze olan dokuda kan akımı yeterli olmamaktadır. Ptx, eritrositlerin azalmış olan esnekliğini (fleksibilitesini veya deformabilitesini) artırır, artmış kan viskozitesini azaltır. Kapillerin çapı, dokuların çoğunda özellikle İ/R sonrası, eritrosit çapından küçük (yarısından az) olduğu için fleksibilitenin artması kapiller kan akımının hızlandırılması açısından büyük önem taşır. Eritrositlere etkisi yanısıra, Ptx, trombosit agregasyonunu, lökosit adhezyonunu ve vazokonstrüksiyonu da azaltır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen erkek, Wistar sıçanlar donör ve alıcı olarak kullanıldı. Cerrahi işlemler eter anestezisi altında, temiz ancak non-steril olarak, standart laboratuvar koşullarında gerçekleştirildi. Sıçanlar operasyon öncesi ve sonrasında, herbiri ayrı kafeste olmak üzere, standart laboratuvar diyeti ve su ile beslendi.

3.1 Cerrahi İşlemler

Sıçanlarda ortotopik karaciğer transplantasyonu, arteriyel rekonstrüksiyon uygulanmadan modifiye Kamada tekniği ile gerçekleştirildi (103).

Donör operasyonu: Haçşı kesi ile laparotomi uygulandı. Sol frenik, sağ surrenal ven bağlanıp kesildikten sonra, sağ renal arter ve ven bağlanıp kesilerek, renal arter altta infrahepatik inferior vena kava'dan (IVC) ayrıldı. İnfrahepatik IVC, sol renal vene kadar serbestleştirildi (Resim 1).

Gastroduodenal ven bağlanıp kesildikten sonra hepatic arter diseke edildi ve bağlanıp kesildikten sonra arkada portal venden keskin ve künt diseksiyonla ayrıldı. Splenik ven diseke edildi, bağlanıp kesildi. Koledok kanüle edildi (Merck Biotrol, polietilen, 0.6 cm uzunluğunda, dış çapı 0.11 cm, iç çapı 0.9 cm) (Resim 2). Sıcak iskemik süreç öncesi penis veninden 250 Ü/kg'dan heparin enjekte edildi.

Diafram kesilerek, aorta supradiafragmatik düzeyden bağlandı, splanknik alanda ve karaciğer içerisinde sekestre olan kanın boşalabilmesi için supradiafragmatik IVC diafram üzerinden kesildi (Resim 3). 30 veya 60 dakikalık sıcak iskemi süreleri sonunda 4°C'de 10cc UW solüsyonu ile v. porta kanüle edilerek, karaciğer perfüze edildi (Resim 4). Suprahepatik IVC diafragma yakın, v. porta splenik ven ve infrahepatik IVC sol renal ven düzeyinde kesilerek harvest gerçekleştirildi. Daha sonra, greft prezervasyon için 4°C'lik UW solüsyonunun içerisine kondu.

Solüsyon içerisinde önce porta 'cuff'ı, (Merck Biotrol, polietilen, silindir uzunluğu: 2 mm, sap uzunluğu: 2 mm, dış çapı: 2.42 mm, iç çapı: 1.62 mm) daha sonra IVC 'cuff'ı (Merck Biotrol, polietilen, silindir uzunluğu: 2.5 mm, sap uzunluğu: 2.5 mm, dış çapı: 2.80 mm, iç çapı: 1.77 mm) takıldı (Resim 5,6,7) ve karaciğer greftleri reperfüzyona dek 4°C'lik ortamda prezerve edildi (Resim 8).

Alıcı Operasyonu: Alıcı hepatektomisi için ksifoidopubien kesi ile laparotomi yapıldı. Sol frenik ve sağ surrenal venler bağlanıp kesildikten sonra infrahepatik IVC,

sağ renal vene kadar serbestleştirildi. Gastroduodenal ven bağlanıp kesildi, hepatic arter diseke edilerek v. portadan ayrıldı. Koledok karaciğere yakın olarak bağlandı ve kesildi. Daha sonra sırasıyla IVC ve portal vene traksiyon sütürleri kondu (Resim 9).

Sırasıyla portal ven, infrahepatik IVC'ya buldog ve suprahepatik IVC'ya Satinsky klempleri kondu (Resim 10). Suprahepatik IVC ve hilar oluşumlar karaciğere yakın kesilerek, total hepatektomi gerçekleştirildi (Resim 11). Daha sonra, greft uygun pozisyonda abdomen içerisine yerleştirildi ve sırasıyla 7/0 prolene ile termino-terminal suprahepatik kavo-kaval anastomoz (Resim 12,13) ve 'cuff' tekniği ile porto-portal anastomoz gerçekleştirildi (Resim 14). Ardından önce Satinsky, sonra porta klempleri kaldırılarak, greftin reperfüzyonu sağlandı (Resim 15). Daha sonra, yine 'cuff' tekniği ile infrahepatik kavo-kaval anastomoz tamamlanarak (Resim 16), total deklempaj temin edildi (Resim 17). Sonrasında, greft koledoğu içine tespit edilen stent alıcı koledoğu içine sokuldu, dıştan bağlandı ve operasyona son verildi (Resim 18,19).



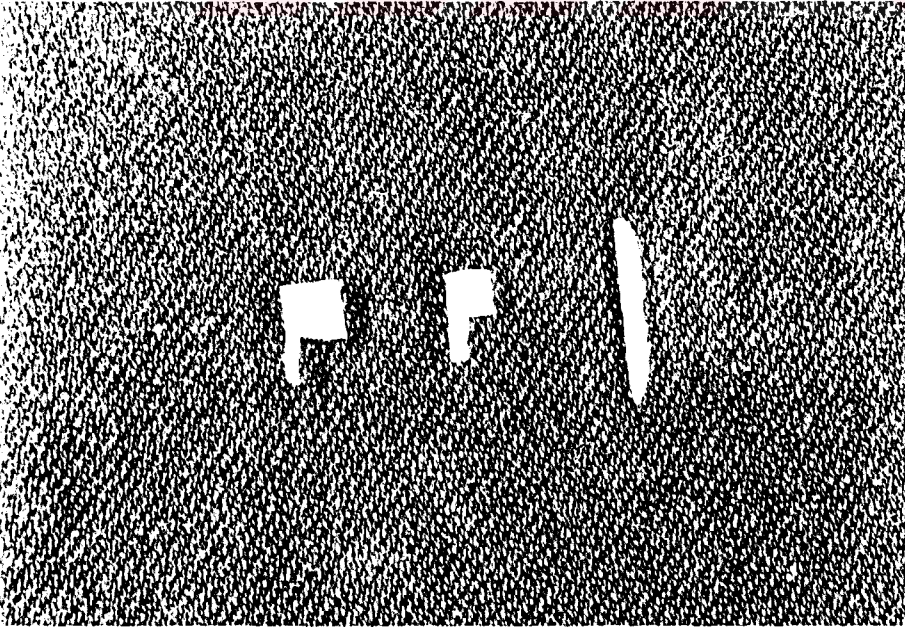
Resim 1: İnfrahepatik IVC diseksiyonu **Resim 2:** Portal hilus yapılarının diseksiyonu



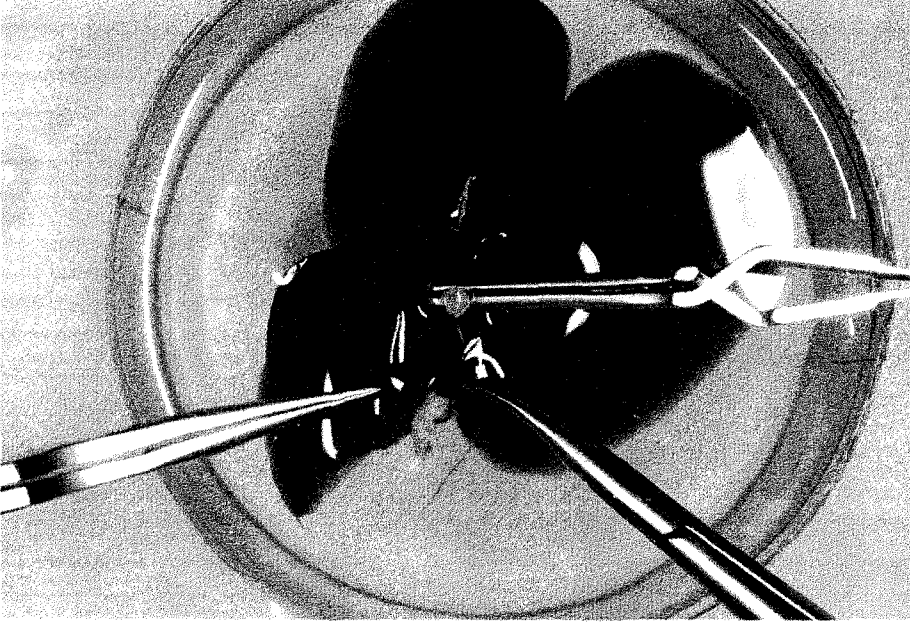
Resim 3: Supraçöliak aortanın bağlanıp, suprahepatik IVC'nin kesilmesi



Resim 4: +4°C'deki UW solüsyonu ile perfüzyon.



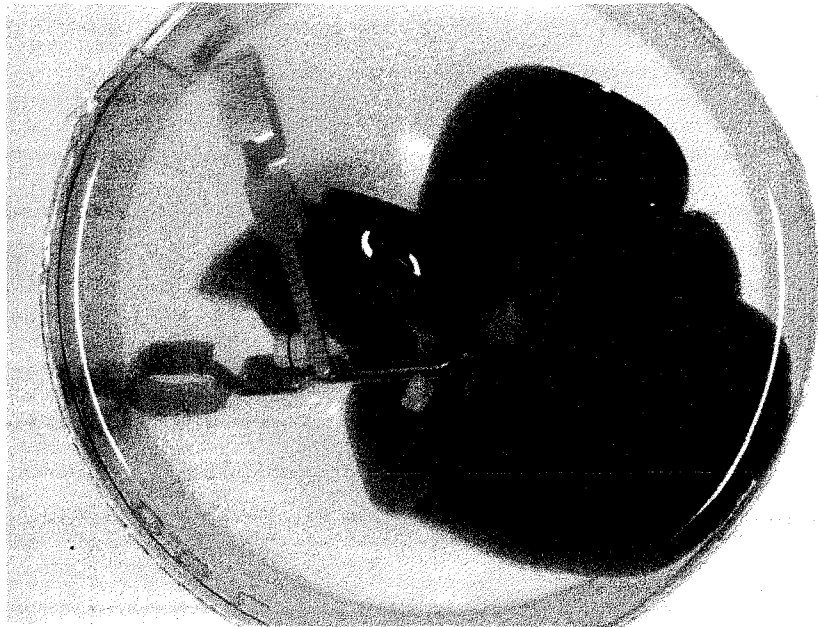
Resim 5: IVC, v. porta 'cuff'ları ve koledok kanülü



Resim 6: Portal
cuff'ın takılması



Resim 7: IVC
cuff'ının takılması



Resim 8: Greft
+4°C'deki UW
solüsyonunda
saklanıyor



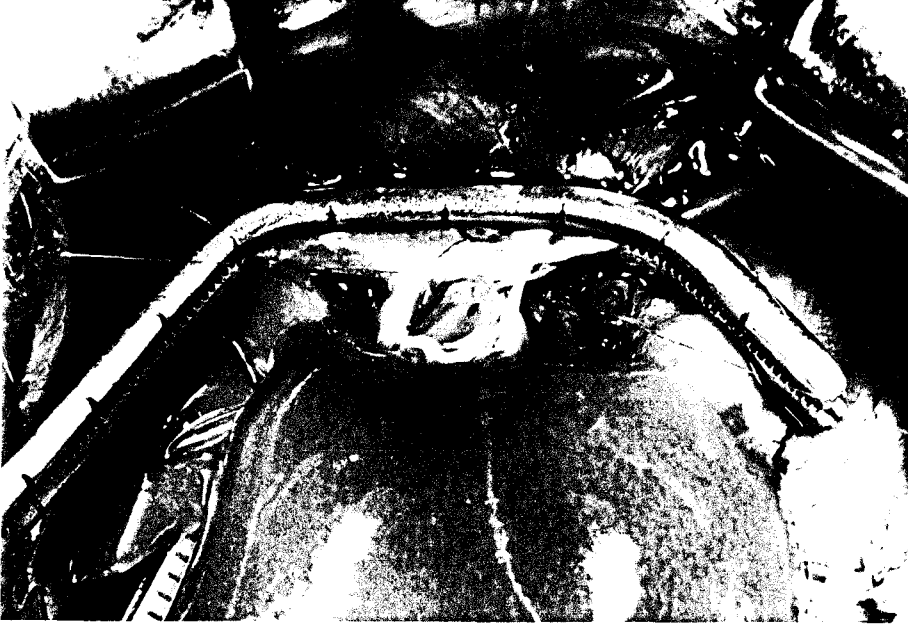
Resim 9: IVC ve portal hilüs diseksiyonunun tamamlanıp, traksiyon sütürlerinin konulması



