

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

**RATLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL PRİNGLE
MANEVRASI SONRASI YAPILAN MAJOR (%70)
HEPATEKTOMİ MODELİNDE İNTRAPERİTONEAL
UYGULANAN TAKROLİMUSUN KARACİĞER
REJENERASYONUNA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

DR. EMRE KARADENİZ

UZMANLIK TEZİ

2017 İZMİR

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

**RATLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL PRİNGLE
MANEVRASI SONRASI YAPILAN MAJOR (%70)
HEPATEKTOMİ MODELİNDE İNTRAPERİTONEAL
UYGULANAN TAKROLİMUSUN KARACİĞER
REJENERASYONUNA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

DR. EMRE KARADENİZ

UZMANLIK TEZİ

YRD.DOÇ.DR. MÜCAHİT ÖZBİLGİN

TEŐEKKÖR

Çalışmam sırasında bilimsel katkıları ve yardımlarını esirgemeyen başta tez danışmanı hocam sayın Yrd.Doç.Dr. Mücahit Özbilgin'e ve sayın hocalarım Doç.Dr.Tarkan Ünek, Uzm.Dr.Tufan Egeli, Prof.Dr.Özgöl Sağol, Uzm.Dr.Anıl Ağalar, Prof.Dr.Hülya Ellidokuz'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık eğitimim boyunca yetişmemde büyük emeği olan, bilgi ve tecrübelerini bana aktaran genel cerrahi anabilim dalı başkanı hocam sayın Prof.Dr. İbrahim Astarcıoğlu, eğitim danışmanı hocam sayın Prof.Dr.Selman Sökmen ve diğer tüm saygıdeğer hocalarım ile çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dr.Emre Karadeniz

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	II
ŞEKİL LİSTESİ	II
RESİM LİSTESİ	III
GRAFİK LİSTESİ	III
KISALTMALAR.....	IV
ÖZET	V
SUMMARY.....	VI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1 KARACİĞER.....	1
1.2 KARACİĞER REJENERASYONU	2
1.3 %70 DENEYSEL HEPATEKTOMİ MODELİ	4
1.4 PRİNGLE MANEVRASI VE İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI.....	5
1.5 TAKROLİMUS (FK-506).....	6
2. GEREÇ VE YÖNTEM	8
2.1 DENEY HAYVANI VE BARINDIRMA KOŞULLARI	8
2.2 ANESTEZİ UYGULAMASI	8
2.3 HEPATİK REZEKSİYON YÖNTEMİ	8
2.4 DENEY GRUPLARI VE PROTOKOL	9
2.5 PATOLOJİK İNCELEME VE MİTOTİK İNDEKS TAYİNİ.....	14
2.6 AĞIRLIK İNDEKSİ TAYİNİ.....	18
2.7 İSTATİSTİKSEL ANALİZ	18
3. SONUÇLAR	19
3.1 MİTOTİK İNDEKS SONUÇLARI	20
3.2 AĞIRLIK İNDEKSİ SONUÇLARI.....	21
4. TARTIŞMA	22
5. KAYNAKLAR.....	26
6. EKLER.....	31

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Rat gruplarıyla ilişkili istatistiksel veriler	19
--	-----------

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Ratlarda %70 hepatektomi tekniği.....	4
Şekil 2. Pringle Manevrası	5
Şekil 3. Takrolimusun molekül yapısı	7
Şekil 4. Rat karaciğer loblarının ağırlık dağılımı.....	9



RESİM LİSTESİ

Resim 1. Anestezi verilmesi sonrası cerrahi sahanın temizlenmesi ve boyanması	10
Resim 2. Cerrahi sahanın örtülüp orta hat cilt insizyonunun yapılması	11
Resim 3. Ratın karnı açıldıktan sonra bilateral subkostal ekartasyon	11
Resim 4. Portal pedikülün diseksiyonu ve askıya alınması	12
Resim 5. Bulldog klemp kullanılarak Pringle Manevrası uygulanması	12
Resim 6. Sol lateral lob ve median lobların portal pediküllerinin askıya alınması	13
Resim 7. %70 hepatektomi ile çıkan spesmenler	13
Resim 8. Orta hat insizyonun kapatılması	14
Resim 9. Grup 1’de PHH3 immunhistokimyasında pozitif boyanan mitotik figürler.....	15
Resim 10. Grup 2’de PHH3 immunhistokimyasında pozitif boyanan mitotik figürler	16
Resim 11. Grup 3’de PHH3 immunhistokimyasında pozitif boyanan mitotik figürler.....	16
Resim 12. Grup 4’de PHH3 immunhistokimyasında pozitif boyanan mitotik figürler.....	17
Resim 13. Grup 5’de PHH3 immunhistokimyasında pozitif boyanan mitotik figürler.....	17

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1. Rat gruplarında saptanan mitotik indeksler	20
Grafik 2. Rat gruplarında saptanan ağırlık indeksleri	21

KISALTMALAR

AST: Aspartate aminotransferase

FK 506: Takrolimus

HGF: Hepatocyte growth factor

Hx: Hepatektomi

i.p.: İntraperitoneal

İR: İskemi reperfüzyon

LLL: Left lateral lob

ML: Median lob

NK: Natural killer

PHH3: Phosphohistone H3

PMNL: Polymorphonuclear leucocyte

TGF-β1: Transforming growth factor β1

TNF: Tümör nekrozis faktör

ÖZET

Giriş: Deneysel olarak oluşturulan karaciğer rezeksiyondan sonra rejenerasyonun başladığı bilinmektedir. Pringle Manevrası hepatektomi operasyonları sırasında kan kaybını azaltmak amacıyla uzun yıllardır kullanılmaktadır fakat bu uygulamanın karaciğer rejenerasyonu üzerinde potansiyel zararlı etkileri mevcuttur. Karaciğer transplantasyonu operasyonları sonrasında hastalar greft rejeksiyonunu önlemek amacıyla immünsüpresif tedaviler almaktadır. Bu immünsüpresif ilaçlar da karaciğer rejenerasyonu üzerinde farklı yan etkiler gösterebilmektedir.

Amaç: Çalışmamızda parsiyel hepatektomi yapılan ratlarda, takrolimusun Pringle Manevrası uygulandığı ve uygulanmadığı durumlardaki karaciğer rejenerasyonu üzerine olan etkilerini araştırdık.

Gereç-Yöntem: Bu çalışma ağırlıkları 200-300 gram arasında değişen 35 adet Wistar Albino türü erkek rat üzerinde gerçekleştirildi. Denekler, rasgele toplam beş gruba ayrıldı: Grup 1; batını açılıp başka bir işlem yapılmayanlar, Grup 2; 70% hepatektomi yapılanlar, Grup 3; 15 dakika Pringle Manevrası + 70% hepatektomi yapılanlar, Grup 4; 70 % hepatektomi + beş gün 1 mg/kg/gün i.p. takrolimus verilenler ve Grup 5; 15 dakika Pringle Manevrası + 70% hepatektomi + beş gün 1 mg/kg/gün i.p. takrolimus verilenler. Tüm ratlar postoperatif yedinci gün sakrifiye edildi, kalan karaciğer dokuları tartılarak ağırlık indeksleri oluşturuldu. Kalan karaciğer dokuları phosphohistone H3 ile boyanıp ışık mikroskopu altında incelenerek mitotik indeksleri hesaplandı.

Bulgular: Pringle + %70 hx + takrolimus grubu ile kontrol grubunu mitotik indeks ve ağırlık indeksleri açısından karşılaştırdığımızda, her iki indekste de istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Ayrıca %70 hx + takrolimus grubu ile kontrol grubunu mitotik indeks ve ağırlık indeksleri açısından karşılaştırdığımızda da her iki indekste istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Sonuç: Rejenerasyonun baskılanması küçük volümlü greftlerle yapılan karaciğer transplantasyonu sonrası risk oluşturabilir, bu yüzden; takrolimusun Pringle Manevrası ile kombine edildiğindeki etkisinin araştırılması, özellikle segmenter karaciğer grefti ile yapılan transplantasyonların sonrasında önem kazanmıştır. Çalışmamızda takrolimus kullanımının karaciğer rejenerasyonu üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığını gösterdik.

SUMMARY

Background: Liver regeneration is known to begin after experimentally induced liver resection. The Pringle Maneuver is traditionally used during hepatectomy to reduce blood loss, but there is a potential harmful effect on liver regeneration. The patients are receiving immunosuppressive therapy after liver transplantation to reduce graft rejection. These immunosuppressive drugs may have differential side effects on liver regeneration too.

Purpose: In this study, the effects of tacrolimus on liver regeneration in rats with partial hepatectomy were compared in the absence or presence of the Pringle Maneuver.

Material-Method: In our experiment 35 Wistar albino male rats, weighing between 200-300 grams, were used. The rats were randomly divided into five groups: Group 1; abdominal incision without intervention, Group 2; 70% hepatectomy, Group 3; 15 minutes Pringle Maneuver + 70% hepatectomy, Group 4; 70% hepatectomy + five days 1 mg/kg/day i.p. tacrolimus and Group 5; 15 minutes Pringle Maneuver + 70% hepatectomy + five days 1 mg/kg/day i.p. tacrolimus. All rats were sacrificed at the seven day after operation, remnant liver tissues were weighed and the weight index was created. Remnant liver tissues that stained with phosphohistone H3, were examined under a light microscope to calculate mitotic index.

Results: In the comparison of mitotic index and weight index, between Pringle + %70 hx + tacrolimus group and control group, there were no statistically significant differences. Also in comparison of mitotic index and weight index between %70 hx + tacrolimus group and control group, there were no statistically significant differences.

Conclusion: The suppression of regeneration could cause risks after liver transplantation especially in small volume grafts, therefore; investigating the effects of tacrolimus in combination with Pringle Maneuver has become more important after liver segmental grafts transplantations. We found that tacrolimus administration has no harmful effect on liver regeneration.

1. GENEL BİLGİLER

1.1 KARACİĞER

Karaciğer, hem endokrin hem de ekzokrin salgılama yapan vücudun en büyük organı olup metabolik fonksiyonların düzenlenmesinde büyük rol oynar ve aynı zamanda yaklaşık 1500 gram ağırlığında olup vücuttaki en büyük bez özelliğine sahiptir (1). Safra asidi sentezi ve sekresyonu, kan glikoz dengesi, lipoprotein sentezi, vitaminlerin depolanması (A,D,E,K ve B12), endojen ve eksojen bileşiklerin biyotransformasyonu, detoksifikasyonu ve ekspresyonu gibi birçok temel fizyolojik olaylarda merkezi bir rolü vardır (2).

Karaciğerin fonksiyonel ünitesi, karaciğer lobülü olarak isimlendirilen yapısal birimlerdir. Bu yapısal birimlerin temel yapısal elemanı hepatositlerdir. Bu lobüller birkaç mikrometre (μm) uzunluğunda 0,7-2 μm çapında ve silindirik yapıda 50.000-100.000 adet bulunan poligonal doku kitleleridir. Her lobülün merkezinde santral ven yer alır ki bu ven, karaciğerden kalbe kan taşınmasını sağlar. Bu santral venler giderek genişleyen sublobuler venlerle infrahepatik venlere drene olur ve en sonunda vena cava inferiora katılan vena hepaticayı oluştururlar. Bazı bölgelerde lobüller safra kanalları, lenfatikler, sinirler ve kan damarları içeren bağ dokusu ile sınırlanmıştır. Portal alan adı verilen bu bölgeler lobüllerin köşelerinde bulunur ve portal triad veya traktus adıyla bilinen yapılar içerirler. İnsan karaciğerinde, her lobülde 3-6 portal triad bulunur. Her portal triadda bir venül, bir arteriyol, bir safra kanalı bulunur. Bu yapılardan venül, genellikle en büyük olanıdır, süperior ve inferior mezenterik ve splenik venlerden gelen kanı içerir, duvarı ince ve lümeni düzensizdir. Arteriol venüle göre daha küçük, daha kalın duvarlı ve daha düzgün lümenlidir. Kan buraya abdominal aortanın çölyak dalından gelir. Safra kanalının ise belirgin bir tek katlı kübik epitelidir. Kübik epitel ile örtülü olan kanal, hepatositlerden gelen safrayı taşır ve hepatic kanal içine boşaltır (3).

Hepatositler, karaciğer lobülü içinde ışınsal olarak dizilmişlerdir. Hücreler bir duvarın tuğlalarına benzer biçimde bir ya da iki hücre kalınlığında bir tabaka oluştururlar. Bu hücre plakları lobülün periferinden merkezine doğru yönelmişlerdir. Bu plaklar arasındaki boşlukta kapillerler bulunur ve bu kapillerlere karaciğer sinüzoidleri denir. Sinüzoidal kapillerler sadece kesintili bir pencereci endotel tabakasından oluşan düzensiz olarak genişlemiş damarlardır. Pencereci olarak yaklaşık olarak 100 μm çapındadır ve eleğe benzer bir görüntü oluşturan kümeler halinde toplanmışlardır. Portal ven ve hepatic arterin uç dalları sinüzoidlerle temas halindedir. Portal ven ve hepatic arterin dalları bir seri bölünmeden sonra

daha küçük dallara ayrılarak doğrudan sinüzoidlere dökülür. Safra yolları sistemi, hücre zarının bir bölümünü oluşturan ince safra kanalikülleri olarak başlar. Hepatositler tarafından oluşturulan safra bu ince kanaliküllere drene olur. Safra kanalikülleri yoluyla intralobüler duktuslara ve daha sonra da portal traktus içindeki büyük safra kanallarına dökülür.