Resim 10: Total klempaj



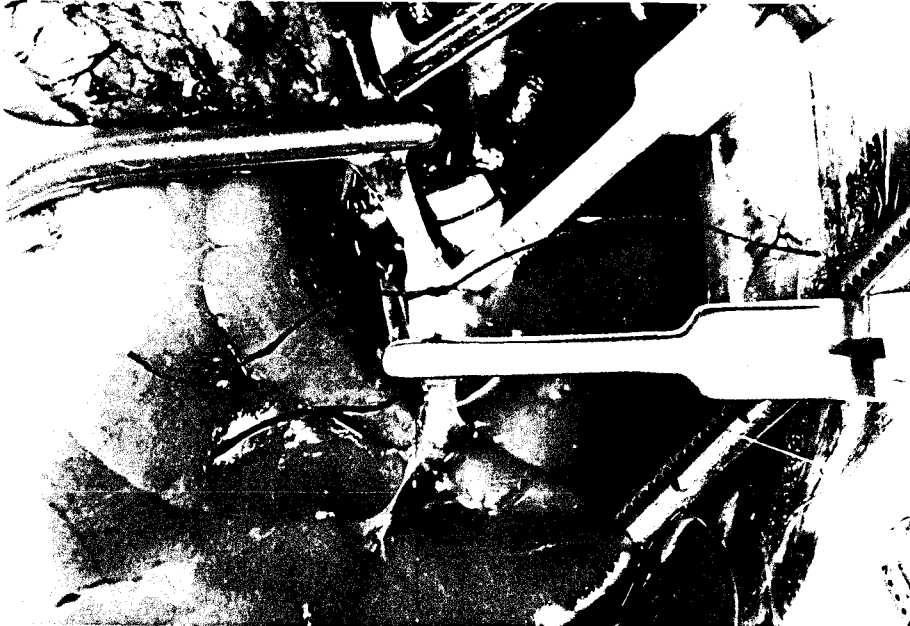
Resim 11: Total hepatektomi



Resim 12:
Suprahepatik IVC
anastomozu;
anastomozun alt
kısmı tamamlanmış



Resim 13:
Suprahepatik
IVC anastomozu
tamamlanmış



Resim 14:
Porto-portal 'cuff'
anastomozu



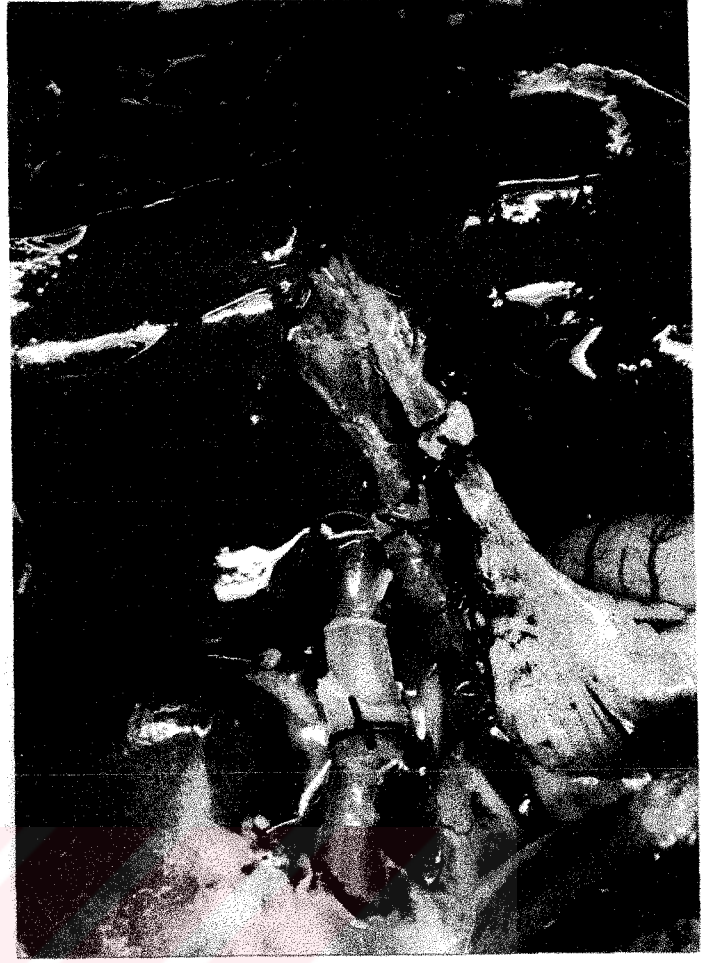
Resim 15:
Portal deklampaj.
Karaciğerden safra akımı
başlamış.



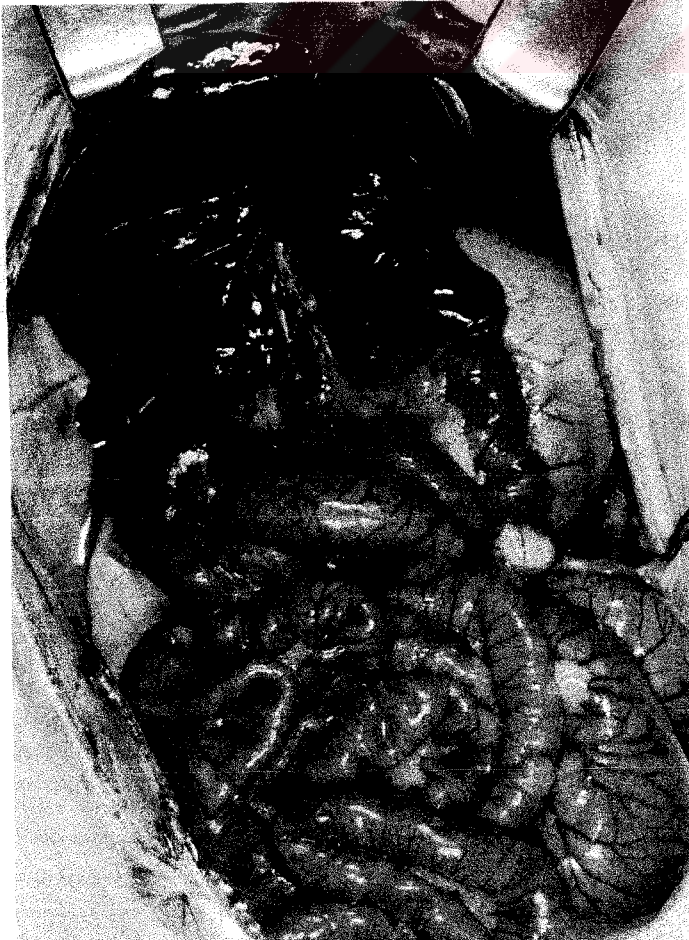
Resim 16: Kavo-kaval 'cuff' anastomozu



Resim 17: Total deklampaj. Karaciğer safra akımı mevcut. Sağ böbrek dekonjesyone



Resim 18: Greft koledoku içine sokulan stentin, alıcı koledoku içine sokulup, dıştan bağlanması



Resim 19. Genel görünüş.
Greft perfüzyonu ve
barsakların dolaşımı iyi

3.2 Deney Grupları

Transplantasyon grupları 3 ana gruba ayrıldı. Her alt grupta 10 adet transplantasyon gerçekleştirildi.

1- Soğuk iskemi (kontrol) grubu:

- Grup 1: Sıcak iskemi uygulanmadan, 1 saatlik soğuk iskemi sonrasında transplantasyon gerçekleştirildi.

- Grup 2: Sıcak iskemi uygulanmadan, 9 saatlik iskemi sonrasında transplantasyon gerçekleştirildi.

2- Sıcak ve soğuk iskemi grupları:

Bu gruptaki donör ve alıcı sıçanlara hiç bir tedavi uygulanmadı. İP serum fizyolojik verildi.

- Grup 3: 1/2 saatlik sıcak, 1 saat soğuk iskemi sonrasında transplantasyon uygulandı.

- Grup 4: 1/2 saatlik sıcak, 9 saatlik soğuk iskemi sonrası transplantasyon uygulandı.

- Grup 5: 1 saatlik sıcak, 1 saatlik soğuk iskemi sonrasında transplantasyon uygulandı.

- Grup 6: 1 saatlik sıcak, 9 saatlik soğuk iskemi sonrasında transplantasyon uygulandı.

3- Pentoksifilin ile tedavi edilen sıcak ve soğuk iskemi grupları:

Bu grupta donör ve alıcı sıçanlar protokolde belirtilen doz ve şekilde Ptx ile tedavi edildiler.

- Grup 7: 1/2 saatlik sıcak, 1 saatlik soğuk iskemi sonrasında transplantasyon + Ptx uygulandı.

- Grup 8: 1/2 saatlik sıcak, 9 saatlik soğuk iskemi sonrasında transplantasyon + Ptx uygulandı.

- Grup 9: 1 saatlik sıcak, 1 saatlik soğuk iskemi sonrasında transplantasyon + Ptx uygulandı.

- Grup 10: 1 saatlik sıcak, 9 saatlik soğuk iskemi sonrasında transplantasyon + Ptx uygulandı.

3.3 Donör ve alıcı sıçanların pentoksifilin ile tedavisi

Tedavi grubundaki alıcı ve verici sıçanlara, operasyondan 1 saat önce intraperitoneal (İP) 50mg/kg dozda PTx verildi ve bu tedaviye post-operatif 4 gün

boyunca 25mg/kg dozda devam edildi. Ptx verilmeyen sıcak ve soğuk iskemi grubunda ise, alıcı ve verici sıçanlara, yine operasyondan 1 saat önce İP aynı volümde serum fizyolojik (SF) verildi ve bu grupta da post-operatif 4 gün boyunca aynı volümde İP serum fizyolojik verilmeye devam edildi.

3.4 Histopatolojik İncelemeler

Reperfüzyondan 6 saat sonra alınan karaciğer biyopsileri tamponlu formalin içerisinde fikse edilip, hematoksilin-eozin (HE) ile boyandıktan sonra histopatolojik incelemeye gönderildi. Analizler, biyopsi materyalinin hangi gruba ait olduğu bilinmeden gerçekleştirildi.

Preparatlar incelenirken, her büyük büyütme alanındaki periportal ve perisantral nekroz alanları semikantitatif olarak, 0'dan +4'e kadar skorlandı. Buna göre periportal ve perisantral nekroz için; 0: nekroz yok, +1: bir çeyrek, +2: iki çeyrek, +3: üç çeyrek, +4: tüm alanlarda nekroz saptanması olarak ifade edildi (61).

3.5 Karaciğer enzimleri

Femoral venden alınan örneklerde, reperfüzyon sonrası 1. , 24. saatlerde ve 1. hafta (sağ kalımı olan hayvanlarda) sonunda serum SGOT, SGPT ve LDH düzeyleri ölçüldü. Serum SGOT, SGPT ve LDH aktivite tayinleri, Bio-Merieux firmasının Enzyline SGOT, SGPT ve LDH standardize kitleri ile Technicon OpeRA otoanalizatörlüğünde gerçekleştirildi.

3.6 Sağ kalım Analizi

Transplantasyon sonrası 1 hafta sağ kalım, sağ kalım kriteri olarak değerlendirildi.

3.7 İstatistik Analizleri

Histolojik hasarların karşılaştırılması 'independent sample t-test', karaciğer enzim düzeyleri arasındaki farklılık 'ANOVA' testi ile, sağ kalım analizleri ise 'Fisher's Exact Test' ile karşılaştırıldı. 0.05'in altındaki p değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Donör operasyonları ortalama 25 ± 3 , alıcı operasyonları ise 42 ± 4 dakika sürdü. Portal klempaj zamanı ortalama 13.5 ± 2 , total (portal + kaval) klempaj süresi 16.5 ± 3.6 dakika kadar olup, 'cuff'ların (greft porta ve IVC'sına) takılma zamanı ise toplam ortalama 12 ± 2 dakika idi.

4.1 Sağ kalım analizleri:

Donör ve alıcı sıçanların pentoksifilin ile tedavisi, SF verilen gruplara oranla $\frac{1}{2}$ saat sıcak + 1 soğuk (Gr 3 vs 7), $\frac{1}{2}$ saat sıcak + 9 saat soğuk (Gr 4 vs 8) ve 1 saat sıcak + 9 saat soğuk (Gr 6 vs 10) iskemi gruplarında, sağ kalım oranlarını istatistiksel anlamlı olarak arttırmıştır. 1 saat sıcak + 1 saat soğuk (Gr 5 vs 9) iskemi grubunda ise sağ kalım oranı belirgin olarak artmış olup, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (Tablo 1).

Tablo 1: Değişik sıcak ve soğuk iskemi süreleri sonrasında alıcı sağ kalım oranları

İskemi	Sağ kalım	SF	Ptx
		Sağ kalım	P
$\frac{1}{2}$ saat sıcak + 1 saat soğuk	6/10 (Gr 3)	10/10 (Gr 7)	0.043
$\frac{1}{2}$ saat sıcak + 9 saat soğuk	4/10 (Gr 4)	9/10 (Gr 8)	0.030
1 saat sıcak + 1 saat soğuk	3/10 (Gr 5)	8/10 (Gr 9)	0.069
1 saat sıcak + 9 saat soğuk	0/10 (Gr 6)	6/10 (Gr 10)	0.005

4.2 Karaciğer enzimleri:

SF verilen tüm sıcak ve soğuk iskemi gruplarında (Grup 3,4,5,6), aynı soğuk iskemili kontrol gruplarına (sıcak iskemisiz) (Gr 1,2) oranla, post-transplant 1'inci, 24'üncü saatler ve 1'inci haftada bakılan serum SGOT, SGPT ve LDH değerleri istatistiksel anlamlı olarak yükseldi.

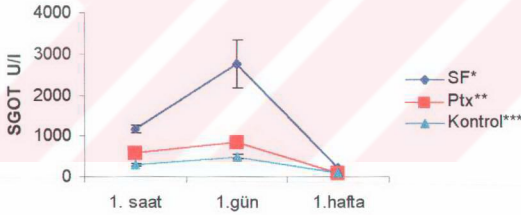
SGOT ve SGPT değerleri, Ptx ile tedavi edilen tüm sıcak ve soğuk iskemi gruplarında (Grup 7,8,9,10), SF verilen gruplara oranla (Grup 3,4,5,6), tüm zaman aralıklarında (reperfüzyon sonrası 1. saat, 1. gün ve 1. hafta) istatistiksel anlamlı olarak düşük bulundu. Serum LDH değerlerinde ise, 1 saat sıcak + 1 saat soğuk iskemi grubunun (Gr 5 vs 9) post-transplant 24'üncü saati haricinde, Ptx verilen tüm gruplarda (Gr 7,8,9,10), tüm zaman aralıklarında (reperfüzyon sonrası 1. saat, 1. gün ve 1. hafta)

istatistiksel anlamlı bir düşme elde edildi. Söz konusu 1 saat sıcak + 1 saat soğuk iskemi grubunda (Gr 5 vs 9) Ptx tedavisi, post-transplant 24'üncü saatte belirgin bir düşmeye neden oldu ancak bu düşüş istatistiksel anlamlı değildi.

Kısa süreli (1/2 saat) sıcak iskemi uygulanan (1 veya 9 saat soğuk iskemili) ve Ptx verilen gruplarda (Gr 7,8), SGOT, SGPT ve LDH değerlerindeki artış, tüm zaman aralıklarında (reperfüzyon sonrası 1. saat, 1. gün ve 1. hafta), aynı soğuk iskemi süreli kontrol gruplarına (sıcak iskemisiz) oranla (Gr 1,2), istatistiksel anlamlı bulunmadı.

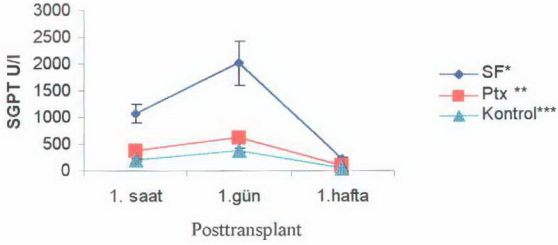
Buna karşılık, uzun süreli (1 saat) sıcak iskemi uygulanan (1 veya 9 saat soğuk iskemili) ve Ptx verilen gruplarda (Gr 9,10), SGOT, SGPT ve LDH değerlerindeki artış, tüm zaman aralıklarında (reperfüzyon sonrası 1. saat, 1. gün ve 1. hafta), aynı soğuk iskemi süreli kontrol gruplarına (sıcak iskemisiz) oranla (Gr 1,2), istatistiksel olarak anlamlı idi (Grafikler 1'den 12'ye kadar).

½ SAAT SICAK + 1 SAAT SOĞUK İSKEMİ

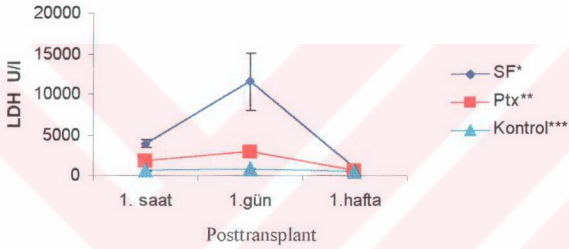


Posttransplant

Grafik 1: 1.saat: (*) vs (**) p<0.05, (*) vs (***) p<0.05, (**) vs (***) p>0.05
 24. saat: (*) vs (**) p<0.05, (*) vs (***) p<0.05, (**) vs (***) p>0.05
 1. hafta: (*) vs (**) p<0.05, (*) vs (***) p<0.05, (**) vs (***) p>0.05

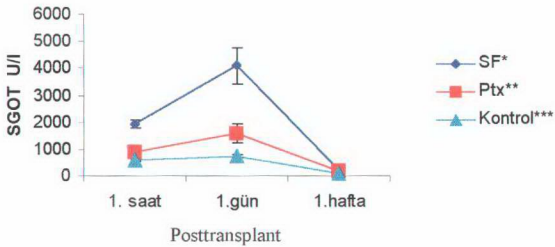


Grafik 2: 1.saat: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p > 0.05$
 24. saat: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p > 0.05$
 1.hafta: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p > 0.05$

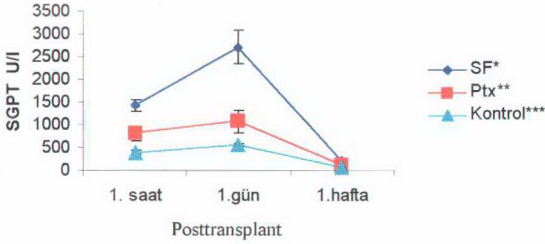


Grafik 3: 1. saat: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p > 0.05$
 24. saat: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p > 0.05$
 1.hafta: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p > 0.05$

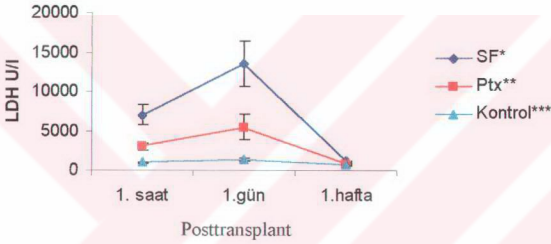
½ SAAT SICAK + 9 SAAT SOĞUK İSKEMİ



Grafik 4: 1.saat: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p > 0.05$
 24. saat: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p > 0.05$
 1.hafta: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p > 0.05$

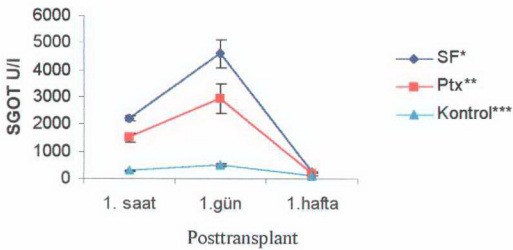


Grafik 5: 1.saat: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p > 0.05$
 24. saat: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p > 0.05$
 1.hafta: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p > 0.05$

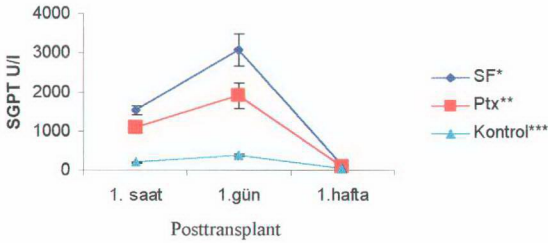


Grafik 6: 1.saat: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p > 0.05$
 24. saat: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p > 0.05$
 1.hafta: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p > 0.05$

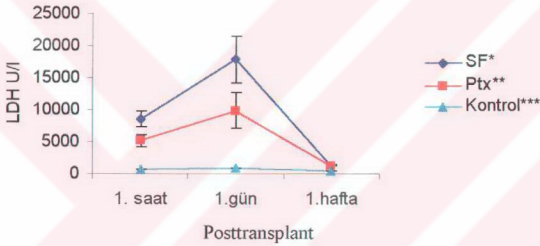
1 SAAT SICAK + 1 SAAT SOĞUK İSKEMİ



Grafik 7: 1.saat: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p < 0.05$
 24. saat: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p < 0.05$
 1.hafta: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p < 0.05$

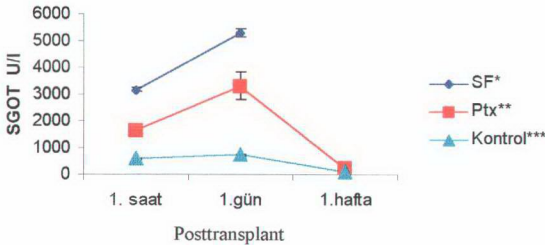


Grafik 8: 1.saat: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p < 0.05$
 24. saat: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p < 0.05$
 1.hafta: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p < 0.05$

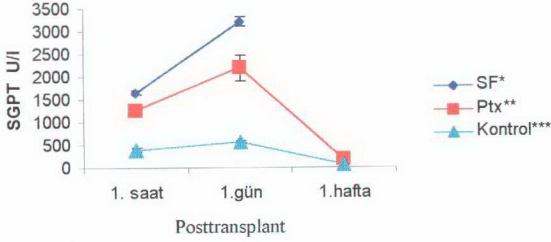


Grafik 9: 1.saat: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p < 0.05$
 24. saat: (*) vs (**) $p > 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p < 0.05$
 1.hafta: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p < 0.05$

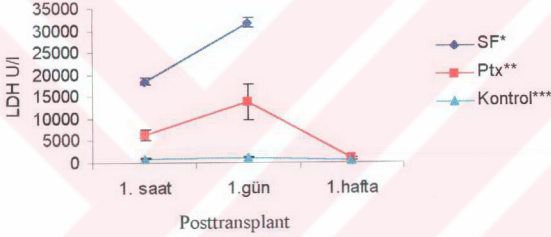
1 SAAT SICAK + 9 SAAT SOĞUK İSKEMİ



Grafik 10: 1.saat: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p < 0.05$
 24. saat: (*) vs (**) $p < 0.05$, (*) vs (***) $p < 0.05$, (**) vs (***) $p < 0.05$
 1.hafta: (**) vs (***) $p < 0.05$



Grafik 11: 1.saat: (*) vs (**) $p<0.05$, (*) vs (***) $p<0.05$, (**) vs (***) $p<0.05$
 24. saat: (*) vs (**) $p<0.05$, (*) vs (***) $p<0.05$, (**) vs (***) $p<0.05$
 1.hafta: (**) vs (***) $p<0.05$