Karaciğer lobülleri, hepatik venlere oradan da vena kava inferiora boşalan bir santral ven etrafındaki yapılardan oluşur. Venöz sinüzoidlerin etrafında tipik endotel hücreleri ve büyük Kupffer hücreleri bulunmaktadır. Venöz sinüzoidleri çeviren endotel hücrelerinde yaklaşık 1 mikron çapında çok geniş porlar bulunur. Sinüzoidler, ortalama 10 µm çapındadır. Endotel hücreleri altlarında bulunan hepatositlerden “Disse aralığı” adı verilen subendotelyal bir boşluk ile ayrılmışlardır. Bu aralıkta hepatositlerin mikrovillusları bulunmaktadır. Endotelin büyük porları nedeni ile plazmadaki maddeler Disse aralığına geçebilirler. Sonuç olarak, kan endotel duvarından kolayca geçer ve hepatosit yüzeyi ile temas eder. Böylelikle; lipoprotein, albumin, fibrinojen gibi makromoleküller hepatositler tarafından kana verilir. Endotel hücresine ek olarak sinüzoidler mononükleer fagosit hücre serilerinin fagositotik hücrelerini de içerir. Karaciğer sinüzoidlerinin iç yüzlerinde, kan akımına doğru uzanan pek çok Kupffer hücresi vardır. Bu hücreler tipik makrofajlardır ve çok yüksek fagositik aktivite göstererek portal venöz kandaki bakterilerin % 99’unu, hatta fazlasını kan, karaciğer sinüzoidlerinden ayrılmadan tutarlar. Başlıca fonksiyonları yaşlı eritrositleri metabolize etmek, hemoglobini sindirmek ve immünolojik olaylarla ilgili proteinleri salgılamaktır (4).

Karaciğerin birçok metabolik ve yaşamsal fonksiyonu vardır. Bunlardan başlıcaları; sindirilen proteinlerin, karbonhidratların ve lipidlerin metabolize edilmesi, demir metabolizmasının düzenlenmesi, detoksifikasyon (oksidasyon, metilasyon, asetilasyon, esterifikasyon ve konjugasyonla), Kupffer hücreleri aracılığı ile bakterilerin vb. fagositoz yoluyla kandan temizlenmeleri, embriyolojik yaşamda hematopoetik sistem hücrelerinin üretilmesi, safra salınımı, pıhtılaşma faktörlerinin metabolizmasıdır (5).

1.2 KARACİĞER REJENERASYONU

Karaciğerin rejeneratif kapasitesi ile ilgili ilk bilgilere Hesiodos'un Theogoniası'nda rastlanmaktadır. Bir Titan olan Prometheus ateşi çalarak insana verdiği ve insanı şımarttığı için Zeus tarafından cezalandırılır. Ceza olarak Kafkas dağlarının en yüksek tepesine zincirlenir. Karaciğerinin bir kısmı her gün bir kartal tarafından yenir ve her gece eski halini alır, bu işkence Heracles onu kurtarana kadar uzun süre devam eder (6).

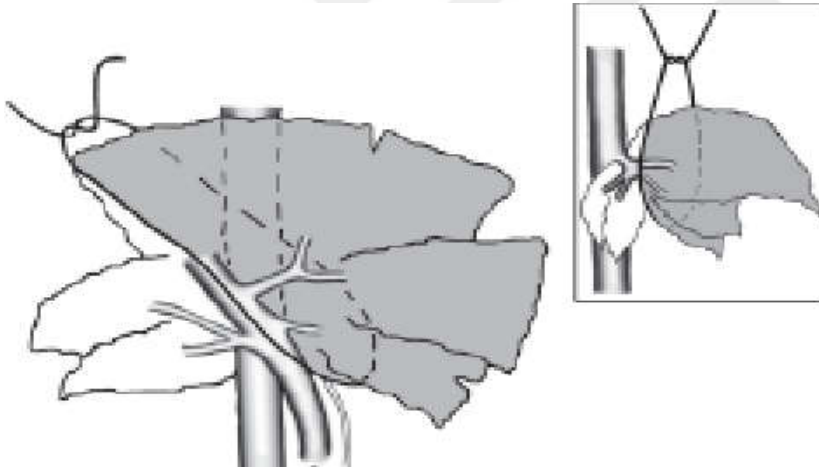
Karaciğer, hücreleri yavaş yenilenmesine karşın rejenerasyon için uygun bir organdır. Karaciğer en geniş hücre proliferasyon özelliğine sahip organ olmasına rağmen, hepatositlerin sadece %0.0012-%0.01'i hayatın herhangi bir döneminde mitozu uğramaktadır. Sağlıklı karaciğerdeki bu düşük hücre döngüsü oranı, toksik karaciğer hasarı veya cerrahi rezeksiyon durumunda %3'den daha yüksektir. Cerrahi yollarla karaciğerin bir kısmının alınması veya toksik maddelerin etkisiyle kaybı, rejenerasyonu başlatır. Hücre proliferasyonu periportal alanda başlar ve lobülün ortasına doğru hücre dizileri yeniden şekillenir. Rejenerasyon cevabı tipik olarak kalan karaciğer dokusunun asiner yapısının proliferasyonuna bağlıdır. Rezeksiyon vakalarında bu sonuç, rezeke edilen lobun restorasyonundan ziyade kalan karaciğer dokusunun hipertrofisine bağlıdır (7-9). Parsiyel hepatektomi sonrası geride kalan hepatik segmentler artan portal kan akımı ve basıncının etkisi altında kalmasına rağmen, parsiyel hepatektominin halen hücresel hasarın eşlik etmediği saf karaciğer rejenerasyonunu sağlayan en iyi yaklaşım olduğu in-vivo rejeneratif cevap çalışmalarında gösterilmiştir. Parsiyel hepatektomiden sonra 24 saat içinde aktif hücre replikasyonu başlar ve organın ilk ağırlığına erişinceye kadar devam eder. İlk 10 gün içinde önemli ölçüde rejenerasyon oluşur ve bu olay 4-5 haftada tamamlanır. Hepatik rejenerasyon için kabul gören genel görüş; organizmadan çıkan sinyallerin düzenleyici etkisi ile karaciğerin optimum boyuta ulaşmasına kadar devam eden son derece mükemmel organize olmuş bir olaylar zinciri olduğudur (10).

Karaciğer rezeksiyonu sonrası karaciğer rejenerasyonunda büyümeden sorumlu iki dizi hücre grubu olup bunlar hepatositler ve oval hücreler olarak bilinen progenitör hücrelerdir. Oval hücreler (prekürsör hücreler) rezerv kompartmanı olarak görev yaparken, karaciğerde yaralanma veya cerrahi rezeksiyon durumunda ilk olarak ayrılmış hücreler olan hepatositler devreye girer. Parsiyel hepatektomi sonrası hepatik dokunun onarımı amacıyla hepatositleri sırasıyla duktus epitel hücreleri, Kupffer hücreleri, stellat hücreler ve sinüzoidal endotel hücreleri izlemektedir. Normal şartlarda uykuda olan hepatositler rejeneratif bir uyarı alması durumunda çok yüksek bir proliferatif kapasiteye sahiptir. Hepatosit proliferasyonunun inhibe olduğu durumlarda rezerv kompartmandaki oval hücreler aktive olurlar. Akut karaciğer yetmezliği sonrasında alınan seri biyopsilerde bu progenitör hücrelerin hepatositlerin rejenerasyonundan büyük ölçüde sorumlu oldukları gösterilmiştir. Karaciğer transplantasyonu sonrası, hepatosit üretiminde kemik iliği kaynaklı hücrelerin rol aldığı konusu tartışmalıdır. Çünkü transplante insan karaciğerlerinde kemik iliği kaynaklı hepatositler, total hepatosit popülasyonunun %1'ini nadiren geçmektedir. Bunun yanı sıra rodentlerde de parsiyel hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunda kemik iliği kaynaklı

hepatositlerin varlığına dair bir kanıt bulunamamıştır. Karaciğer rejenerasyonunda hepatosit ve kök hücrelerden başka parankim dışı hücreler de önemli rol oynarlar. Hepatositler kadar parankim dışı hücrelerin replikasyon zamanı da göreceli olarak iyi ayarlanmıştır. Hepatositlerin replikasyon pikinden birkaç saat sonra parankim dışı hücrelerin pik replikasyonu gerçekleşir. Fonksiyonel olarak Kupffer hücreleri, endotelyal hücreler, stellat hücreleri normal hepatosit proliferasyonunda önemlidir. Çünkü bu hücreler hepatosit replikasyonu için gerekli olan hemen hemen tüm sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin kaynağıdır (11-13).

1.3 %70 DENEYSEL HEPATEKTOMİ MODELİ

İlk kez 1900'li yıllarda Amerikalı Higgins ve Anderson (14) adlı bilim adamları, ratlarda eter anestezisi altında %70 hepatektomiyle karaciğerin sol lateral ve median lobunu çıkartmışlardır (Şekil 1) (15). Çalışmalarında %75'lik karaciğer ağırlık kaybının ilk bir ayda giderildiğini gözlemişlerdir.

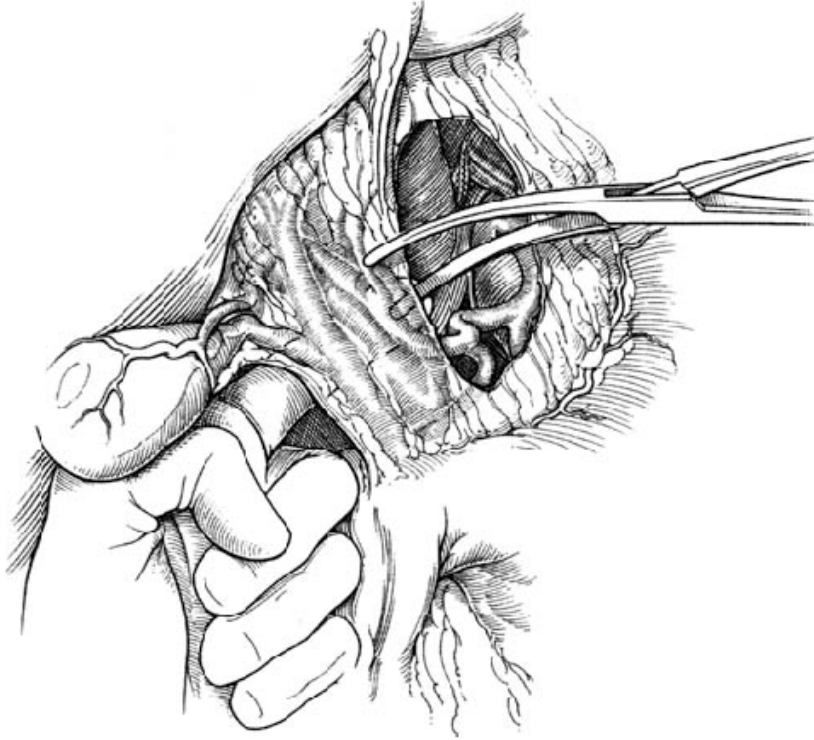


Şekil 1. Ratlarda %70 hepatektomi tekniği

Deneyisel hayvan rezeksiyon modelinde rejenerasyon cevabı karaciğerin %70'i rezeke edildiğinde maksimumdur. Daha küçük miktarda parankim çıkarıldığı zaman restorasyon daha yavaş ilerler, %70'i aşan rezeksiyonlarda DNA sentezi ve mitotik aktivitede bozulmalar olur. Ratlarda karaciğerin yaklaşık %70'inin çıkarıldığı standart bir parsiyel hepatektomi sonrasında, genç hayvanlarda rejenerasyon boyunca hepatositlerin yaklaşık olarak %95'i bölünür. Yaşlı hayvanlarda ise karaciğer onarımının belirgin olarak daha yavaş olması sebebiyle bu oran yaklaşık %70'e düşer. Yapılan birçok çalışmada parsiyel hepatektomi sonrasında replikasyonun, ratlarda yaklaşık 12 saat sonra başladığı gösterilmiştir (16, 17).

1.4 PRINGLE MANEVRASI VE İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI

Karaciğer rezeksiyonları sırasında perioperatif sonuçları etkileyen en önemli faktörlerden biri; oluşan kan kaybı ve buna bağlı kan transfüzyonlarıdır (18-20). İlk olarak 1908 yılında Pringle (21), karaciğer operasyonları sırasında kan kaybını minimize etmek için vasküler pedikülü atravmatik bir klempile kapatarak; hepatik arter ve portal ven ile karaciğere giden kan akımını engelleyen tekniği (Pringle Manevrası) tanımlamıştır (Şekil 2). Bu teknik günümüze kadar hem karaciğerin travmatik yaralanmalarında hem de elektif karaciğer rezeksiyonlarında, bir kerede veya aralıklı olarak daha uzun sürelerde kullanılmıştır (22). Pringle Manevrası sonucunda, uygulanma süresi ile artan oranlarda iskemik hasar ve beraberinde reperfüzyon hasarı oluşmaktadır (23).



Şekil 2. Pringle Manevrası

İskemi reperfüzyon hasarı; dokunun geçici olarak kan akımından yoksun bırakılması ve kan akımının geri dönmesi sonucu ciddi bir inflamatuvar cevabın başlaması ile karakterizedir. İskemi arteriyel ve/veya venöz tıkanıklık sonucu meydana gelir. Sonrasında etkilenen yatakta staz gelişir. Şok, transplantasyon, myokard enfarktüsü sonrasında iskemi görülebilir. Bunun dışında karaciğerde iskemiye neden olan olayların başında; karaciğer rezeksiyonu, hemorajik şok, travma gelmektedir (24-27). Kan akımının kesilmesini takiben

ortaya çıkan organ disfonksiyonunun nedeni reperfüzyon sonrası meydana gelen hücre hasarı ve organ hassasiyetinin artmasıdır.