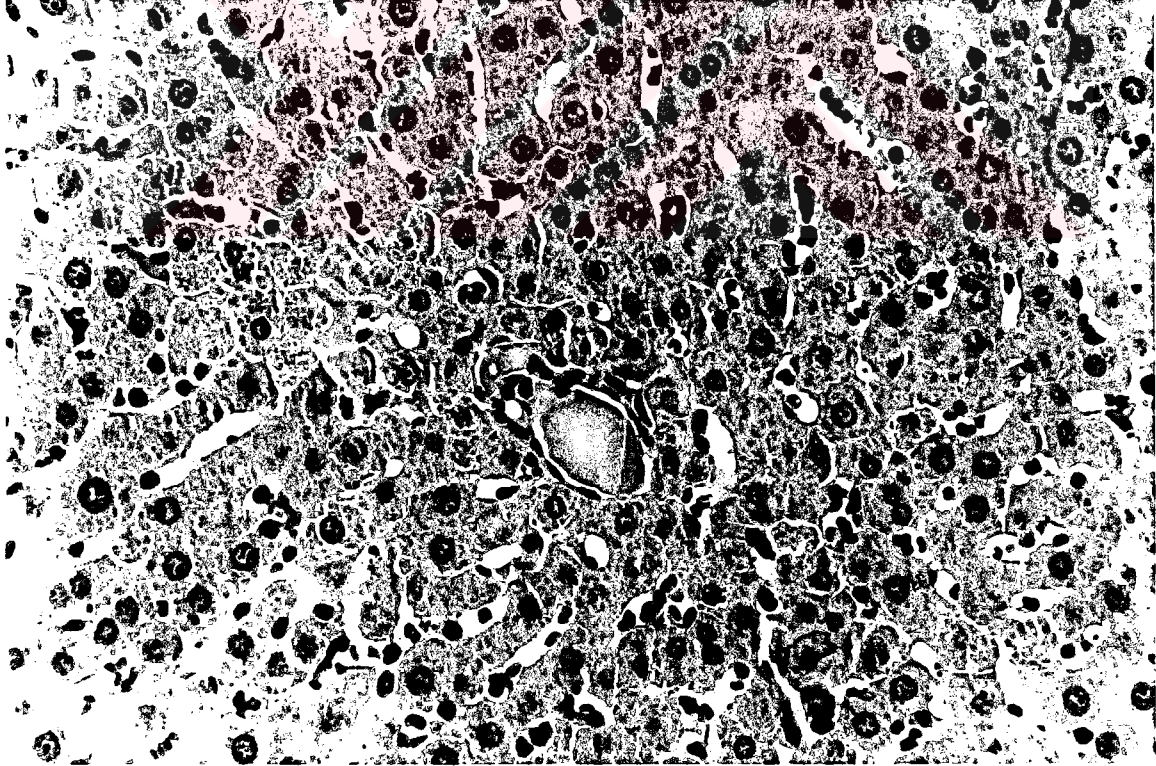
Grafik 12: 1.saat: (*) vs (**) $p<0.05$, (*) vs (***) $p<0.05$, (**) vs (***) $p<0.05$
 24. saat: (*) vs (**) $p<0.05$, (*) vs (***) $p<0.05$, (**) vs (***) $p<0.05$
 1.hafta: (**) vs (***) $p<0.05$

4.3 Histopatolojik değişiklikler:

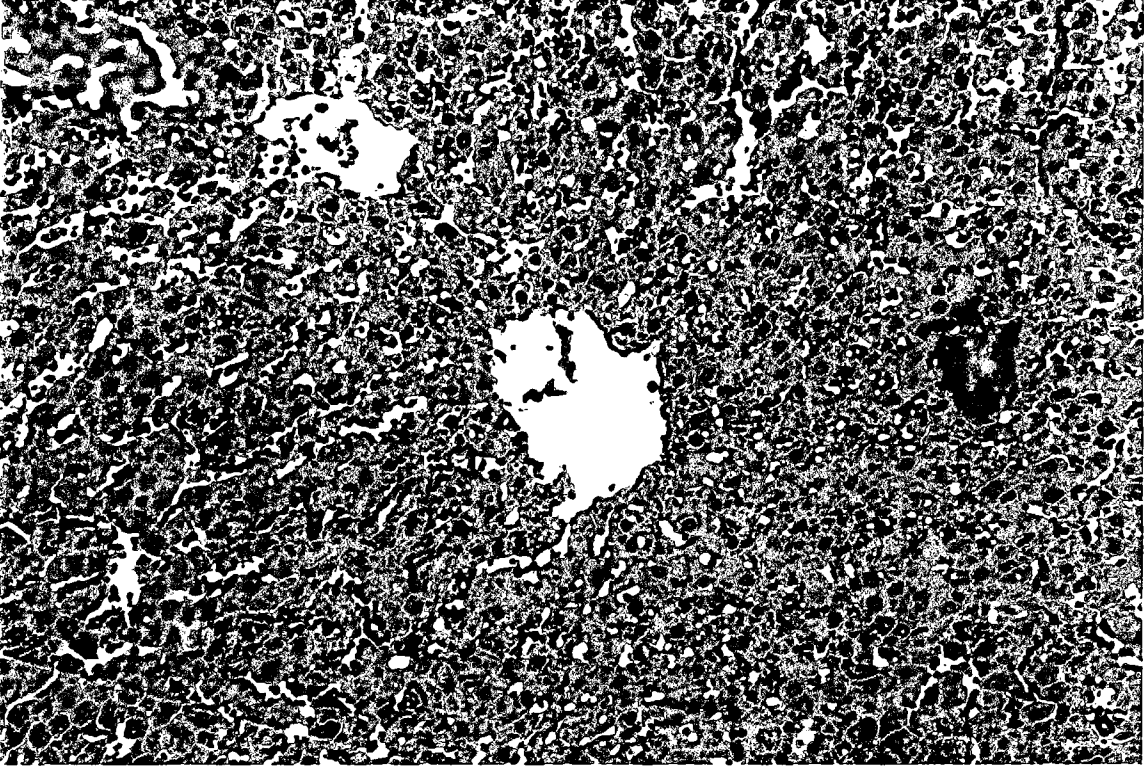
Reperfüzyon sonrası 6. saatte alınan karaciğer biyopsilerinin histopatolojik olarak incelenmesinde, SF verilen sıcak ve soğuk iskemi gruplarında (Gr 3,4,5,6), gerek periportal gerekse perisantral alanlarda belirgin olarak daha yaygın koagülasyon nekrozu, sinüzoidal konjesyon ve nötrofil infiltrasyonu saptandı. Ptx verilen sıcak ve soğuk iskemi gruplarında (Gr 7,8,9,10) ise nekroz alanları anlamlı olarak azaldı. Ayrıca, Ptx verilen gruplarda, sinüzoidlerin daha iyi perfüze olduğu ve sinüzoidal kıvrımlaşmaların belirgin olarak azaldığı görüldü. Karaciğer nekroz alanları semikantitatif olarak 0'dan +4'e kadar skorlandığında, Ptx verilen gruplarda, karaciğer hasarının istatistiksel anlamlı olarak azaldığı (Tablo 2) ve karaciğer histolojik arkitektürünün belirgin olarak daha iyi korunduğu saptandı (Resim 20- 27).



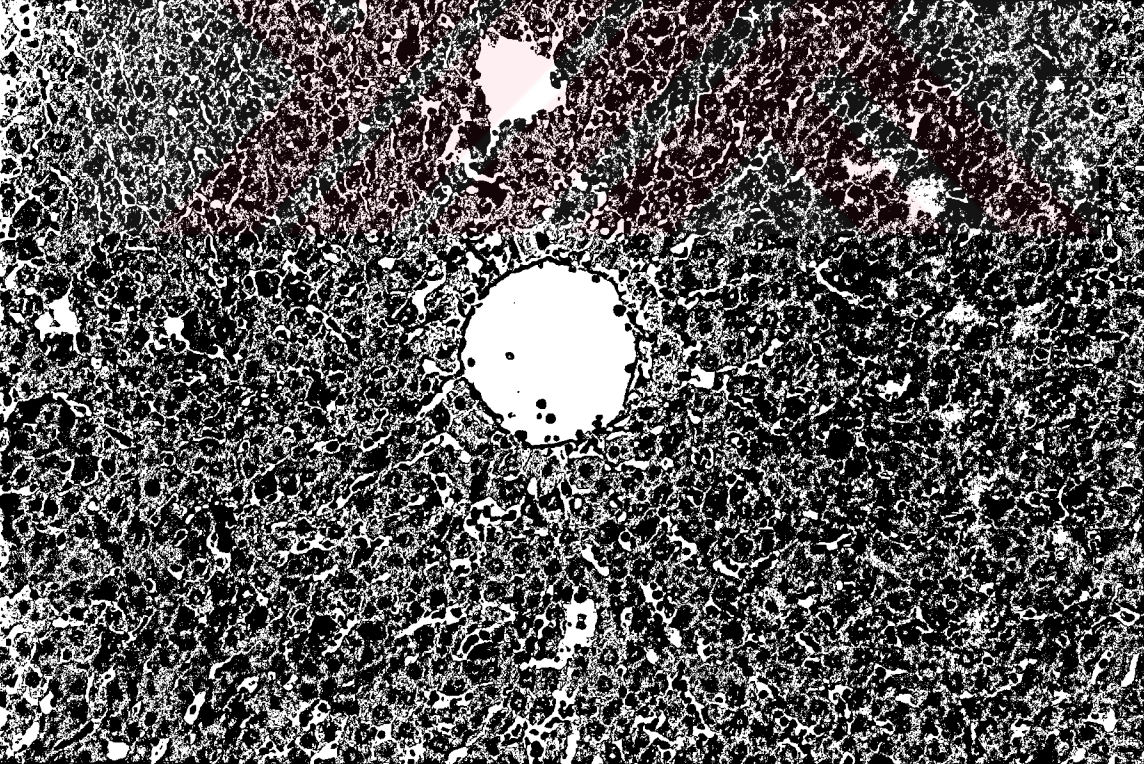
Resim 20: *Grup:3;* ½ saat sıcak + 1 saat soğuk iskemi, Ptx (-): İki alanda periportal nekroz, sinüzoidlerde hafif konjesyon ve nötrofil infiltrasyonu izlenmekte.



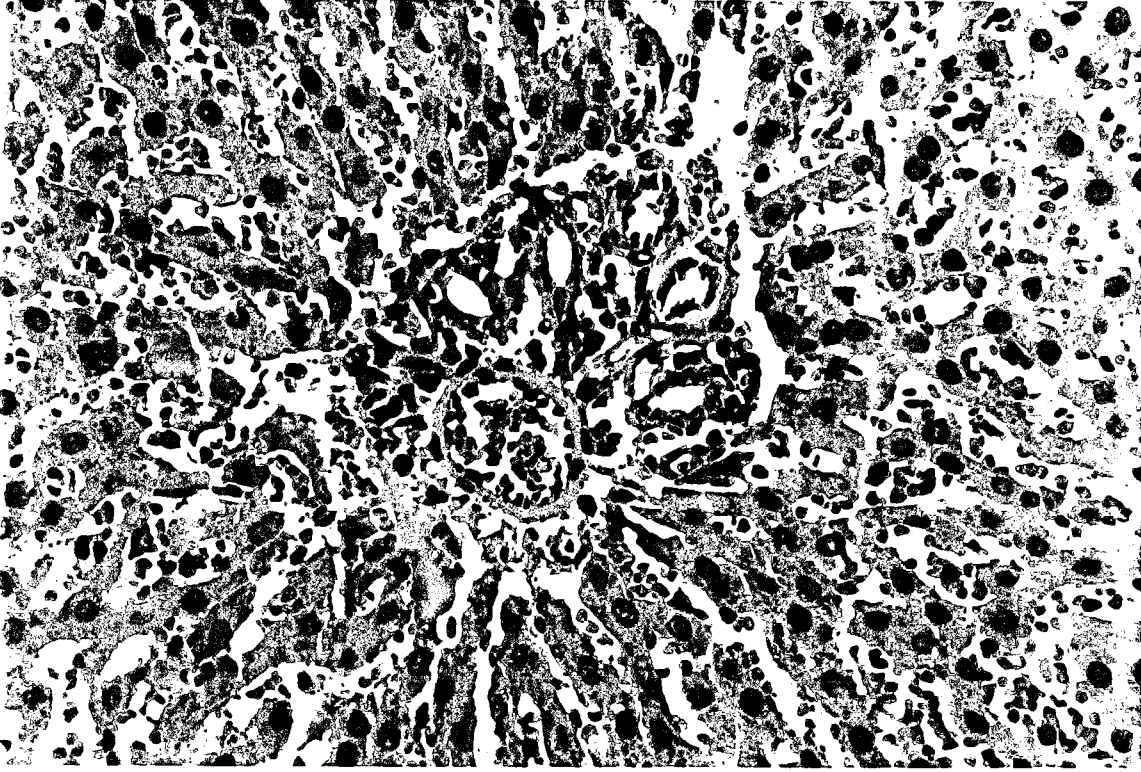
Resim 21: *Grup:7;* ½ saat sıcak + 1 saat soğuk iskemi, Ptx (+): Nekroz alanı gözlenmemekte, minimal nötrofil infiltrasyonu mevcut olup, karaciğer parenkim yapısı oldukça iyi korunmuş durumda.



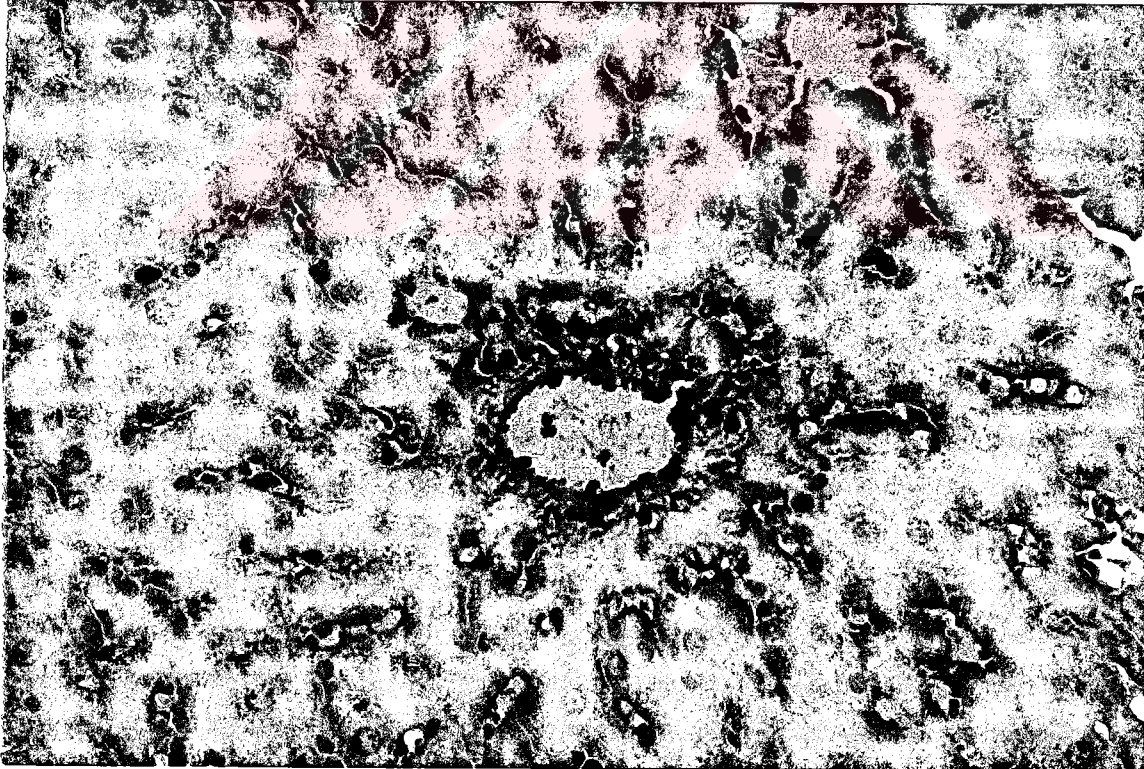
Resim 22: *Grup:4;* ½ saat sıcak, 9 saat soğuk iskemi, Ptx (-): Üç alanda perisantral nekroz mevcut olup, sinüzoidal kıvrılmalar, konjesyon, yaygın nötrofil infiltrasyonu ve karaciğer parenkim yapısında bozulma söz konusu.



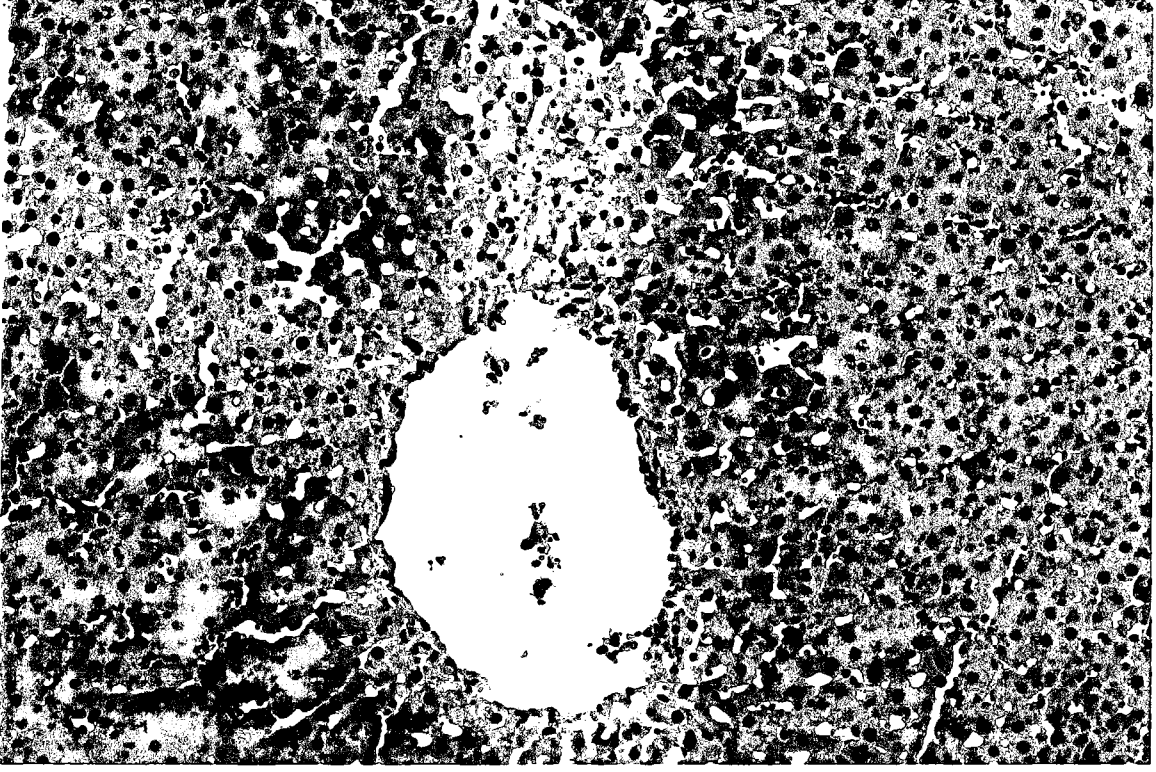
Resim 23: *Grup:8;* ½ saat sıcak, 9 saat soğuk iskemi, Ptx (+): Karaciğer parenkim yapısı oldukça iyi korunmuş, belirgin nekroz alanı yok. Sinüzoidler minimal konjesyone, kıvrımlaşma yok, yer yer nötrofil infiltrasyonu.



Resim 24: *Grup:5*; 1 saat sıcak, 1 saat soğuk iskemi, Ptx (-): Yaygın periportal nekroz ve duktuslarda proliferasyon. Sinüzoidler ileri derece konjesyone ve nötrofil infiltrasyonu mevcut.



Resim 25: *Grup:9*; 1 saat sıcak, 1 saat soğuk iskemi, Ptx (+): Bir alanda periportal nekroz mevcut. Sinüzoidler minimal konjesyone ve oldukça düzenli, minimal nötrofil infiltrasyonu mevcut, parenkim yapısı iyi korunmuş.



Resim 26: *Grup:6*; 1 saat sıcak, 9 saat soğuk iskemi, Ptx (-): Her alanda yaygın perisantral nekroz, ileri derecede sinüzoidal kıvrımlaşma, artmış nötrofil infiltrasyonu ve ileri derecede bozulmuş karaciğer parenkim yapısı.



Resim 27: *Grup:10*; 1 saat sıcak, 9 saat soğuk iskemi, Ptx (+): Bir alanda perisantral nekroz, sinüzoidlerde orta derecede konjesyone, yapısı düzenli. Minimal nötrofil infiltrasyonu ve iyice korunmuş karaciğer parenkim yapısı.

(Tablo 2). Pentoksifilin ve serum fizyolojik ile tedavi edilen gruplarda, değişik sıcak ve soğuk iskemi süreleri sonrasında saptanan greft hasarının histopatolojik olarak skorlanması

İskemi	Periportal Nekroz			Perisantral Nekroz		
	SF	Ptx	p	SF	Ptx	p
½ saat sıcak, 1 saat soğuk	2.0 ± 0.2	0.4 ± 0.2	P<0.001	2.3 ± 0.4	0.8 ± 0.2	P<0.002
½ saat sıcak, 9 saat soğuk	2.6 ± 0.4	1.1 ± 0.4	P<0.01	2.7 ± 0.4	1.3 ± 0.5	P<0.05
1 saat sıcak, 1 saat soğuk	2.8 ± 0.5	1.4 ± 0.5	P<0.01	3.2 ± 0.4	1.6 ± 0.5	P<0.01
1 saat sıcak, 9 saat soğuk	3.4 ± 0.3	1.8 ± 0.4	P<0.01	3.6 ± 0.2	2.0 ± 0.3	P<0.05

Reperfüzyon sonrası 6.saatte alınan karaciğer biyopsilerinin histopatolojik incelenmesi sonucunda yapılan semikantitatif skora analizi, pentoksifilin ile tedavi edilen tüm gruplarda periportal ve pericentral nekroz alanlarında istatistiksel anlamlı olarak azalma olduğunu göstermektedir. İstatistik analizleri, 'independent sample t-test' ile gerçekleştirilmiş olup, ortalama değerler standart sapmaları ile birlikte verilmiştir.

5. TARTIŞMA

Karaciğer transplantasyonunun başarılı sonuçlarına rağmen (5 yıllık sağ kalım %70-80), rejeksiyon, enfeksiyon, primer greft nonfonksiyonu (PNF) veya disfonksiyonu halen çözüm bekleyen ve önemli oranda mortalite veya morbiditeye neden olan klinik durumlardır (1,7,10).

Tüm organ transplantasyonları için geçerli olmak üzere, karaciğer transplantasyonunda da donör yetersizliği çok önemli bir problemdir. Günümüzde büyük merkezlerde bile gerçek ihtiyacın sadece %50'si karşılanabilmekte (Türkiye'de bu oran %3'ün altındadır) ve bekleme listesindeki hastaların %10-30'u nakil olmadan kaybedilmektedir. Marjinal donörlerin, optimum işlevsellik düzeyinde kullanımıyla, donör havuzu genişletirilerek soruna kısmi çözüm getirilebilir (24). Steatotik, yaşlı donörlerden (65 yaş üzeri) ve özellikle kalp atımı olmayan donörlerden (non-heart beating donor, NHBD) elde edilen greftler buna örnektir (22-28). Günümüzde, kalp atımı olmayan donörlerden alınan böbrek greftlerinin çeşitli premedikasyonlar sayesinde optimale yakın işlevselliğinin temin edilebilmesinden sonra, aynı objektif içerisinde kalp atımı olmayan donörlerden alınabilecek karaciğer greftlerinin de çeşitli tedavilerle, yaşamsallığını yitirmeden transplante edilebilmesi konsepti gündeme gelmiştir (28). Bununla beraber, 30-60 dakikaya kadar çıkan sıcak iskemiye maruz kalabilen greftlerin, 8-10 saatlik soğuk iskemi sonrası transplante edilebilecekleri düşünülürse meydana gelecek İRH ve PNF veya primer greft disfonksiyonunu azaltmak için önlemler alınması gerekecektir. İRH'na yol açan mekanizmaların daha iyi anlaşılmasından sonra, bu hasarın engellenmesine veya azaltılmasına yönelik çalışmalar gün geçtikçe artmakta ve bu hasarı azalttığı öne sürülen birçok farmakolojik ajan eksperimental çalışmalarda denenmektedir. Suboptimal veya marjinal olarak kabul edilen donörlerin, eksplantasyon öncesinde, İRH'nı önlediği in vitro olarak gösterilmiş olan çeşitli ajanlarla tedavisi, 'Society of Organ Sharing'in 1993 yılında Vancouver'de yaptığı toplantıda ilk kez yeni bir konsept olarak ortaya atılmıştır.