İskemi-reperfüzyon hasarı karakteristik olarak;

- PMNL'nin aktivasyonuna (28)
- Serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına (29)
- Sitokinlerinin salınımında artışa (30)
- Eikasonoidlerin üretiminde artışa (31)
- Kompleman sistemin aktivasyonuna neden olur. (32)

1.5 TAKROLİMUS (FK-506)

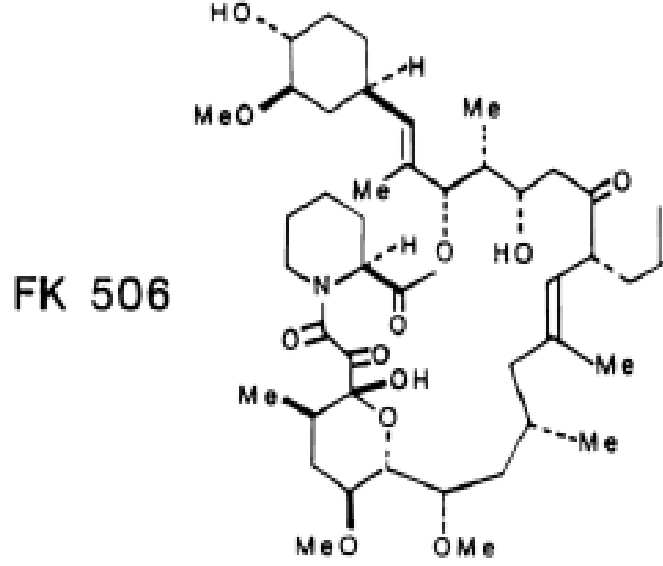
Takrolimus (FK-506); makrolid lakton grubu, immünsüpresif bir ajandır. İlk kez 1984 yılında *Streptomyces tsukubaensis* adlı bir mantardan üretilmiştir (Şekil 3). Organ nakli (böbrek, karaciğer, kalp, pankreas nakli) yapılanlarda doku reddini önlemek için kullanılmaktadır (33).

Kalsinörin inhibisyonu yaparak, antijen spesifik T hücre aktivasyonunu ve başta interlökin-2 (IL-2) olmak üzere IL-4, IL-5 gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımını inhibe etmektedir. Kalsinörin, hedef proteinlerden fosfat gruplarını ayıran, kalsiyum aktivasyonu yapan bir enzimdir. Sitokinlerin transkripsiyonel aktivasyonunda temel rol oynamaktadır ve immünsüpresyon yapmak için iyi bir hedeftir. Takrolimus, hücre membranını geçer ve bağlayıcı proteinine (takrolimus bağlayıcı protein) bağlanır. Takrolimus bağlayıcı protein, T lenfositlerde yaygın olarak bulunan sitozolik bir proteindir. Takrolimus ve bağlayıcı proteinin oluşturduğu kompleks, fosfattan aktif bölgelerin uzağında kalsinörini inhibe eder, kalsinörin-transkripsiyon faktör etkileşimine fiziksel olarak engel olur ve defosforilizasyonu önler. Sonuç olarak IL-2 ve diğer sitokinlerin sentezi ve salınımı inhibe edilir (34).

İn-vitro hepatosit kültürü ile yapılan deneylerde; kültüre sadece takrolimus verilmesiyle hepatositlerde herhangi bir mitoz artışına rastlanılmamıştır. Fakat rat serumu ile takrolimusun beraber verildiği durumlarda sadece rat serumu verilenlere oranla daha anlamlı oranlarda mitoz artışına ulaşıldığı görülmüştür (35).

Takrolimusun parsiyel hepatektomiler sonrasında karaciğer rejenerasyonuna olan etkilerini; T-lenfosit aktivasyonunu inhibe ederek ve böylece immünsistemin hepatosit

mitozunu baskılayıcı etkilerini kaldırarak veya nonimmün yoldan büyüme kontrol sisteminin ikincil haberci ve sinyal iletim mekanizmalarıyla etkileşerek yaptığı düşünülmektedir (36).



Şekil 3. Takrolimusun molekül yapısı

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 DENEY HAYVANI VE BARINDIRMA KOŞULLARI

Çalışmamızda deney hayvanı olarak, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edilen, 8 haftalıktan büyük, 200-300 gram ağırlıklarında 35 adet Wistar Albino türü erkek rat kullanıldı. Deneylerde kullanılan ratlar kafeslere yerleştirilerek, standart laboratuvar koşullarına ve İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu (DEÜ İBG-HADYEK) yönergesinde belirlenen etik kurallara uygun olarak barındırıldı. Denekler Deney Cerrahi ve Araştırma Bilim Dalı Laboratuvarlarında eşit ortam koşullarında YEMTA hayvan yemi ve su ile serbest olarak beslenip doğal gece-gündüz (aydınlık-karanlık) ortamında saklandı. Deneylere başlanmadan önce Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (Ek 1).

2.2 ANESTEZİ UYGULAMASI:

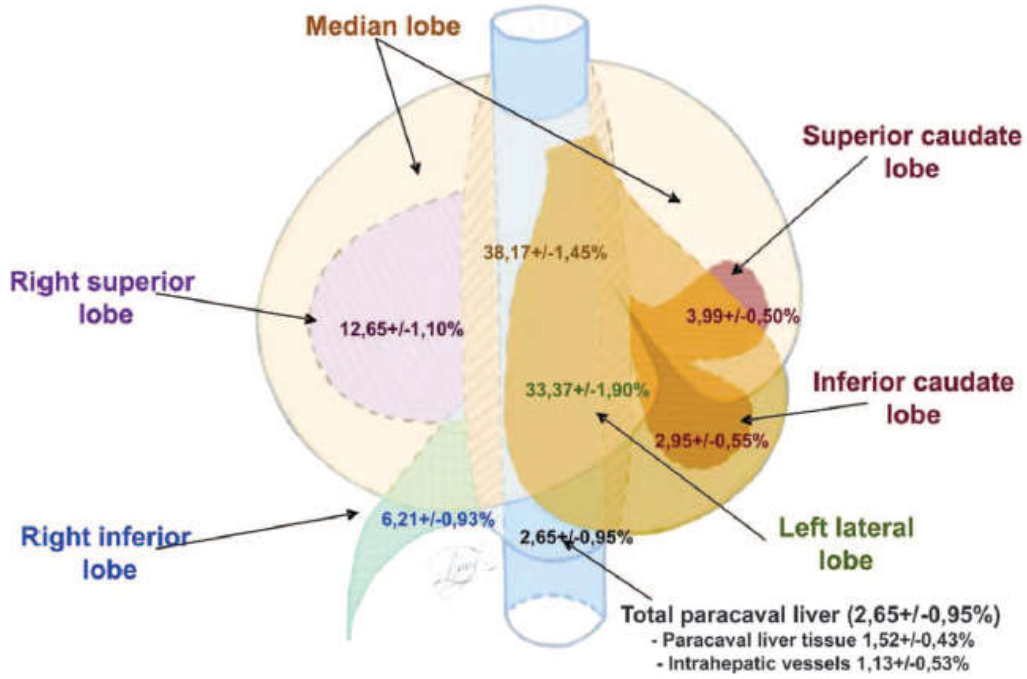
Ketamin (Ketalar®, 10ml, 50mg/ml, Pfizer, ABD) (45mg/kg, intraperitoneal) ve xylazine (Alfazyne® 50ml, 20 mg/ml, Alfasan, Hollanda) (5mg/kg, intraperitoneal) ile genel anestezi uygulandı. Gerektiğinde ratların anestezi derinliğini sabit tutmak için ketamin (20 mg/kg) refleks yanıtla (pensetle ayağa ağırlı uyaran verilmesi-pedal refleks) bakılarak tekrarlandı.

2.3 HEPATİK REZEKSİYON YÖNTEMİ

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, ratlara uygulanan cerrahi girişimler aseptik koşullarda gerçekleştirildi. Bütün denekler operasyondan önceki gün saat 24:00'dan itibaren aç bırakılıp, ancak su içmelerine izin verildi.

Ratlar sırtüstü supin pozisyonunda ve steril koşullarda 3 cm'lik median ön batin duvarı insizyonu ile opere edildi. Madrahimov'un (37) tanımladığı karaciğerin sol lateral (%33.37 ± 1.90) ve median lob (%38.17 ± 1.45) pedikülleri (Şekil 4) 4/0 polyglactin 910 (Vicryl®) sütürle bağlanarak Higgins ve Anderson'un tanımladığı şekilde %70 hepatektomi yapıldı (14). Cerrahi işlem sonrasında fasya ve cilt 4/0 ipek devamlı sütürlerle kapatıldı ve povidone iodine ile temizlendi (Resim 1-8).

Postoperatif 6. saatten itibaren oral su ve diyet alımına izin verildi ve sonrasında 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde, ses yalıtımlı, sıcaklık ve nemi sabit tutulan laboratuvarında, istedikleri kadar yiyebilip içecekleri yem ve su sağlanarak barındırıldı.



Şekil 4. Rat karaciğer loblarının ağırlık dağılımı

2.4 DENEY GRUPLARI VE PROTOKOL

Ratlar deney protokolüne göre beş gruba ayrıldı:

Grup-1 (Sham grubu) (n=7): Ratların batını açılıp karaciğer ve hepatik pedikül ortaya konulup başka hiçbir işlem yapılmadı. Bu gruba 7 gün sonra sakrifikasyon yapılarak karaciğerleri patoloji örneği olarak alındı.

Grup-2 (n=7): Ratlara %70 hepatektomi (LLL+ML) uygulandı. Bu gruba 7 gün sonra sakrifikasyon yapılarak rezidü karaciğer patoloji örneği olarak alındı.

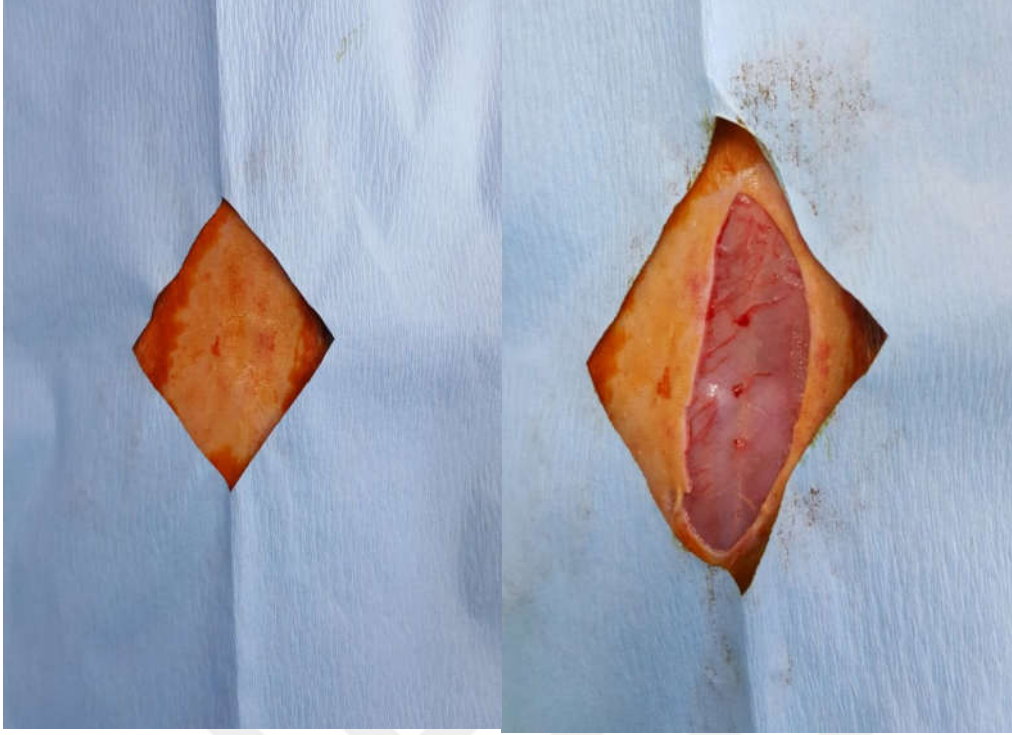
Grup-3 (n=7): Ratların hepatik pedikülüne 15 dakika Pringle Manevrası uygulanması sırasında %70 hepatektomi (LLL+ML) uygulandı. Bu gruba 7 gün sonra sakrifikasyon yapılarak rezidü karaciğer dokusu patolojik inceleme için alındı.

Grup-4 (n=7): Ratlara %70 hepatektomi (LLL+ML) uygulandı ve hepatektomiden 12 saat sonra intraperitoneal takrolimus (1 mg/kg/gün) 5 gün süre ile uygulandı. Bu grupta da 7. gün sakrifikasyon yapılarak rezidü karaciğer dokusu patolojik inceleme için çıkarıldı.

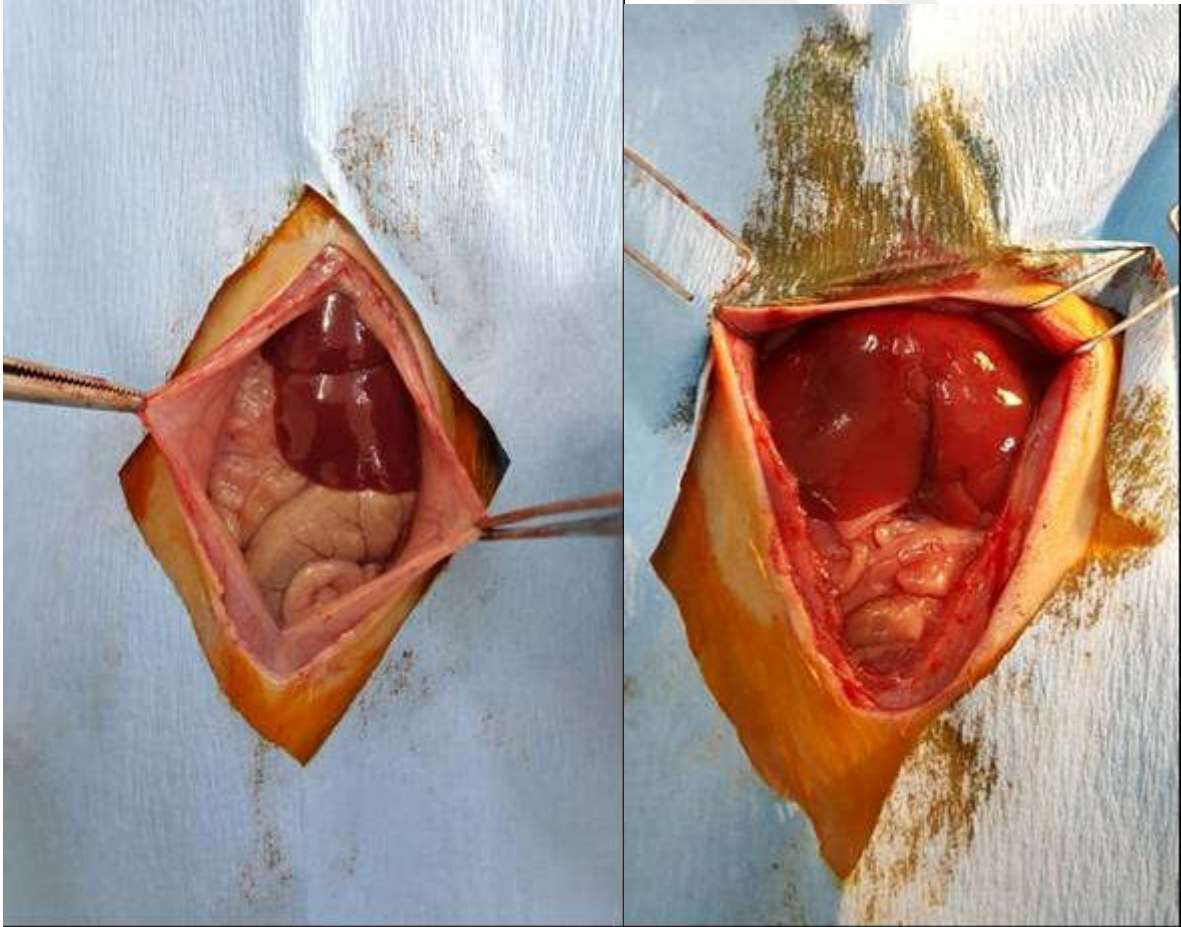
Grup-5 (n=7): Ratların hepatic pedikülüne 15 dakika Pringle Manevrası uygulanması sırasında %70 hepatektomi (LLL+ML) uygulandı ve hepatektomiden 12 saat sonra intraperitoneal takrolimus (1 mg/kg/gün) 5 gün süre ile uygulandı. Bu grupta da 7. gün sakrifikasyon yapılarak rezidü karaciğer dokusu patolojik inceleme için çıkarıldı.



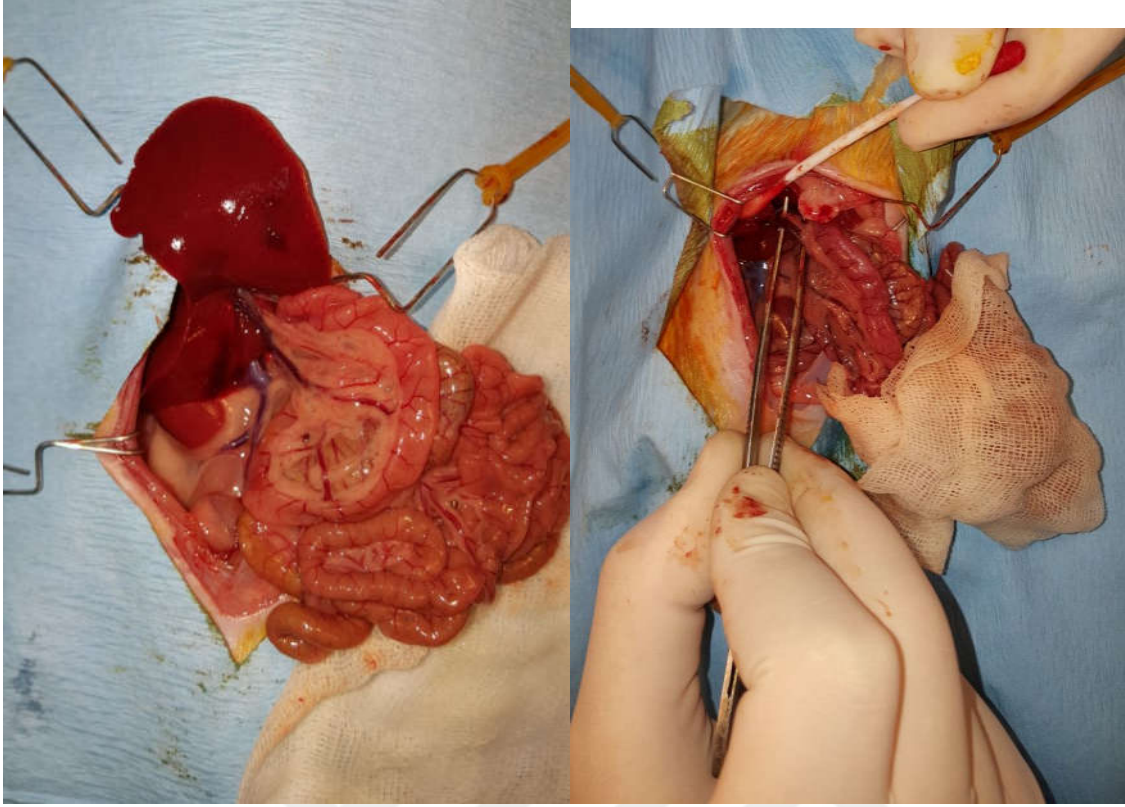
Resim 1. Anestezi verilmesi sonrası cerrahi sahanın temizlenmesi ve boyanması



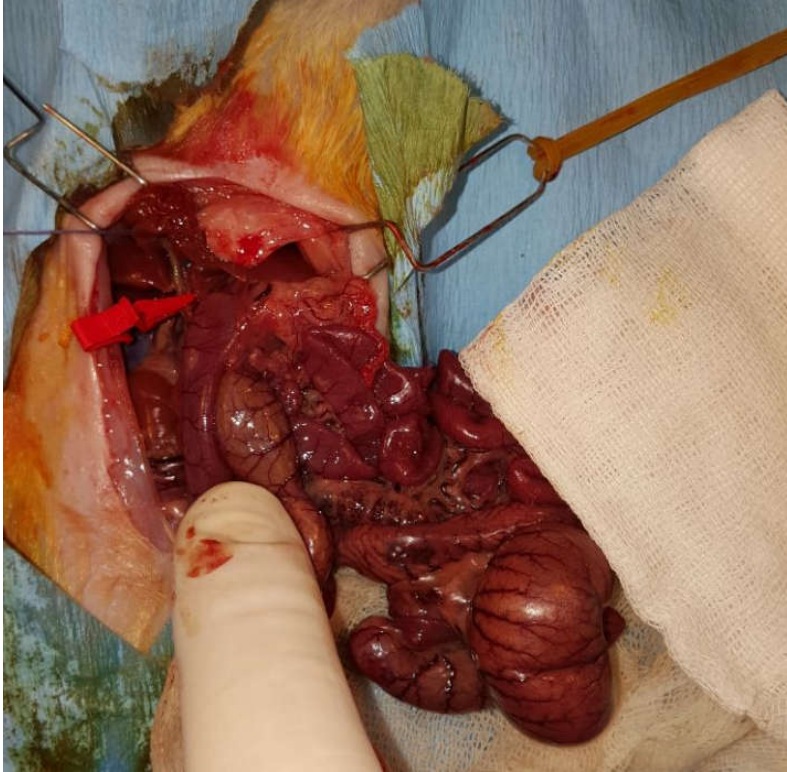
Resim 2. Cerrahi sahanın örtölüp orta hat cilt insizyonunun yapılması



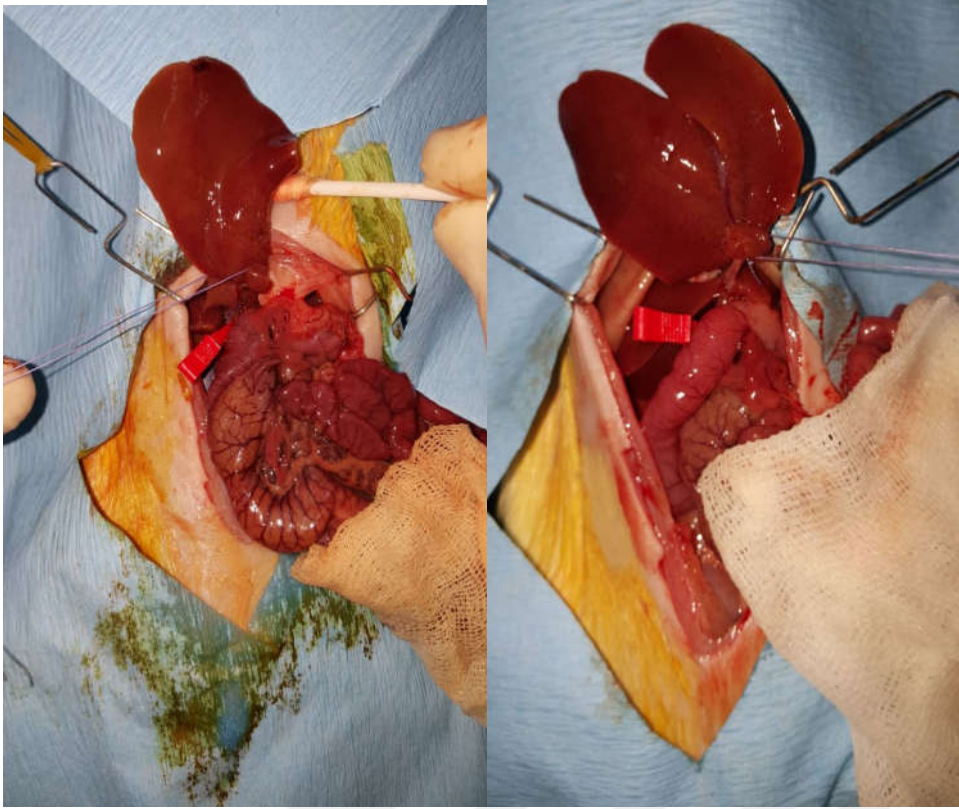
Resim 3. Ratın karnı açıldıktan sonra bilateral subkostal ekartasyon



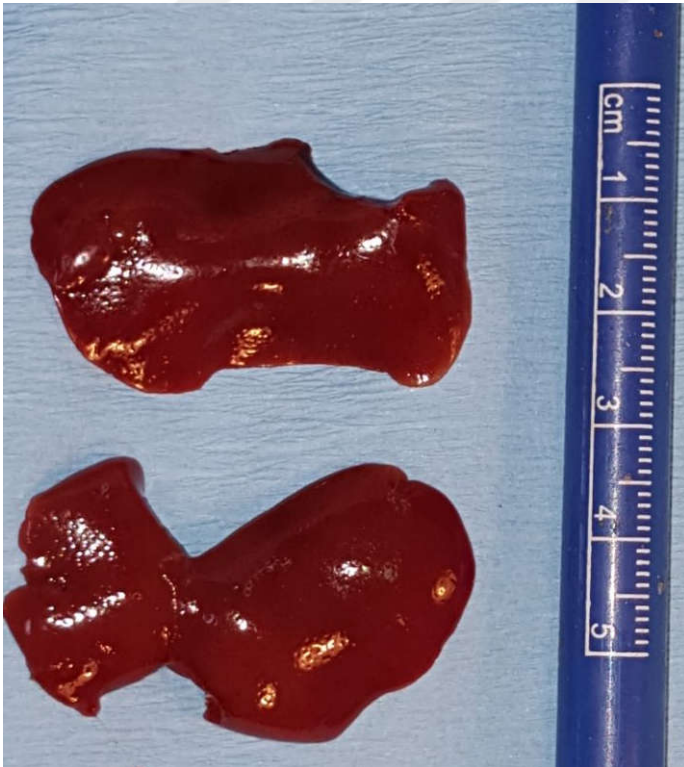
Resim 4. Portal pedikülün diseksiyonu ve askıya alınması