Günümüzde, bu konuda yapılan araştırmalar henüz deneysel düzeydedir ve klinik uygulamalar ise az sayıdaki serilerden ibarettir. Xu ve ark. yaptığı bir çalışmada, donör sıçanların preoperatif dönemde 'lazaroid' ile tedavi edilmesiyle, 60,100 ve 120 dakikalık kardiyak arrest süreleri (sıcak iskemi) sonrasında transplante edilen (1 saatlik

soğuk iskemik süreç sonrasında) alıcı sıçanlarda 3 günlük sağ kalım oranlarının ve serum transaminaz düzeylerinin belirgin olarak iyileştiğini göstermişlerdir (23).

Yapılan çalışmalarda, sıçanlarda deneysel karaciğer transplantasyon modelinde, uzun prezervasyon sürelerinden sonra Ptx tedavisinin soğuk İRH'nı önemli oranda azaltarak, greft kaybını ve alıcı mortalitesini anlamlı bir şekilde düşürdüğü gösterilmiştir (61,62,67,68,69,70,71). Yine donör ve/veya alıcıların kalsiyum kanal blokörleri, prostoglandin, ve benzeri ajanlarla tedavisi ile benzer sonuçlar alınmıştır (31,32,30,38,53). Deneysel hepatik normotermik iskemi-reperfüzyon modellerinde ise Ptx'in yanısıra süperoksit dismutaz, allopürinol, alfa-tokoferol, mannitol, dopamin, prostoglandin, aktive karbon hemoperfüzyonu, glucagon, klorpromazin, aprotinin, metil prednizolon, deferoksamin, siklosporin, katalaz, aspartik asit, ubiquinon, dibenzyline, ATP, verapamil, nifedipin, tirilazad mesylate gibi ajanların İRH'nı azalttığı saptanmıştır (30-54).

Bu çalışmamızda, sıçanlarda deneysel karaciğer nakli modelinde, kalp atımı olmayan donörlerden (1/2 saat ve 1 saatlik sıcak iskemi) alınan karaciğer greftlerini, 1 ila 9 saatlik soğuk iskemik prezervasyon sonrasında transplante ederek, hem uzun süreli (1 saat) sıcak iskemik hasarın (NHBD koşullarına uygun), hemde uzun süreli soğuk iskemik hasarın klinik modele uygun olarak birarada olduğu deneysel bir model oluşturduk. Geniş literatür araştırmasının sonucunda, böyle bir çalışmanın ilk kez yapıldığı söylenebilir.

Sağ kalım analizlerine bakıldığında, donör ve alıcı sıçanların Ptx ile tedavisi, çalışmamızda alıcı sağ kalım oranlarını anlamlı bir şekilde iyileştirmiştir. SF verilen sıcak ve soğuk iskemi gruplarında (Grup 3,4,5,6), sağ kalım oranı global olarak 13/40 (%32.5) iken, Ptx ile tedavi edilen gruplarda (Grup 7,8,9,10) ise bu oran 33/40'a (%82.5) yükselmiştir. Bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.00001$). Aynı soğuk ve sıcak iskemi süreli, Ptx verilen ve verilmeyen grupların sağ kalım oranları karşılaştırıldığında, 1/2 saatlik sıcak + 1 saatlik soğuk iskemi (Gr 3 vs 7) sonrasında yapılan transplantasyonlarda, Ptx tedavisi sağ kalımı, %60'tan %100'e ($p=0.043$), 1/2 saat sıcak + 9 saat soğuk iskemi (Gr 4 vs 8) sonrasında yapılan transplantasyonlarda ise, %40'dan %90'a ($p=0.03$) çıkarmıştır. 1 saatlik sıcak iskemi sonrasında ise, Ptx tedavisi, sağ kalım oranlarını, soğuk iskemik süreç 1 saat iken (Gr 5 vs 9) %30'dan %80'e ($p=0.069$), 9 saat iken (Gr 6 vs 10) ise %0'dan %60'a ($p=0.005$) yükseltmiştir.

Aynı kısa (1/2 saat) ve uzun (1 saat) sıcak iskemiye, fakat farklı soğuk iskemilere (1 ve 9 saat) maruz kalan greftlerin alıcıları, Ptx ile tedavi edildiğinde, (Grup

3,4 vs 7,8) ve (Grup 5,6 vs 9,10) kümülatif sağ kalım oranları sırasıyla 10/20'den (%50) 19/20'ye (%95) ($p=0.003$) ve 3/20'den (%15) 14/20'ye (%70) ($p=0.001$) yükselmektedir. Burada sağ kalım, Ptx tedavisi ile sırasıyla %45 ve %55 oranlarında iyileşmiştir.

Buna ek olarak, aynı kısa (1 saat) ve uzun (9 saat) soğuk iskemiye, fakat farklı sıcak iskemilere tabi tutulan greft alıcılarına Ptx verildiğinde, (Grup 3,5 vs 7,9) ve (Grup 4,6 vs 8,10) kümülatif sağ kalım oranları sırasıyla 9/20'den (%45) 18/20'ye (%90) ($p=0.005$) ve 4/20'den (%20) 15/20'ye (%75) ($p=0.001$) yükselmektedir. Bu gruplarda da sağ kalım oranları Ptx tedavisiyle, sırasıyla %45 ve %55 oranlarında artmıştır. Görülüyor ki, Ptx tedavisi hem kısa, hem uzun süreli sıcak ve soğuk iskemide sağ kalım oranlarını eşit olarak arttırmıştır. Buradan, Ptx'nin sıcak ve soğuk iskemik hasara aynı oranlarda etki ettiği düşünülebilir.

Serum SGOT, SGPT ve LDH değerleri incelendiğinde, sıcak ve soğuk iskemiye maruz bırakılan tüm karaciğer greftlerinde (Gr 3-10), değerlerin post-transplant dönemde bakılan tüm zaman aralıklarında (reperfüzyon sonrası 1. saat, 1. gün ve 1. hafta), aynı soğuk iskemi süreli (sıcak iskemisiz) kontrol gruplarına (Gr 1,2) oranla, yükseldiği görüldü. Bu yükselmenin, SF verilen tüm sıcak ve soğuk iskemi grupları (Gr 3,4,5,6) ile Ptx verilen uzun süreli (1 saat) sıcak iskemi (Gr 9,10) gruplarında istatistiksel anlamlı olduğu, ancak Ptx verilen kısa süreli (1/2 saat) sıcak iskemi gruplarında (Gr 7,8) istatistiksel anlamlı olmadığı saptandı.

Ptx verilen gruplarda (Gr 7,8,9,10), SF verilere (Gr 3,4,5,6) oranla, serum enzim değerleri, tüm zaman aralıklarında (reperfüzyon sonrası 1. saat, 1. gün ve 1. hafta), istatistiksel anlamlı olarak düşmüş olup, sadece, 1 saat sıcak + 1 saat soğuk iskemili grupta (Gr 9), 24'üncü saate bakılan LDH değerlerinde belirgin düşme olmasına rağmen, bu düşüş istatistiksel anlamlı bulunmamıştır.

Özellikle Ptx verilen kısa süreli (1/2 saat) sıcak iskemi gruplarında (Gr 7 ve 8), SF verilenlere (Gr 3,4) oranla, tüm zaman aralıklarında (reperfüzyon sonrası 1. saat, 1. gün ve 1. hafta) serum SGOT, SGPT ve LDH değerleri istatistiksel anlamlı olarak düşmüştür. Bu düşük değerler, kontrol grubu değerlerinin üzerinde olmasına rağmen, aradaki fark istatistiksel anlamlı değildir. Oysa, serum SGOT, SGPT ve LDH değerleri Ptx verilen uzun süreli (1 saat) sıcak iskemi gruplarında (Gr 9 ve 10), SF verilenlere (Gr 5,6) oranla, tüm zaman aralıklarında (reperfüzyon sonrası 1. saat, 1. gün ve 1. hafta) istatistiksel anlamlı olarak düşmesine rağmen, bu düşük değerler, kontrol grubu değerlerinin üzerinin istatistiksel anlamlı olarak üzerindedir. Bir başka deyişle, Ptx

tedavisi tüm sıcak ve soğuk iskemi gruplarında ve tüm zaman aralıklarında enzim artışını anlamlı bir şekilde düşürürken, 1 saat sıcak iskemiyeye maruz kalan gruplarda değerler, daha az oranda düşmekte ve sıcak iskemisiz kontrol gruplarına oranla, istatistiksel anlamlı bir şekilde yüksek kalmaktadır. Sonuç olarak bu biyokimyasal parametreler temelinde değerlendirildiğinde, Ptx'nin, kısa süreli (½ saat) sıcak iskemide, 1 saate oranla, İRH'na karşı koruyucu etkisinin daha belirgin olduğu görülmektedir .

Reperfüzyon sonrası 6 saatte alınan karaciğer biyopsilerinin histopatolojik incelenmesinde, Ptx verilen sıcak ve soğuk iskemili gruplar (Gr 7,8,9,10), SF verilenlerle (3,4,5,6) karşılaştırıldığında, gerek periportal, gerek perisantral nekroz alanlarında semikantitatif skorlamaya göre istatistiksel anlamlı bir biçimde azalma saptanmıştır. Bunlara ek olarak, sinüzoidal düzensizlik, konjesyon, nötrofil akümülyasyonunda da Ptx verilen gruplarda, SF verilenlere oranla, belirgin azalma elde edilmiş olup, karaciğerin histolojik arkitektürü korunmuştur.

Hispatolojik skorlama ve sağ kalım analizleri birlikte değerlendirildiğinde, arada yüksek oranda korrelasyon olduğu dikkati çekmektedir. Sağ kalım oranları birbirine yakın olan gruplara bakıldığında, bu grupların histolojik skorlamalarının da birbirine oldukça benzer olduğunu görmekteyiz. Örnek olarak, SF verilen ½ saat sıcak + 1 saat soğuk iskemi grubu (Gr 3) ile Ptx verilen 1 saat sıcak + 9 saat soğuk iskemi grubunun (Gr 10) sağ kalım oranları aynıdır (6/10). Bu iki grubun histolojik skorlamalarına bakıldığında, SF verilen ½ saat sıcak + 1 saat soğuk iskemi grubunun (Gr 3) histolojik skorlaması periportal nekroz alanlarında +2.0, perisantral nekroz alanlarında +2.3 iken, Ptx verilen 1 saat sıcak + 9 saat soğuk iskemi grubunun (Gr 10) histolojik skoru sırasıyla +1.8 ve +2.0 olup, değerler birbirine oldukça yakındır ve sağ kalım oranları ile yüksek oranda korrelasyon göstermektedir. Sağ kalım oranları birbirine çok yakın olan diğer grupların da histolojik skorlamalarına bakıldığında, semikantitatif olarak ifade edilen histolojik hasarların birbirine çok benzer olduğu görülecektir.

Çalışmamızda, Ptx verilen tüm sıcak ve soğuk iskemi gruplarında (Gr 7,8,9,10), sıcak iskemi sonrasında, karaciğer greftlerinin, SF verilen gruplara (3,4,5,6) oranla daha homojen olarak perfüze olduğunu gözlemledik. Keza, SF verilen sıcak ve soğuk iskemi gruplarında, greftler portal deklempej sonrası homojen olarak reperfüze olmamış, 'patchy' (yamalı) karaciğer görünümü uzunca bir süre devam etmiş ve safra akımı geç başlamıştır. Buna karşılık, Ptx ile tedavi edilen gruplarda, karaciğer greftleri portal

deklempej sonrasında belirgin oranda daha iyi ve homojen bir şekilde reperfüze olmuş ve bu gruplarda karaciğerden safra akımı hemen başlamıştır.

Ptx ile tedavi edilen gruplarda, greftlerin homojen bir biçimde perfüze olmasını, Ptx'in mikrosirkülasyon düzenleyici, vazodilatatör ve eritrosit deformabilitesini artırıcı etkilerinin sonucu olduğunu düşünmekteyiz. Yapılan çalışmalarda, hemorajik şok resüsitasyonu sırasında Ptx tedavisinin kan viskozitesini ve vazokonstrüksiyonu azaltıp, karaciğer kan akımını arttırarak, karaciğer viabilitesinin korunmasında önemli rol oynadığı saptanmıştır (63,65). Bunun yanısıra, Ptx'in mikrovasküler kan akımını, eritrosit deformabilitesini ve fibrinolizisi arttırdığı, prostoglandin I₂ ve E₂ salınımını stimüle ettiği, lökosit adhezyonunu, intersellüler adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu ve vazokonstrüksiyonu önlediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (61,62,67,68,69,70,71). Bu veriler ışığında, Ptx'in, reperfüzyon ile birlikte mikrosirkülasyonu bozuk olan dokulara kan akımını selektif olarak yönelttiği ve iskemik alanlarda oksijen basıncının artmasına yol açtığı söylenebilir. Ptx'in bu etkileri deneysel myokard enfarktüs ve intestinal iskemi modellerinde de ortaya konmuştur (64-71).