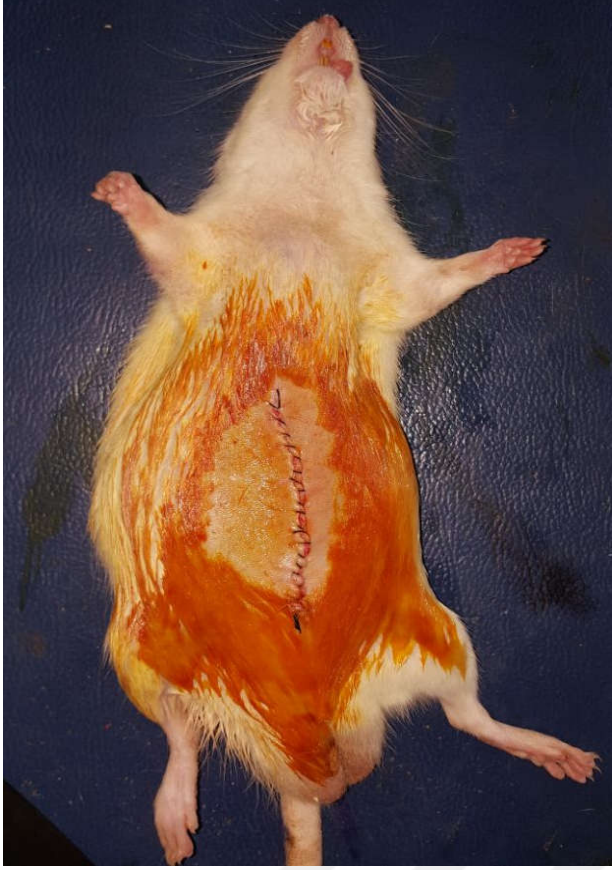
Resim 5. Bulldog klemp kullanılarak Pringle Manevrası uygulanması



Resim 6. Sol lateral lob (soldaki) ve median lobların (sağdaki) portal pediküllerinin askıya alınması



Resim 7. %70 hepatektomi ile çıkan spesmenler (üstteki sol lateral lob, alttaki median loblar)

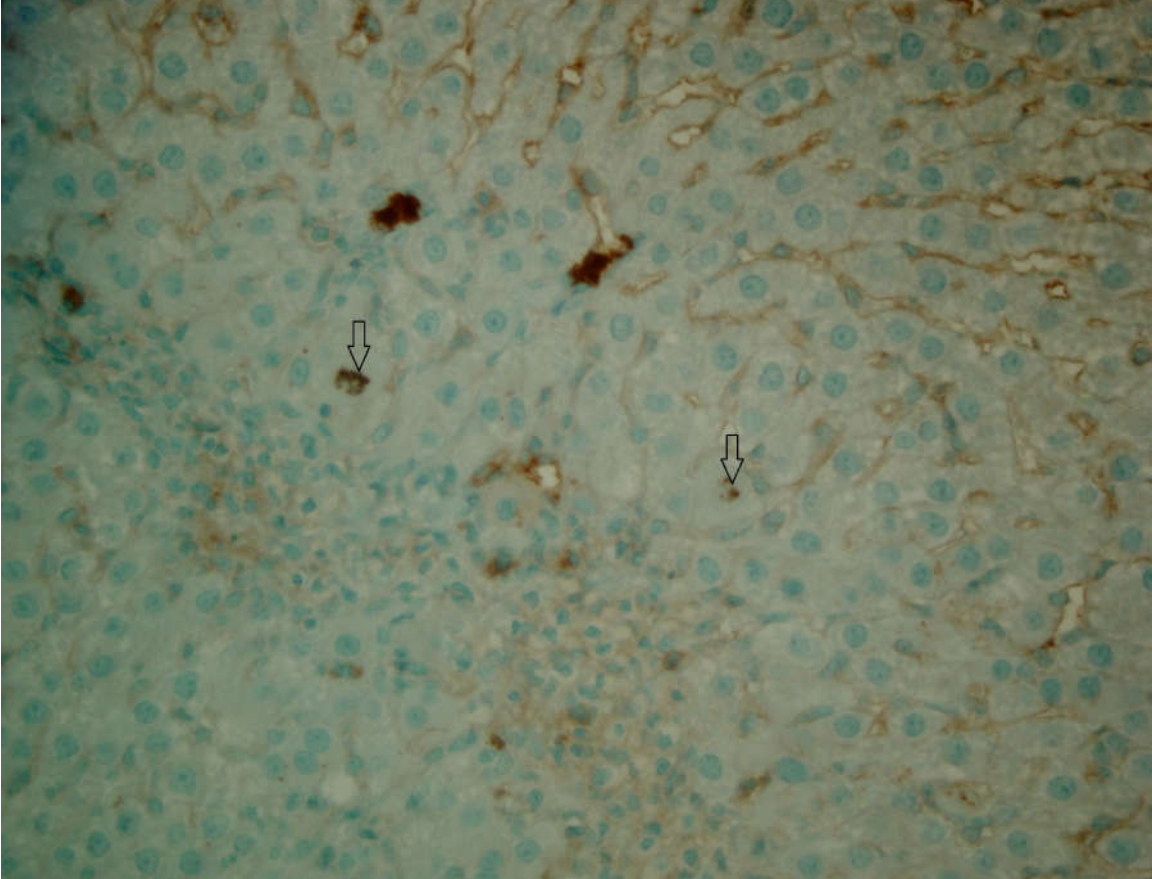


Resim 8. Orta hat insizyonun kapatılması

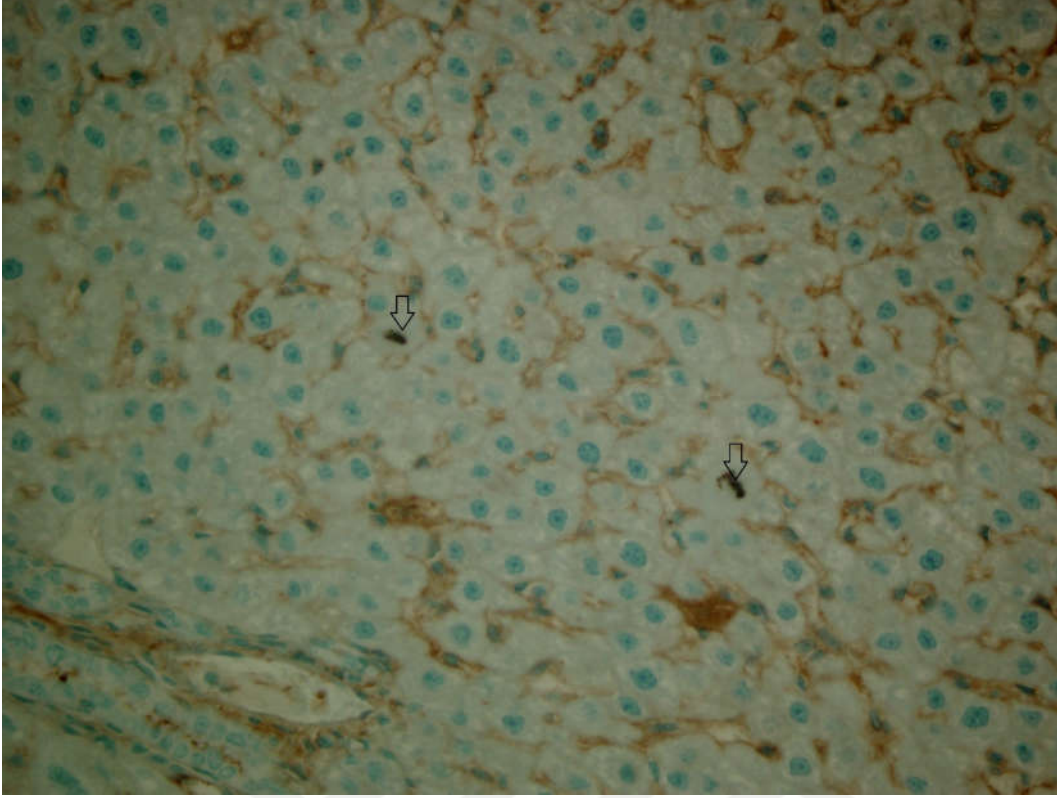
2.5 PATOLOJİK İNCELEME VE MİTOTİK İNDEKS TAYİNİ

Rat karaciğer dokularına rejenerasyonu değerlendirmek amacıyla mitoz belirleyicisi olan phosphohistone H3 (PHH3) immunhistokimyası uygulandı. Bunun için formalin ile fikse, parafine gömülü karaciğer dokularından 4 µm kalınlığında kesitler hazırlandı. Kesitler 60 dakika süreyle 56°C’de bekletildi. BenchMark ULTRA otomatik immunhistokimya boyama cihazı (Ventana Medikal Sistemleri, Tucson, AZ, USA) ile immunhistokimyasal boyama gerçekleştirildi. Kesitler EZ Prep solüsyonu ile deparafinize edildi. Antijen açığa çıkarma işlemi CC1 standard® (Tris, Borate, EDTA, ph 8.4) kullanılarak 95°C’de 76 dakika süre ile yapıldı. 4 dakika süre ile 37°C’de UV Inhibitor (%3 H₂O₂) uygulandı. Kesitler 37°C’de 60 dakika süre ile primer antikor (PHH3, Poliklonal, 1:500, Cell Marque, Rocklin, CA, USA) inkübe edildi. Kesitler 37°C’de 8 dakika süre ile HRP UNIV MULT (peroksidaz işaretli streptavidin, streptavidin biyotin kit) içinde inkübe edildi ve daha sonra H₂O₂ ile kombine 3,3’-diaminobenzidin kromojen 8 dakika süre ile uygulandı, ardından Harris hematoksilen ile 37°C’de 4 dakika süre ile zıt boyama yapıldı.

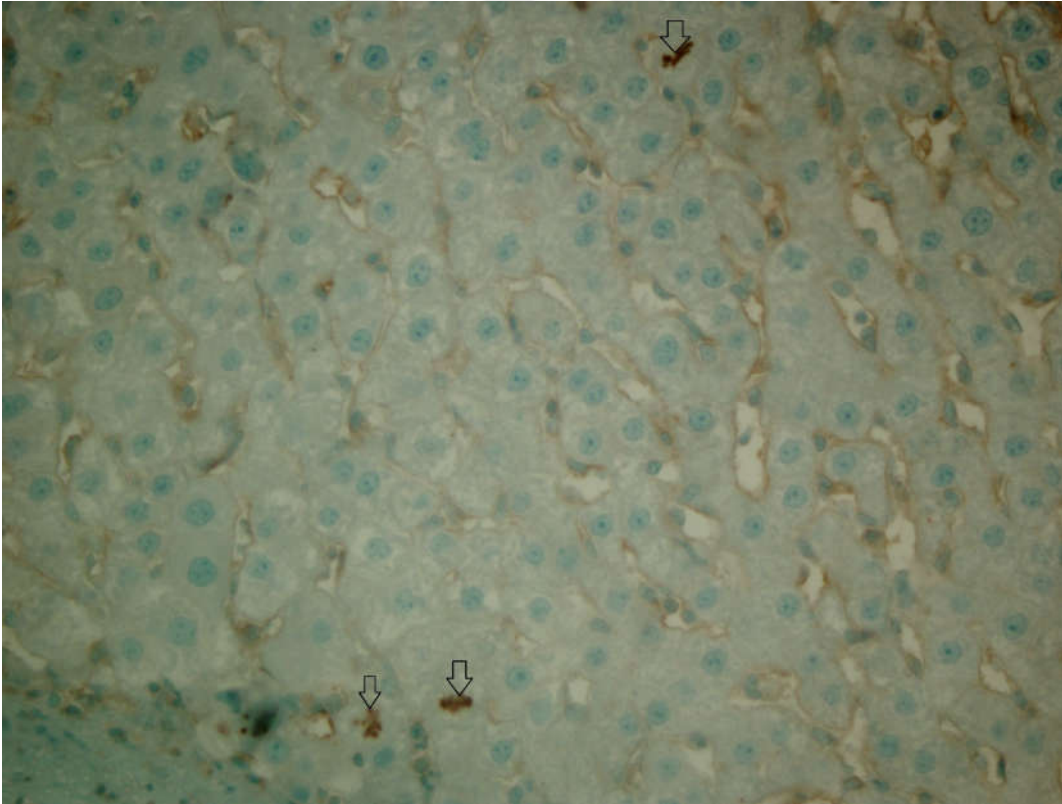
İmmunhistokimya boyalı kesitler uzman patoloğ tarafından mitoz sayısı açısından değerlendirildi. Işık mikroskopunda her bir olguya ait PHH3 boyalı kesitlerde 10 farklı büyük büyütme alanı değerlendirilerek 40 büyük büyütme alanındaki mitozlar sayıldı ve mitotik indeks olarak belirlendi (Resim 9-13).