Kupffer hücre aktivasyonu, karaciğerde gerek sıcak, gerekse soğuk iskemi sonrası gelişen reperfüzyon hasarının en önemli nedenlerinden biridir (67,79). Ptx'in hepatoprotektif etkisinde Kupffer hücrelerini stabilizatörü özelliğide önemli rol oynamaktadır. Reperfüzyon ile birlikte, sitokinler ve toksik metabolitler enflamasyonu arttırarak, greft mikrosirkülasyonunu bozmakta; greft kaybı, ARDS ve sonunda çoğul organ yetmezliği tablosu gelişebilmektedir. Oysa Ptx, Kupffer hücrelerinden başta TNF α olmak üzere, IL1, IL6 ve diğer sitokinlerin ve toksik mediatörlerin (SOR, proteazlar, eikozanoidler, vs...) salınımını önleyerek İRH'nın akut enflamasyon dönemini kontrol edebilmektedir (61-71).

Sıçan modelinde, yapılan çalışmalarda normotermik hepatik İ/R'unun, akciğerde, interstitiel kalınlaşma ve lökosit infiltrasyonu ile karakterize histopatolojik değişikliklere yol açtığını gösterilmiştir (101,102). Bu değişikliklerin, Kupffer hücrelerince tutulamayan endotoksine bağlı geliştiği düşünülmektedir. İRH'na uğramış karaciğerde, Kupffer hücreleri aktive olmakla beraber, endoksini tutma kapasiteleri azalır. İ/R ile birlikte, artan endotoksinin karaciğerde nötralize edilemeyen kısmı, akciğer makrofajlarınca tutulur ve bu olay, akciğerde proteinlere karşı mikrovasküler permeabilite artışı ile giden ve ARDS olarak tanımlanan klinik duruma yol açar (101).

Benzer pulmoner değişikliklerin uzun soğuk iskemi süreleri (greft viabilitesinin yitildiği) ardından gerçekleştirilen deneysel karaciğer nakillerinden sonra geliştiiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Nisoldipin (dihidropridin kalsiyum kanal blokörü) içeren solüsyonlarda saklanan karaciğer greftlerinde, transplantasyon sonrasında akciğer hasarının önemli ölçüde azaldığı ve bunun nisoldipinin lipopolisakkarite (LPS) bağlı TNF salınımını suprese edici etkisi nedeniyle olduğu bildirilmektedir. Ptx'inin de LPS'e bağlı TNF salınımını suprese edici etkisi olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (61).

Ptx, tüm bu özellikleri ile (mikrosirkülasyon düzenleyici, vazodilatatör, eritrosit deformabilitesini arttırıcı, Kupffer hücre stabilizasyonu, fibrinolitik aktiviteyi arttırıcı vb...) alışmamızda uzun ve kısa süreli, sıcak ve soğuk iskemili (birlikte) karaciğer greftlerinin reperfüzyon, fonksiyon ve sağ kalımlarını iyileştirmiştir .



6. SONUÇ

Sıcak ve soğuk iskemili karaciğer greftlerinin naklinde, donör ve alıcıların pentoksifilin ile tedavisi:

- 1- Reperfüzyon sonrası (1. saat, 1. gün ve 1. hafta) SGOT, SGPT ve LDH değerlerini, Ptx verilmeyen (yerine SF verilen) donör ve alıcıların aynı zaman aralıklarındaki SGOT, SGPT ve LDH değerlerine göre istatistiksel anlamlı bir şekilde düşürerek, greft kalitesini iyileştirmiştir.
- 2- Reperfüzyon sonrası 6. saatte alınan karaciğer biyopsilerinin histopatolojik incelemesi sonucunda, periportal ve perisantral nekrozu, Ptx verilmeyen (yerine SF verilen) donör ve alıcıların aynı zamanda alınan karaciğer biyopsileri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel anlamlı olarak azaltarak, greftin histolojik arkitektürünü optimum olarak korumuştur.
- 3- Alıcı sağ kalım oranlarını (7 gün) istatistiksel anlamlı olarak iyileştirmiştir.



7. ÖZET

Son yıllarda karaciğer transplantasyonu, son dönem karaciğer yetmezlikli hastaların tedavisinde geçerli bir tedavi yöntemi olarak kabul edilmiştir. Günümüzde KT'nun giderek iyileşen sonuçları, organ talebini arttırmakta ve bulunabilen greftler bu talebi karşılamakta daha da yetersiz kalmaktadır. Greft sayısının, gereksinimin çok altında olması, daha önceden reddedilen marjinal greftlerin, (yaşlı donör, steatotik, harvest öncesi veya sırasında kardiyak arrest nedeniyle sıcak iskemiye maruz kalmış, boyut uyumsuzluğu olan) mortalite ve morbidite riskini bazı medikal, teknik ve farmakolojik yöntemlerle azaltarak, kullanımını zorlamaktadır. Günümüzde, özellikle kültürel ya da alt yapı sorunları nedeniyle donör sıkıntısı çeken ülkelerde, donör havuzunun genişletilmesi amacıyla, kalp atımı olmayan (non-heart-beating) donörlerden sağlanacak karaciğer greftleri, transplantasyon için ek bir potansiyel kaynak olarak düşünülmeye başlanmıştır. Pentoksifilin (Ptx), genellikle periferik vasküler hastalıkların sağaltımında kullanılan bir metilksantin derivativesidir. Bu farmakolojik ajanın, eritrosit deformabilitesini artırıp, kan viskozitesini azaltarak ve mikrovasküler yatakta vazodilatasyona yol açarak, değişik organlarda İ/R sonrası iskemik alanlara kanın selektif olarak redistribüsyonunu düzenlediği, ayrıca, Kupffer hücre stabilizatörü olarak, bu hücrelerden İ/R sonrası 'tumor necrosis factor' (TNF), interlökin 1 ve 6 (İL 1 ve 6) salınımını azalttığı bildirilmektedir. Bu çalışmamızda, sıçanlarda deneysel karaciğer nakli modelinde, kalp atımı olmayan donörlerden (1/2 saat ve 1 saatlik sıcak iskemi) alınan karaciğer greftlerini, 1 ila 9 saatlik soğuk iskemik prezervasyon sonrasında transplante ederek, hem uzun süreli (1 saat) sıcak iskemik hasarın (NHBD koşullarına uygun), hemde uzun süreli soğuk iskemik hasarın klinik modele uygun olarak birarada olduğu deneysel bir model oluşturduk. Ptx'in hem sıcak, hem de soğuk İRH'nı iyileştirici özelliği olduğunu düşünerek, donör ve alıcıyı Ptx ile tedavi edip, bu ajanın, post-transplant dönemde hepatosit ve sinuzoidal hücre (endotel + Kupffer hücreleri) canlılığını korumadaki rolünü, dolayısıyla greft ve alıcı sağ kalımına etkisini, histolojik ve biyokimyasal kriterlerin temelinde göstermeyi amaçladık. Ptx, çalışmamızda uzun ve kısa süreli, sıcak ve soğuk iskemili (birlikte) karaciğer greftlerinin reperfüzyon, fonksiyon ve sağ kalımlarını iyileştirmiştir

8. KAYNAKLAR

1. Van Thiel DH. Liver transplantation. A history of the past and present with a vision of the future. In: Transplantation of the Liver. Edited by Maddrey WC and Sorrell MF. East Norwalk, Connecticut, Appleton & Lange 1995; pp: 1-13.
2. Trevisani F, Colantoni A, Caraceni P, et al. The use of donor fatty liver for liver transplantation: a challenge or a quagmire? *Journal of Hepatology* 1996; 24: 114-121.
3. Alexander JW, Zola JC. Expanding the donor pool: use of marginal donor for solid organ transplantation. *Clin Transplantation* 1996;10: 1-9.
4. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988; 45: 673-676.
5. Kalayoğlu M, Hoffman RM, D'Allessandro AM, et al. Clinical results in liver transplantation using UW solution for extended preservation. *Transplant Proc* 1989;21: 3487-3488.
6. Momii S, Koga A. Time-related morphological changes in cold-stored rat livers: a comparison of Euro-Collins solution with UW solution. *Transplantation* 1990; 50: 745-749.
7. Lemasters JJ, Bunzendahl H, Thurman RG. Reperfusion injury to donor livers stored for transplantation. *Liver transplantation and Surgery* 1995; 1:2: 124-138.
8. Furukawa H, Todo S, Imventarza O, et al. Effect of cold ischemia time on the early outcome of human hepatic allografts preserved with UW solution. *Transplantation* 1991; 51: 1000-1004.
9. D'Allessandro AM, Kalayoğlu M, Solinger HW, et al. The predictive value of donor liver biopsies on the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1991; 51:1: 157-163.
10. Clavian PA, Harvey PRC, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts: An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992; 5: 957-978.
11. Ploeg RJ, D'Allessandro AM, Knechtle SJ, et al. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation: A multivariate analysis. *Transplantation* 1993; 55. 807-813.

12. Goode HF, Webster NR, Howdle PD, et al. Reperfusion injury, antioxidants and hemodynamics during orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1994;19:2: 354-359.
13. Marzi I, Zhong Z, Zimmerman FA, et al. Xanthine and hypoxanthine accumulation during storage may contribute reperfusion injury following liver transplantation in the rat. *Transplant Proc* 1989; 21: 1319-1320.
14. Gao W, Takei Y, Marzi I, et al. Caroline Rinse solution increases survival time dramatically after orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplant Proc* 1991; 23: (part1): 648-650.
15. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surgical Clinics of North America* 1992; 72:1: 65-83.
16. Ambrosio G, Becker LC, Hutchins GM. Reduction in experimental infarct size by recombinant human superoxide dismutase: insights into the pathophysiology of reperfusion injury. *Circulation* 1986; 74:6. 1424-1433.
17. Ambrosio G, Weisfeldt ML, Jacobus WE. Evidence for a reversible oxygen-radical mediated component of reperfusion injury: reduction by recombinant human superoxide dismutase administered at the time of reflow. *Circulation* 1987; 75:1: 282-291.
18. Arthur MJP, Bentley IS, Tamer AR, et al. Oxygen-derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology* 1985; 89: 1114-1122.
19. Atalla SL, Toledo-Pareyra LH, Mac Kenzie et al. Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers. *Transplantation* 1985; 40:6: 584-589.
20. Cheung JY, Bonventre JV, Malis CD, et al. Calcium and ischemic injury. *N Eng J Med* 1986; 314:26: 1670-1676.
21. Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, et al. Pathophysiology of ischemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991; 78: 651-655.
22. Kim YI, Koyabashi M, Akizuki S, et al. Beneficial effect of stable prostacyclin analog (OP-2507) on pig livers harvested from non heart-beating pigs. *Transplant Proc* 1993; 25: 2955-2958.
23. Xu HS, Stevenson WC, Pruett TL, et al. Donor lazardol pretreatment improves viability of livers harvested from non heart-beating rats. *Am J Surg* 1996; 171: 113-117.