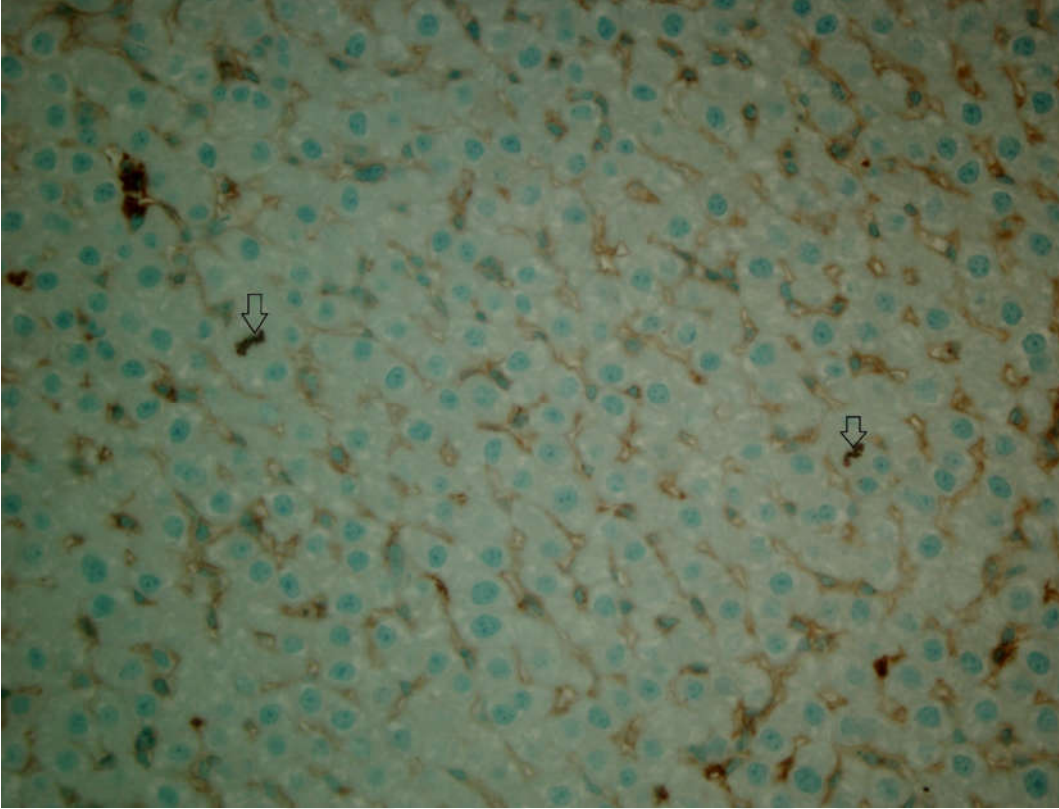
Resim 9. Grup 1’de PHH3 immunhistokimyasında pozitif boyanan mitotik figürler (beyaz oklar) (x40).



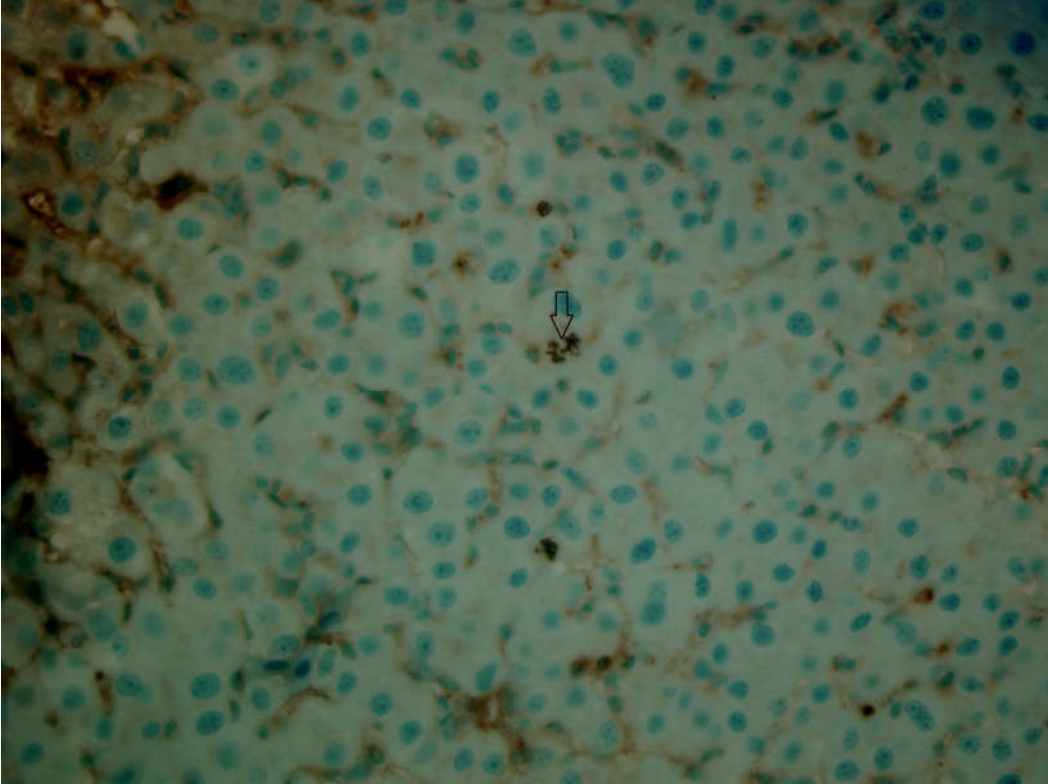
Resim 10. Grup 2’de PHH3 immunhistokimyasında pozitif boyanan mitotik figürler (beyaz oklar) (x40).



Resim 11. Grup 3’de PHH3 immunhistokimyasında pozitif boyanan mitotik figürler (beyaz oklar) (x40).



Resim 12. Grup 4’de PHH3 immunhistokimyasında pozitif boyanan mitotik figürler (beyaz oklar) (x40).



Resim 13. Grup 5’de PHH3 immunhistokimyasında pozitif boyanan mitotik figürler (beyaz ok) (x40).

2.6 AĞIRLIK İNDEKSİ TAYİNİ

Grup 1 (Sham grubu) kullanılarak rat karaciğerlerinin rat total vücut ağırlıklarına oranı hesaplandı. Tüm karaciğer ağırlığının, rat ağırlığının %5.67 si olduğu bulundu (38).

Sakrifiye edilen rat karaciğer ağırlığının, %70 hepatektomi sonrasında kalan karaciğer ağırlığına oranına oranı hesaplandı, elde edilen değer 100 ile çarpılarak ağırlık indeksi bulundu. Sonuçlar % şeklinde ifade edildi.

Ağırlık İndeksi = [sakrifiye karaciğer ağırlığı / (tüm karaciğer ağırlığı - rezeke edilen karaciğer ağırlığı)] x 100

2.7 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bulunan tüm değerler SPSS 22.0 for Windows kullanılarak analiz edildi. 1, 2, 3, 4, 5 grupları Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. İki grup karşılaştırmaları Mann Whitney U testi ile yapıldı. P değerinin <0,05 olması halinde sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. SONUÇLAR

Yapılan hepatektomiler sonrasında Grup 1 ve Grup 2’de ölen rat olmadı. Grup 3’de bir rat postoperatif 1. günde, Grup 4’de bir rat postoperatif 0. günde, Grup 5’de bir rat postoperatif 1. günde diğer rat postoperatif 2. günde öldü. Toplam ölen 4 rata yapılan otopsi incelemelerinde anlamlı bir patolojiye rastlanılmadı.

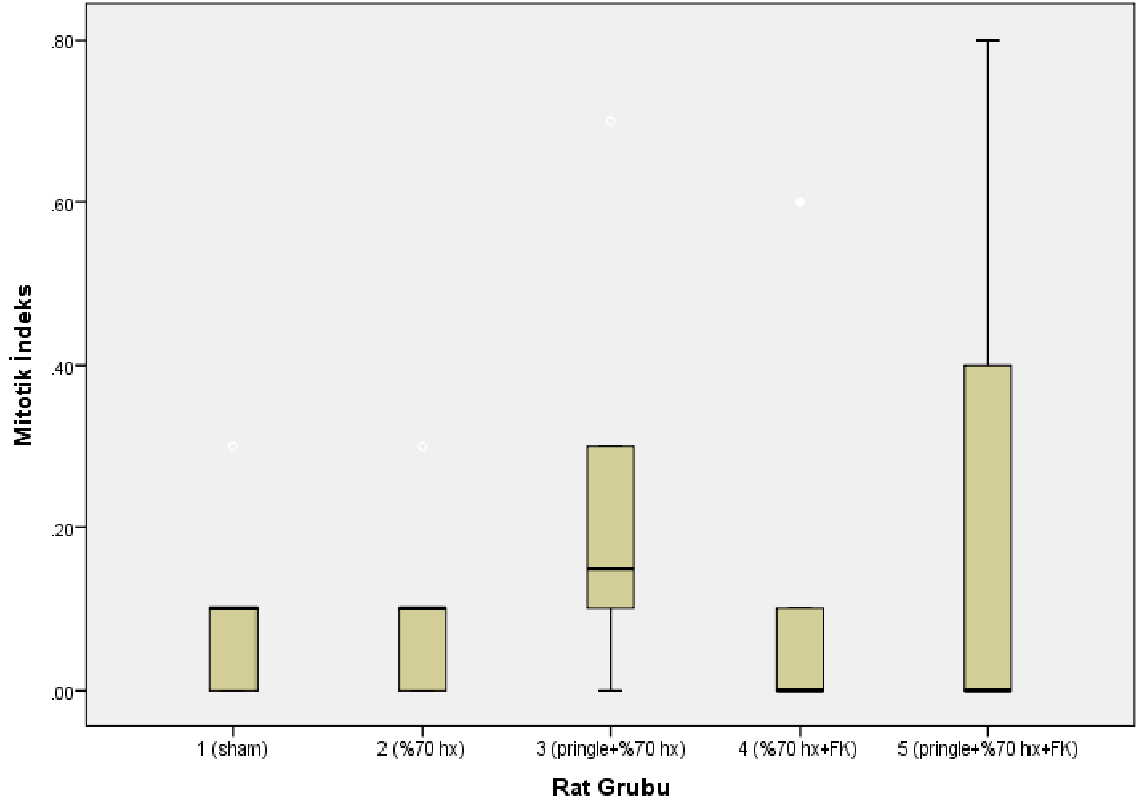
Tüm gruplarla ilgili ölçülen ve hesaplanan parametreler Tablo 1’de görülmektedir.

Tablo 1. Rat gruplarıyla ilişkili istatistiksel veriler

Rat Grubu		Başlangıç Rat Ağırlığı (gr)	Sakrifiye Rat Ağırlığı (gr)	Rezeke Edilen Karaciğer Ağırlığı (gr)	Sakrifiye Karaciğer Ağırlığı (gr)	Ağırlık İndeksi (%)	Mitotik İndeks
1	N	7	7		7		7
	Mean±Std. Deviation	272,85±27,35	287,00±28,29		16,42±3,58		0,09±0,11
	Median (min-max)	274,00 (228,00-300,00)	286,00 (247,00-317,00)		18,20 (11,00-20,00)		0,10 (0,00-0,30)
2	N	7	7	7	7	7	7
	Mean±Std. Deviation	274,29±16,77	264,29±23,7	6,46±1,52	14,49±1,74	162,44±34,21	0,09±0,11
	Median (min-max)	275,00 (247,00-300,00)	258,00 (231,00-300,00)	6,20 (4,40-8,80)	13,80 (12,60-17,80)	149,91 (123,30-213,70)	0,10 (0,00-0,30)
3	N	7	6	7	6	6	6
	Mean±Std. Deviation	267,14±16,85	261,83±19,78	6,09±0,84	15,20±0,96	173,34±8,58	0,23±0,25
	Median (min-max)	270,00 (241,00-290,00)	262,00 (235,00-283,00)	6,20 (4,80-7,40)	15,40 (13,80-16,20)	173,30 (162,63-183,62)	0,15 (0,00-0,70)
4	N	7	6	7	6	6	6
	Mean±Std. Deviation	291,43±9,31	266,17±34,03	6,86±1,30	14,97±2,05	154,16±27,22	0,12±0,24
	Median (min-max)	293,00 (279,00-300,00)	269,00 (225,00-323,00)	7,20 (5,20-8,80)	14,20 (12,80-17,80)	148,27 (127,92-201,65)	0,00 (0,00-0,60)
5	N	7	5	7	5	5	5
	Mean±Std. Deviation	270,29±16,20	212,60±8,08	6,97±1,02	14,08±1,48	165,53±20,06	0,24±0,36
	Median (min-max)	268,00 (252,00-300,00)	213,00 (203,00-221,00)	7,20 (5,80-8,20)	13,40 (12,60-16,40)	159,67 (148,44-199,53)	0,00 (0,00-0,80)
Total	N	35	31	28	31	24	31
	Mean±Std. Deviation	275,20±19,16	260,97±33,10	6,59±1,18	15,09±2,24	163,74±24,53	0,14±0,22
	Median (min-max)	275,00 (228,00-300,00)	262,00 (203,00-323,00)	6,30 (4,40-8,80)	14,60 (11,00-20,00)	164,14 (123,30-213,70)	0,10 (0,00-0,80)

3.1 MİTOTİK İNDEKS SONUÇLARI

Grup 1, 2, 3, 4, 5'e Kruskal-Wallis testi uygulandığında, mitotik indeks bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı gözlemlendi ($p=0,575$). Gruplarda saptanan mitotik indeksler Grafik 1'de gösterilmiştir.



Grafik 1. Rat gruplarında saptanan mitotik indeksler

Grup 2 ve Grup 1 (sham grubu) kendi aralarında mitotik indeks açısından Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değer saptanmadı ($p=1,000$).

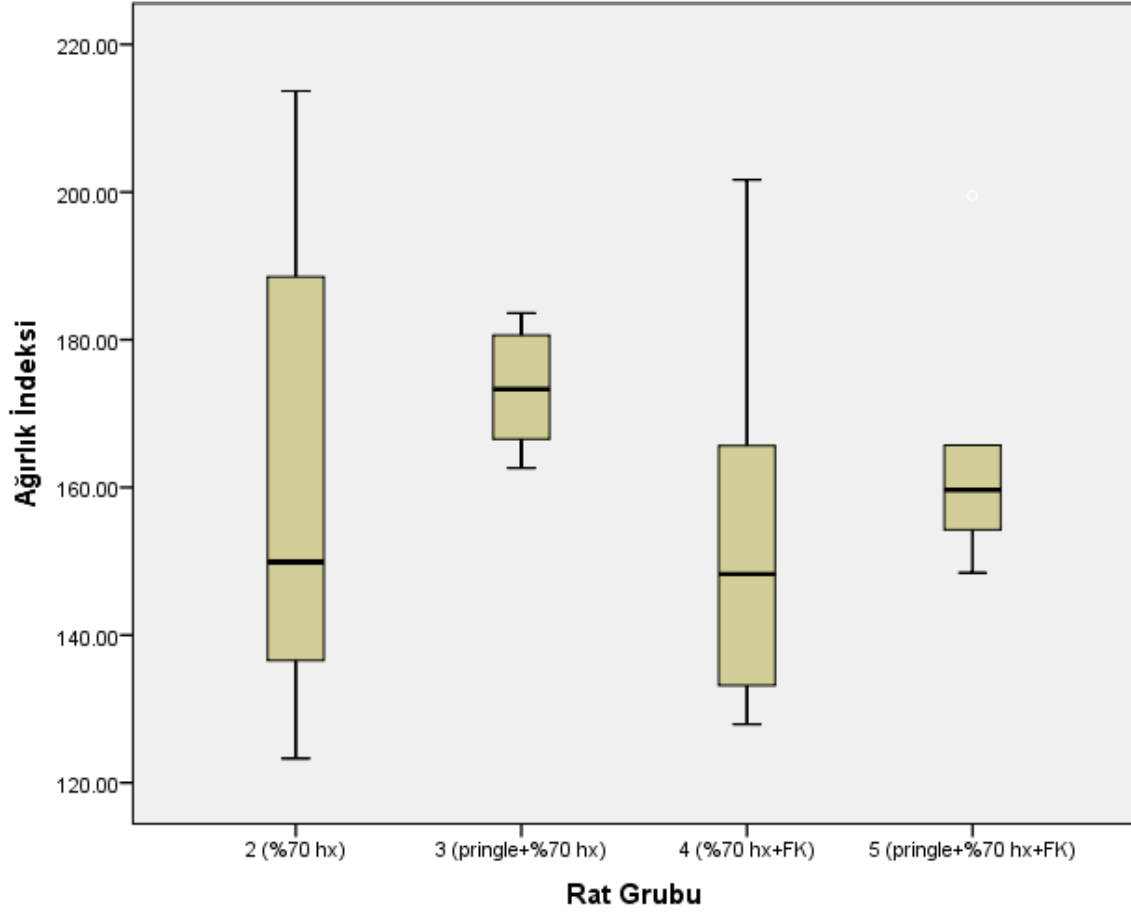
Grup 3 ve Grup 1 kendi aralarında mitotik indeks açısından Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değer saptanmadı ($p=0,179$).

Grup 4 ve Grup 1 kendi aralarında mitotik indeks açısından Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değer saptanmadı ($p=0,581$).

Grup 5 ve Grup 1 kendi aralarında mitotik indeks açısından Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değer saptanmadı ($p=0,861$).

3.2 AĞIRLIK İNDEKSİ SONUÇLARI

Grup 2, 3, 4, 5'e Kruskal-Wallis testi uygulandığında, ağırlık indeksi bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı gözlemlendi ($p=0,431$). Gruplarda saptanan ağırlık indeksleri Grafik 2'de gösterilmiştir.



Grafik 2. Rat gruplarında saptanan ağırlık indeksleri

Grup 3 ve Grup 2 (sadece %70 hx yapılan grup) kendi aralarında ağırlık indeksi açısından Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değer saptanmadı ($p=0,668$).

Grup 4 ve Grup 2 kendi aralarında ağırlık indeksi açısından Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değer saptanmadı ($p=0,775$).

Grup 5 ve Grup 2 kendi aralarında ağırlık indeksi açısından Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değer saptanmadı ($p=0,570$).

4. TARTIŞMA

Klinik olarak karaciğer büyümesini en iyi gözlemlediğimiz örnekler; canlı donör transplantasyonunda donör ve alıcı karaciğerlerinin büyümesi, split karaciğer transplantasyonu sonrası alıcı karaciğerlerin büyümesi, karaciğer hasarı veya parsiyel hepatektomiden sonraki karaciğer büyümesidir. Günümüzde split karaciğer greftleri sadece çocuklar için kullanılmamakta, giderek artan oranlarda erişkinlerde de kullanılmaktadır. İmmünsüpresif ilaçlar solid organ transplantasyonları sonrası tedavilerde dönüm noktası olmuşlardır, fakat karaciğer transplantasyonu sonrası kullanılan immünsüpresif ilaçların bir kısmı hepatik rejenerasyonu baskılamaktadır. Rejenerasyonun baskılanması küçük volümlü greftlerle yapılan karaciğer transplantasyonları sonrası önemli bir risk oluşturmaktadır.

Takrolimus karaciğer transplantasyonları sonrası sıklıkla kullanılan etkin bir immünsüpresif ilaçtır. Takrolimusun karaciğer rejenerasyonu üzerine etkisi ile ilgili olarak çok çeşitli yayınlar bulunmaktadır. Chavez ve ark. (39) yaptıkları çalışmada ratlara %70 hepatektomi uygulamışlar ve ratlara operasyon öncesi 3. gün ile operasyon sonrası 7. gün arasında 1 mg/kg/gün takrolimus vermişlerdir. Sonuçta takrolimus verilen grupta (n=9) %431.8 rejenerasyon saptamışlar, sadece %70 hepatektomi yapılan grupta (n=4) %358 rejenerasyon saptamışlar ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermişlerdir ($p<0.0001$).

Loreal ve ark. ile Blanc ve ark.'nın çalışmalarında ise takrolimusun antiproliferatif ve sitotoksik olduğu gösterilmiştir (40, 41). Navarro-Villarán ve ark. (42) yaptıkları immünsüpresif ilaçların etkileriyle ilgili bir çalışmada, takrolimusun baskın pro-apoptotik etkisini göstermişlerdir (takrolimus>everolimus>sirolimus). Cao ve ark. (43) ise yaptıkları bir çalışmada karaciğer kanser hücreleri üzerinde takrolimusun antiproliferatif etkilerini göstermişlerdir.

Takrolimusun karaciğer rejenerasyonuna etkisiyle ilgili belki de en kapsamlı öncü çalışmaları Francavilla ve ark. yapmışlardır. 1989 yılında yayınlanan (44) çalışmalarında %40 (N=8) ve %70 (N=15) hepatektomi yaptıkları ratlarda, operasyon öncesi 4 gün boyunca takrolimus verdikleri gruplarda, kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde postoperatif 1. günde daha fazla rejenerasyon saptamışlardır. Bu etkiyi hepatektomi yapılmayan ratlarda gözlememişlerdir. Sonuçta takrolimusun T-hücre fonksiyonunu baskılayıcı etkisi nedeniyle, immün sistemin rejenerasyon üzerindeki inhibe edici etkilerini kaldırdığını düşünmüşlerdir. Daha sonra aynı ekibin 1991 yılında yayınlanan (45) çalışmasında T-hücre defisit ratlara %70 hepatektomi (N=10) yapmışlar ve ratlara operasyon

öncesi 3. günden itibaren hemen operasyon sonrasına kadar günlük takrolimus uygulamışlardır. Postoperatif 1. gündeki sakrifiye rat karaciğer dokusunda, kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı oranda rejenerasyon artışı saptamışlardır. Ayrıca, yaptıkları in-vitro çalışmada direk hepatosit kültürüne takrolimus uygulandığında rejenerasyonun artmadığını, rat serumunun hepatosit kültürüne verildiğinde rejenerasyonun arttığını, özellikle rat serumuyla birlikte takrolimus verildiğinde rejenerasyonun çok daha fazla arttığını göstermişlerdir. Bu çalışma sonrasında takrolimusun non-immün bir mekanizmayla rejenerasyonu arttırdığını düşünmüşlerdir.

Tamura ve ark. (46) çalışmalarında, ratlara uyguladıkları %70 hepatektomi öncesindeki 3 gün ve sonrasındaki 2 gün boyunca operasyon günü dahil ratlara her gün 1mg/kg takrolimus vermiş ve operasyon sonrası her 12 saatte bir rat gruplarını sakrifiye etmişlerdir. 36. saatte DNA sentez hızının maksimum değere ulaştığını saptamışlardır. 36. ve 48. saatlerdeki DNA sentez hızında, kontrol grubuyla kıyaslandığında takrolimus verilen grubun lehine istatistiksel anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (ortalama 2,2 kat daha fazla). Yaptıkları incelemeler sonucunda takrolimusun etkisini, HGF ve TGF- β 1 in değerlerini değiştirerek değil, NK hücrelerin aktivitesini azaltarak gösterdiğini saptamışlardır.

Literatürde takrolimusun iskemi reperfüzyon hasarına ilişkin etkilerini de araştıran yayınlar mevcuttur. Örneğin; Kawano ve ark.'nın (47) çalışmasında ratlara 4 gün boyunca 1 mg/kg/gün takrolimus verilmiş, ardından rat karaciğerlerine 60 dk boyunca normotermik iskemi uygulanmış ve ardından reperfüzyon sağlanmıştır. 7 günlük sağ kalım oranları takrolimus verilenlerde %80, verilmeyenlerde %50 olarak saptanmış ($p<0,05$). Takrolimus verilen grupta serum TNF ve AST değerleri de anlamlı ölçüde daha az bulunmuştur.

Wakabayashi ve ark. (48) çalışmalarında ratlara 4 gün 1 mg/kg/gün takrolimus vermişler ve ardından hepatoduodenal ligamenti 30 dk boyunca klemplemiş ve ardından reperfüzyon sağlamışlar. ^{31}P magnetic resonance spectroscopy kullanılarak yaptıkları incelemede karaciğerin enerji iyileşme durumunun kontrol grubuna göre daha iyi olduğunu göstermişler ve ayrıca yaptıkları histolojik incelemede de takrolimus verilen grupta iskemik hasarın daha az olduğunu göstermişlerdir.

Sawada ve ark.'nın (49) 22 domuzda yaptıkları çalışmada; operasyon öncesi 4 gün 1 mg/kg/gün takrolimus verdikleri 5 domuza portokaval şant uygulayıp, sonrasında 180 dk hepatik arter ve portal veni klempleyip, ardından reperfüzyon sağlayarak oluşturdukları modelde, deney grubunda 1 haftalık izlemde hiç mortalite saptamamışlar, takrolimus verilmeyip 180 dk klempaj yapılan grupta %85.7 mortalite oranı saptamışlardır.

Klinikte karaciğerdeki iskemi reperfüzyon hasarı elektif karaciğer tümör cerrahilerinde ve karaciğer transplantasyonu operasyonlarında kanama kontrolü amacıyla uygulanan Pringle Manevrası sonrasında görülmektedir. Pringle Manevrası uygulanmış sınırdaki bir greftle gerçekleştirilen karaciğer transplantasyonu operasyonu sonrasında greft karaciğerin rejenerasyon kapasitesi hayati bir önem arz etmektedir. Literatürde bu kapasiteyi arttıracak çeşitli ilaçlar denenmiştir; Tanemura ve ark. (50) ratlara thrombomodulin vererek, Taki-Eldin ve ark. (51) ratlara triiodothyronine vererek, Yirmibesoglu ve ark. (52) ratlara lisinopril vererek, Hiranuma ve ark. (53) ratlara edaravone vererek, ardından Pringle Manevrası ile birlikte iskemi ve reperfüzyon oluşturup yaptıkları parsiyel hepatektomi modellerinde, iskemi reperfüzyonun olumsuz etkilerini azalttıklarını göstermişlerdir.

Çalışmamızda karaciğer transplantasyonları sonrasında sıklıkla kullanılan potent bir immünsüpresif ilaç olan takrolimusun, ratlarda oluşturulan deneysel %70 hepatektomi modelinde hepatik rejenerasyona olan etkisini inceledik. Operasyondan sonraki günden itibaren 5 gün süre ile her gün intraperitoneal olarak verdiğimiz 1 mg/kg dozda takrolimusun postoperatif 1. hafta sonunda etkisine baktığımızda, gerek Pringle Manevrası uygulanan gerekse uygulanmayan gruptaki ratları, kontrol gruplarıyla kıyasladığımızda; takrolimusun mitotik indeks ve ağırlık indekslerinde anlamlı bir farklılığa yol açmadığını gözlemledik. Bu sonuç bize; her ne kadar takrolimusun karaciğerin rejeneratif kapasitesini arttırmadaki etkisini gösterememiş olsa da, rejeneratif kapasitesini azaltmadığını göstermesi bakımından önemlidir. Böylelikle parsiyel greftli karaciğer transplantasyonları sonrasında, hastalara etkin immünsüpresyonu sağlamak amacıyla takrolimus, rejenerasyonu azaltıcı bir yan etkisi olduğunu düşünmeksizin kullanabileceğimiz sonucuna varabiliriz.

Tang ve ark.'nın (54) çalışmasında görüldüğü gibi karaciğer rejenerasyonunu inceleyen çalışmaların çoğunda mitozun hepatektomiden sonraki 2. günde pik yaptığı ve sonrasında giderek azaldığı gösterilmiştir. Biz çalışmamızda rat sakrifikasyon işlemini postoperatif 7. günde gerçekleştirdiğimiz için ortaya çıkan mitotik indeks verilerimiz diğer çalışmalardan daha düşük çıkmış olabilir.