24. Mor E, Klintmalm GB, Gonwa TA, et al. The use of marginal donors for liver transplantation: a retrospective study of 365 liver donors. *Transplantation* 1992; 53:2: 383-386.
25. Rapaport FT. Progress in organ procurement: the non heart-beating cadaver donor and other issues in transplantation. *Transplant Proc* 1991; 23: 2699-2701.
26. Hoshino T, Koyama I, Nagashima N, et al. Liver transplantation from non heart-beating donors by core cooling technique. *Transplant Proc* 1989; 21: 1206-1208.
27. Yanaga K, Kakizoe S, Ikeda T, et al. Procurement of liver allografts from non heart-beating donors. *Transplant Proc* 1990; 22: 275-278.
28. D'Allessandro AM, Hoffmann RM, Knechtle SJ, et al. Controlled non heart-beating donors: a potential source of extrarenal organs. *Transplant Proc* 1995; 27: 707-709.
29. Casaville A, Ramirez C, Shapiro R, et al. Liver and kidney transplantation from non heart-beating donors: Pittsburgh experience. *Transplant Proc* 1995; 27: 710-712.
30. Ware F, Goto S, Kamada N, et al. Effect of a prolonged anhepatic phase and PGE1 on intraoperative hemodynamic changes and graft survival in rat liver transplantation. *Transplant Proc* 1994; 26:4: 2265.
31. Marzi I, Walcher F, Bühren V. Improvement of liver preservation by the calcium channel blocker nisoldipine. An experimental study applying intravital microscopy to transplanted rat livers. *Transplant Int* 1992;5:(suppl 1): S395-S397.
32. Savier E, Shedlofsky SI, Swim AT, et al. The calcium channel blocker nisoldipine minimizes the release of tumor necrosis factor and interleukin-6 following rat liver transplantation. *Transplant Int* 1992;5:(suppl 1): S398-S402.
33. Marteau P, Ballet F, Chazouilleres O, et al. Effect of vasodilators on hepatic microcirculation in cirrhosis: a study in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 1989; 9:6: 820-823.
34. Sikujara O, Monden M, Toyoshima K, et al. Cytoprotective effect of prostaglandin I₂ on ischemia-induced hepatic cell injury. *Transplantation* 1983;36:3: 238-243.
35. Marubayashi S, Dohi K, Ochi K, et al. Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: prevention of damage by α -tocopherol administration. *Surgery* 1986;99:2: 184-191.
36. Cicalase L, Lee K, Schraut W, et al. Pyruvate prevents ischemia-reperfusion injury of rat small intestine. *Am J Surg* 1996; 171: 97-101.

37. Marubayashi S, Dohi K, Ezaki H, et al. Preservation of ischemic liver cell-prevention of damage by coenzyme Q₁₀. *Transplant Proc* 1983;15:1: 1297-1299.
38. Hardy KJ, Tancheroen S, Shulkes A. Hepatic ischemia-reperfusion injury modification during liver surgery in rats: pretreatment with nifedipine or misoprostol. *Liver Transplantation and Surgery* 1995; 1:5: 302-310.
39. Nishiyama R, Nakamura S, Suzuki S, et al. Platelet-activating factor in hepatic ischemia-reperfusion injury. The effects of PAF antagonist combined with a prostaglandin I₂ analogue. *Transplantation* 1993; 55:6: 1261-1265.
40. Prasad K, Kalra J, Buchko G. Acute hemorrhage and oxygen free radicals. *J Vasc Dis* 1988; 39:12: 1005-1013.
41. Hasselgren PO, Biber B, Fornander J. Improved blood flow and protein synthesis in the postischemic liver following infusion of dopamine. *J Surg Res* 1983; 34: 44-52.
42. Skibba J, Powers RH, Stadnicka A, et al. The effect of hyperthermia on conversion of hepatic xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *Biochemical Pharmacology* 1988; 37:23: 4592-4595.
43. Toledo-Pereyra LH. Role of activated carbon hemoperfusion in the recovery of livers exposed to ischemic damage. *Arch Surg* 1985; 120: 462-465.
44. Stewart JR, Backwell WH, Stephen LC, et al. Inhibition of surgically induced ischemia-reperfusion injury by oxygen free radical scavengers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983; 86: 262-272.
45. Hasselgren PO. Prevention and treatment of ischemia of the liver. *Surg Gynecol Obstet* 1987; 164: 187-196.
46. Marayubashi S, Dohi K, Ezaki H, et al. Preservation of ischemic rat liver mitochondrial functions and liver viability by CoQ₁₀. *Surgery* 1982; 91:6: 631-637.
47. Rao PN, Walsh TR, Makowka L, et al. Inhibition of free radical generation and improved survival by protection of the hepatic microvascular endothelium by targeted erythrocytes in orthotopic rat liver transplantation. *Transplantation* 1990; 49:6: 1055-1059.
48. Nordström G, Winsö O, Biber B, et al. Influence of pentobarbital and chloralose on metabolic and hemodynamic changes in liver ischemia. *Ann Surg* 1989; 212:1: 23-29.
49. Hayashi T, Nagasue N, Kohno H, et al. Beneficial effect of cyclosporine pretreatment in preventing ischemic damage to the liver in dogs. *Transplantation* 1988; 46:6: 923-924.

50. Fornander J, Hellman A, Hasselgren PO. Effect of methylprednisolone on protein synthesis and blood flow in the postischemic liver. *Circulatory Shock* 1984;12: 287-295.
51. Chien KR, Abrams J, Pfau RG, et al. Prevention by chlorpromazine of ischemic liver cell death. *Am J Pathol* 1977; 88:3: 539-553.
52. Clemens MG, Mc Donagh PF, Chaudry IH, et al. Hepatic microcirculatory failure after ischemia-reperfusion: improvement with ATP-MgCl₂ treatment. *Am J Physiol* 1985: 248. H804-H811.
53. Crafa F, Gugenheim J, Canavel C, et al. Protective effects of prostaglandin E₁ on normothermic liver ischemia. *Eur Surg Res* 1991; 23: 278-284.
54. Morgan Gr, Harvey RC, Strasberg Sm, et al. Aprotinin for the pretreatment of the liver allograft donors. *Transplantation* 1990; 49:6. 1203-1204.
55. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986; 250: G749-753.
56. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemi-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255: H1269-1275.
57. Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury. *Crit Care Med* 1988; 16: 947-53.
58. Thornton MA, Winn R, Alpers CE, et al. An evaluation of the neutrophil as a mediator *in vivo* renal ischemic reperfusion injury. *Am J Pathol* 1989; 135: 509-515.
59. Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, et al. Role of neutrophils in ischemia reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol* 1987; 253: H699-H703.
60. Vedder NB, Fouty BW, Winn RK, et al. Role of neutrophils in generalized reperfusion injury associated from resuscitation from shock. *Surgery* 1989; 106. 509-516.
61. Peng XX, Currin RT, Thurman RG, et al. Protection by pentoxifylline against normothermic liver ischemia-reperfusion in rats. *Transplantation* 1995; 59:11: 1537-1541.
62. Adams JG, Dhar A, Shivendra DS, et al. Effect of pentoxifylline on tissue injury and platelet-activating factor production during ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg* 1995; 21: 742-749.
63. Wang P, Ba ZF, Zhou M, et al. Pentoxifylline restores cardiac output and tissue perfusion after trauma-hemorrhage and decreases susceptibility to sepsis. *Surgery* 1993; 114:2: 352-359.

64. Zabel P, Wolter DT, Schönharting MM, et al. Oxpentoxifylline in endotoxaemia. *Lancet* 1989;23:30: 1474-1477.
65. Wang P, Ba ZF, Morrison MH, et al. Mechanism of the beneficial effects of pentoxifylline on hepatocellular function after trauma hemorrhage and resuscitation. *Surgery* 1992;112:2: 451-458.
66. Tilg H, Eibl B, Pichl M, et al. Immune response modulation by pentoxifylline in vitro. *Transplantation* 1993; 56:1: 196-201.
67. Kozaki K, Egawa H, Bermudes L, et al. Pentoxifylline inhibits production of superoxide anion and tumor necrosis factor by Kupffer cells in rat liver preservation. *Transplant Proc* 1993; 25:6: 3025-3026.
68. Kozaki K, Egawa H, Bermudes L, et al. Effect of pentoxifylline pretreatment on Kupffer cells in rat liver transplantation. *Hepatology* 1995; 21:4: 1079-1082.
69. Bachmann S, Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, et al. Protection by pentoxifylline against graft failure from storage injury after orthotopic rat liver transplantation with arterialization. *Transplant Int* 1992;5: (suppl 1): S345-S350.
70. Bachmann S, Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, et al. Ultrastructural correlates of liver graft failure from storage injury: studies of graft protection by Caroine Rinse solution and pentoxifylline. *Transplant Proc* 1993; 25:1: 1620-1624.
71. Fabia R, Travis DL, Levy MF, et al. Effect of pentoxifylline on hepatic ischemia and reperfusion injury. *Surgey* 1997; 121:5: 520-525.
72. Granger DN, Benoit JN, Suzuki M, et al. Leucocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1988; 255: H269-H275.
73. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL; et al. Reduction of the extend of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 1983; 67: 1016-1023.
74. Granger DN, Rutili G, Mc Cord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981; 81: 22-29.
75. Klausner JM, Paterson IS, Valeri CR, et al. Limb ischemia-induced increased in permeability is mediated by leucocytes and leukotrienes. *Ann Surg* 1988; 208: 755-760.
76. Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD, et al. Role of leucocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J Physiol* 1986; 251: H314-H322.
77. Sorrentino D, Van Ness K, Ribeiro I, et al. Functional and morphological features of isolated hepatocytes preserved in UW solution. *Hepatology* 1991; 14: 331-336.

78. Kamiike W, Burdelski M, Steinhoff G, et al. Adenine nucleotide metabolism and its relation to organ viability in human liver transplantation. *Transplantation* 1988; 45: 138-143.
79. Currin RT, Reinstein LJ, Lichtman SN, et al. Inhibition of tumor necrosis factor release from cultured rat Kupffer cells by agents that reduce graft failure from storage injury. *Transplant Proc* 1993; 25:1: 1631-1632.
80. Lemasters JJ, Thurman RG. The many facets of reperfusion injury. *Gastroenterology* 1995; 108:4: 1317-1320.
81. Southard JH, van Gulik TM, Ametani MS, et al. Important components of UW solution. *Transplantation* 1990; 49: 251-254.
82. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201:8. 875-879.
83. Hinder RA, Stein HJ. Oxygen-derived free radicals. *Arch Surg* 1991; 126: 104-105.
84. Mc Cord JM. The super free radicals: its biochemistry and pathology. *Surgery* 1983; 94:3. 412-414.
85. Gores GJ, Nieminen AL, Fleishman KE, et al. Extracellular acidosis delays onset of cell death in ATP-depleted hepatocytes. *Am J Physiol* 1988; 255: C315-C322.
86. Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 1986; 253: H699-H704.
87. Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ. Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circ Res* 1990; 66: 1436-1444.
88. Nathan C, Srimal S, Farber c, et al. Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD 11/ CD 18 integrins. *J Cell Biol* 1989. 109: 1341-1349.
89. Vedder NB, Winn RK, Rice CL, et al. A monoclonal antibody to the adherence-promoting leucocyte glycoprotein, CD 18, reduces organ injury and improves survival from hemorrhagic shock and resuscitation in rabbits. *J Clin Invest* 1988; 81: 939-944.
90. Volpes R, Van den Oord JJ, Desmet VJ. Immunochemical study of adhesion molecules in liver inflammation. *Hepatology* 1990; 12: 59-68
91. Adams DH, Shaw J, Hubscher SG, et al. Intercellular adhesion molecule 1 in liver allograft during rejection. *Lancet* 1989; 2: 1122-1127.
92. Faull RJ, Russ GR. Tubular expression of intercellular adhesion molecule 1 during renal allograft rejection. *Transplantation* 1989; 48: 226-232.

93. Jutila MA, Berg El, Kishimoto TK, et al. Inflammation-induced endothelial cell adhesion to lymphocytes, neutrophils and monocytes. *Transplantation* 1989. 48: 727-732.
94. Springer TA. Adhesion molecule of the immune system. *Nature* 1990: 346: 425-429.
95. Dustin MI, Springer TA. Lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J cell Biol* 1988. 107: 321-327.
96. Belivacqua MP, Stengalin S, Gimbrone MA, et al. Endothelial adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 1989: 243: 1160-1164.
97. Geng JG, Belivacqua MP, Moore KL, et al. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP140. *Nature* 1990: 343: 757-761.
98. Thomas CE, Reed DJ. Current status of calcium in hepatocellular injury. *Hepatology* 1989: 10: 375-382.
99. Cheung T, Bonventre J, Malis C, et al. Calcium and ischemic injury. *N Eng J Med* 1986: 314: 1670-1674.
100. Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, et al. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion induced liver injury. *Ann Surg* 1991: 213: 137-143.
101. Azoulay D, Astarcioglu I, Lemoine A, et al. The effects of donor and recipient endotoxemia on TNF α production and mortality in the rat model of syngenic orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1995: 59:6:825-829.
102. Klausner JM, Anner H, Paterson IS, et al. Lower torso ischemia-induced lung injury is leucocyte dependent. *Ann Surg* 1988: 208: 761-767.
103. Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat. *Surgery* 1983: 93:1. 64-69.