Çalışmamızda karaciğer rejenerasyonunun histolojik değerlendirilmesinde, phosphohistone H3 immünohistokimyasını kullanarak mitotik indeks sonuçlarına ulaştık. Karaciğer rejenerasyonunun değerlendirilmesinde PCNA, Ki-67, anti-PAA, antiribonükleotid redüktaz gibi endojen moleküllere karşı gelişen antikorları ölçen birçok immünohistokimyasal yöntem kullanılmaktadır. Furuta ve ark.'nın (55) çalışmasında kullanıldığı gibi PCNA hücre proliferasyonunu göstererek rejenerasyonu göstermede daha güçlü bir parametredir. Bu

sebepten ötürü çalışmamızda karaciğer rejenerasyonunu değerlendirmede, diğer güncel çalışmalar kadar kesin veriler saptayamamış olabiliriz.

Sonuç olarak, elde ettiğimiz bu veriler ışığında söyleyebiliriz ki; parsiyel karaciğer greftli alıcılar için takrolimus hepatik rejenerasyonu azaltmaması sebebiyle etkin bir immüsüpresif tedavi için güvenle kullanılabilir.



5. KAYNAKLAR

1. Aktümsek A. Anatomi ve Fizyoloji İnsan Biyolojisi. 3. Baskı, Ankara, Nobel Yayınları. 2006:366-7.
2. TE A. Cecil Essentials of Medicine. 5th Ed., WB Saunders Company, Philadelphia. 2001:365-98.
3. Junqueira LC CJ. Temel Histoloji. Temel Histoloji. 2006:44.
4. Januire LC CJ, Long JA. Digestive Tract. Basic Histology 5th Ed California. 1996:354-79.
5. AC G. Liver. Guyton Textbook of medical physiology 7th Ed Philadelphia: WB Saunders Company. 1986:1203-8.
6. Ankoma-Sey V. Hepatic Regeneration-Revisiting the Myth of Prometheus. News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society. 1999;14:149-55.
7. Carnerio J KR. Sindirim Kanalına Bağlı Bezler. Temel Histoloji 1 Baskı İstanbul: Barış Kitabevi. 1998:307-19.
8. Holt DR, Thiel DV, Edelstein S, Brems JJ. Hepatic resections. Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960). 2000;135(11):1353-8.
9. Fausto N WE. Liver regeneration. In: Arias I, Boyer J, Fausto N. Eds. The liver: biology and pathobiology. New York: Raven Pres. 1994:1059-84.
10. Perek S KS. Cerrahi Gastroenteroloji. 5. Basım. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2000:194-208.
11. Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. Hepatology. 2004;39(6):1477-87.
12. Weglarz TC, Sandgren EP. Timing of hepatocyte entry into DNA synthesis after partial hepatectomy is cell autonomous. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000;97(23):12595-600.
13. Fujii H, Hirose T, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, Fujikawa T, et al. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. Journal of hepatology. 2002;36(5):653-9.
14. Higgins GM AR. Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Arch Pathol. 1931;12(2):186- 202.

15. Tannuri AC, Tannuri U, Coelho MC, Santos NA, Mello ES. Experimental models of hepatectomy and liver regeneration using newborn and weaning rats. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. 2007;62(6):757-62.
16. Bucher NLR LS. Liver regeneration following partial hepatectomy; genes and metabolism. *Liver Growth and Repair*. London: Chapman & Hall. 1998:3- 27.
17. Anderson WR, Zieve L, Lindblad S. Ultrastructural study of hepatic regeneration following one-lobe, two-lobe, and subtotal hepatectomy in the rat. *Experimental pathology*. 1990;38(1):61-72.
18. Yoshimura Y, Kubo S, Shirata K, Hirohashi K, Tanaka H, Shuto T, et al. Risk factors for postoperative delirium after liver resection for hepatocellular carcinoma. *World journal of surgery*. 2004;28(10):982-6.
19. Shimada M, Takenaka K, Fujiwara Y, Gion T, Shirabe K, Yanaga K, et al. Risk factors linked to postoperative morbidity in patients with hepatocellular carcinoma. *The British journal of surgery*. 1998;85(2):195-8.
20. Ibrahim S, Chen CL, Lin CC, Yang CH, Wang CC, Wang SH, et al. Intraoperative blood loss is a risk factor for complications in donors after living donor hepatectomy. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2006;12(6):950-7.
21. Pringle JH. V. Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma. *Annals of surgery*. 1908;48(4):541-9.
22. Gurusamy KS, Kumar Y, Ramamoorthy R, Sharma D, Davidson BR. Vascular occlusion for elective liver resections. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2009(1):Cd007530.
23. Shimoda M, Iwasaki Y, Sawada T, Kubota K. Protective effect of ischemic preconditioning against liver injury after major hepatectomy using the intermittent pringle maneuver in swine. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2007;74(1):42-9.
24. Mitsuoka H, Schmid-Schonbein GW. Mechanisms for blockade of in vivo activator production in the ischemic intestine and multi-organ failure. *Shock*. 2000;14(5):522-7.
25. Jeon BR, Yeom DH, Lee SM. Protective effect of allopurinol on hepatic energy metabolism in ischemic and reperfused rat liver. *Shock*. 2001;15(2):112-7.

26. Welborn MB, 3rd, Douglas WG, Abouhamze Z, Auffenburg T, Abouhamze AS, Baumhofer J, et al. Visceral ischemia-reperfusion injury promotes tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) dependent organ injury in the mouse. *Shock*. 1996;6(3):171-6.
27. Huber TS, Gaines GC, Welborn MB, 3rd, Rosenberg JJ, Seeger JM, Moldawer LL. Anticytokine therapies for acute inflammation and the systemic inflammatory response syndrome: IL-10 and ischemia/reperfusion injury as a new paradigm. *Shock*. 2000;13(6):425-34.
28. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *The Journal of pathology*. 2000;190(3):255-66.
29. Rose S, Floyd RA, Eneff K, Buhren V, Massion W. Intestinal ischemia: reperfusion-mediated increase in hydroxyl free radical formation as reported by salicylate hydroxylation. *Shock*. 1994;1(6):452-6.
30. Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, Harken AH, et al. Ischemia alone is sufficient to induce TNF-alpha mRNA and peptide in the myocardium. *Shock*. 2002;17(2):114-9.
31. Myers SI, Hernandez R, Turnage RH, Bartula L, Taylor-Kalley B. Resuscitation of ischemia/reperfusion with hyperalimentation increases intestinal PGI2 synthase (PS) content and PGI2 release. *Shock*. 1995;3(6):422-9.
32. Riedemann NC, Ward PA. Complement in ischemia reperfusion injury. *The American journal of pathology*. 2003;162(2):363-7.
33. Zhang XS, Luo HD, Tao Y, Wang YY, Jiang XH, Jiang H, et al. FkbN and Tcs7 are pathway-specific regulators of the FK506 biosynthetic gene cluster in *Streptomyces tsukubaensis* L19. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2016;43(12):1693-703.
34. Goto T, Kino T, Hatanaka H, Nishiyama M, Okuhara M, Kohsaka M, et al. Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplantation proceedings*. 1987;19(5 Suppl 6):4-8.
35. Francavilla A, Barone M, Starzl TE, Zeevi A, Scotti C, Carrieri G, et al. FK 506 as a growth control factor. *Transplantation proceedings*. 1990;22(1):90-2.
36. Francavilla A, Starzl TE, Barone M, Zeng QH, Porter KA, Zeevi A, et al. Studies on mechanisms of augmentation of liver regeneration by cyclosporine and FK 506. *Hepatology*. 1991;14(1):140-3.
37. Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, Dahmen U. Marginal hepatectomy in the rat: from anatomy to surgery. *Annals of surgery*. 2006;244(1):89-98.

38. FC F. A morphologic study of regeneration of the liver after partial removal. *Arch Pathol.* 1929;7: 956-77.
39. Chavez R, Jamieson N, Takamori S, Nivatvongs S, Pino G, Metcalfe A, et al. Hepatotrophic effect of cyclosporine and FK 506 is not mimicked by rapamycin. *Transplantation proceedings.* 1999;31(6):2429.
40. Blanc P, Etienne H, Daujat M, Fabre I, Pichard L, Domergue J, et al. Antiproliferative effect of FK 506 and cyclosporine on adult human hepatocytes in culture. *Transplantation proceedings.* 1991;23(6):2821-4.
41. Loreal O, Fautrel A, Meunier B, Guyomard C, Guillouzo A, Launois B. FK 506 is less cytotoxic than cyclosporine to human and rat hepatocytes in vitro. *Transplantation proceedings.* 1991;23(6):2825-8.
42. Navarro-Villaran E, Tinoco J, Jimenez G, Pereira S, Wang J, Aliseda S, et al. Differential Antitumoral Properties and Renal-Associated Tissue Damage Induced by Tacrolimus and Mammalian Target of Rapamycin Inhibitors in Hepatocarcinoma: In Vitro and In Vivo Studies. *PloS one.* 2016;11(8):e0160979.
43. Cao XW, Fu ZR, Ding GS. Effects of tacrolimus on proliferation, apoptosis, and fluorouracil sensitivity of liver cancer cell line of SMMC-7721. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT.* 2005;4(2):269-73.
44. Francavilla A, Barone M, Todo S, Zeng Q, Porter KA, Starzl TE. Augmentation of rat liver regeneration by FK 506 compared with cyclosporin. *Lancet (London, England).* 1989;2(8674):1248-9.
45. Francavilla A, Starzl TE, Barone M, Zeng Q-H, Porter KA, Zeevi A, et al. Studies on Mechanisms of Augmentation of Liver Regeneration by Cyclosporine and FK 506. *Hepatology (Baltimore, Md).* 1991;14(1):140-3.
46. Tamura F, Masuhara A, Sakaida I, Fukumoto E, Nakamura T, Okita K. FK506 promotes liver regeneration by suppressing natural killer cell activity. *Journal of gastroenterology and hepatology.* 1998;13(7):703-8.
47. Kawano K, Kim YI, Kai T, Ishii T, Tatsuma T, Morimoto A, et al. Evidence that FK506 alleviates ischemia/reperfusion injury to the rat liver: in vivo demonstration for suppression of TNF- α production in response to endotoxemia. *European surgical research Europaische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes.* 1994;26(2):108-15.
48. Wakabayashi H, Karasawa Y, Tanaka S, Kokudo Y, Maeba T. The effect of FK506 on warm ischemia and reperfusion injury in the rat liver. *Surgery today.* 1994;24(11):994-1002.

49. Sawada T, Inoue K, Tanabe D, Kawamoto S, Tsuji T, Tashiro S. Experimental Studies on Protective Effects of FK506 Against Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. *The journal of medical investigation : JMI*. 2016;63(3-4):262-9.
50. Tanemura A, Kuriyama N, Azumi Y, Ohsawa I, Kishiwada M, Mizuno S, et al. Thrombomodulin administration attenuates ischemia-reperfusion injury of the remnant liver after 70% hepatectomy in rats: simulated model of small-for-size graft in living donor liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 2014;46(4):1107-11.
51. Taki-Eldin A, Zhou L, Xie HY, Chen KJ, Yu D, He Y, et al. Triiodothyronine attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in a partial hepatectomy model through inhibition of proinflammatory cytokines, transcription factors, and adhesion molecules. *The Journal of surgical research*. 2012;178(2):646-56.
52. Yirmibesoglu OA, Buyukgebiz O, Ars D, Unay O, Cevik D. Lisinopril inhibits endothelin-1 in the early period of hepatic reperfusion injury in a partial hepatectomy model. *Transplantation proceedings*. 2011;43(7):2524-30.
53. Hiranuma S, Ito K, Noda Y, Ozasa H, Koike Y, Horikawa S. Amelioration of hepatic ischemia/reperfusion injury in the remnant liver after partial hepatectomy in rats. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2007;22(12):2167-72.
54. Tang TX, Hashimoto T, Chao LY, Itoh K, Manabe T. Effects of partial pancreatectomy on liver regeneration in rats. *The Journal of surgical research*. 1997;72(1):8-14.
55. Furuta K, Kakita A, Takahashi T, Tomiya T, Fujiwara K. Experimental study on liver regeneration after simultaneous partial hepatectomy and pancreatectomy. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2000;17(3):223-36.

6. EKLER

Ek 1. Hayvan deneyleri Yerek Etik Kurulu Onayı



Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 01/09/2017
Toplantı Tarihi : 02 Mayıs 2017

35340 İnciraltı İzmir-232 4122234

Sayın, Yard.Doç.Dr.Mücahit ÖZBİLGİN
DEÜ Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı

17/2017 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Ratlarda Oluşturulan Deneysel Pringle Manevrası Sonrası Yapılan Majör (%70) Hepatektomi Modelinde İntraperitoneal Uygulanan Tacrolimus'un Karaciğer Rejenerasyonuna Etkisinin Değerlendirilmesi" isimli, Emre Karadeniz, Tarkan Ünek, Tufan Egeli, Cihan Ağalar, Anıl Ağalar, Hülya Ellidokuz, Özgül Sağol, İbrahim Astarcioglu'nun araştırmacı olduğu 35 adet Wistar Albino talep edilen projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof. Dr. Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı

Prof. Dr. Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili

Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
Üye

Prof. Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye

Prof. Dr. Gülgün OKTAY
Üye (Topl. Katılmadı)

Prof. Dr. Günay KIRKIN
Üye

Prof. Dr. Türkan ERTAY
Üye

Prof. Dr. Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Danışman

Doç. Dr. Nergiz DURMUS
Üye

Doç. Dr. Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye

Doç. Dr. Zekiye Sultan ALTUN
Üye

Yard. Doç. Dr. Orhan KALEMCI
Üye (Topl. Katılmadı)

Zehra KINAM
Üye

Vet. Hekim Adnan SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin başvuru formunda **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.