

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

**STEATOTİK KARACİĞERLİ RATLARDA %70
HEPATEKTOMİ ÖNCESİ VERİLEN
GRANÜLOSİT KOLONİ STİMÜLE EDİCİ
FAKTÖRÜN KARACİĞER
REJENERASYONUNA OLAN ETKİSİ
(DENEYSEL ÇALIŞMA)**

UZMANLIK TEZİ

SADIK EMRE DİREK

İZMİR-2013

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

**STEATOTİK KARACİĞERLİ RATLARDA %70
HEPATEKTOMİ ÖNCESİ VERİLEN
GRANÜLOSİT KOLONİ STİMÜLE EDİCİ
FAKTÖRÜN KARACİĞER
REJENERASYONUNA OLAN ETKİSİ
(DENEYSEL ÇALIŞMA)**

SADIK EMRE DİREK

İZMİR-2013

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ: PROF.DR.İBRAHİM ASTARCIOĞLU

Bu proje için etik onayı Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul tarafından 20/2011 karar numarası ile verilmiştir.

ÖNSÖZ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndaki Genel Cerrahi Uzmanlık eğitimim boyunca bana emeği geçen, bilgi, görgü ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. İbrahim Astarıcıoğlu, Prof. Dr. Ömer Harmancıoğlu, Prof. Dr. Mehmet Füzün, Prof. Dr. Hüseyin Gülay, Prof. Dr. Seymen Bora, Prof. Dr. Serdar Saydam, Prof. Dr. Cem Terzi, Prof. Dr. Selman Sökmen, Prof. Dr. Sedat Karademir, Prof. Dr. Mehmet Ali Koçdor, Doç. Dr. Koray Atila, Doç. Dr. Tarkan Ünek, Doç. Dr. Ali Sevinç, Doç. Dr. Aras Emre Canda, Yard. Doç. Dr. Mücahit Özbilgin, Uz.Dr. Tufan Egeli'ye teşekkürü borç bilirim.

Genel Cerrahi uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalıştığım asistan arkadaşlarıma, Anabilim Dalımızın tüm sekreter, teknisyen ve personeline, ameliyathanede beraber çalıştığımız hemşire ve personel arkadaşlara desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Uzmanlık tezimin hazırlanmasında desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, katkı ve yardımlarını her zaman gördüğüm Hocam Prof. Dr. İbrahim Astarıcıoğlu ve Doç.Dr. Tarkan Ünek'e teşekkürü özellikle bir borç bilirim.

Yine tezin hazırlanmasında katkılarını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Özgül Sagol'a candan teşekkür ederim. Uzmanlık eğitimim boyunca beni büyük bir özveri ve sabırla destekleyen sevgili eşim Uz.Dr. Meltem Çobanoğulları Direk'e ve aileme teşekkür ederim.

Dr. Sadık Emre Direk

İzmir-2013

İÇİNDEKİLER

Tablo ve Şekil Listesi.....	ii
Kısaltmalar	iii
1.ÖZET VE İNGİLİZCE ÖZET.....	1
2.GİRİŞ VE AMAÇ	5
3.GENEL BİLGİLER	7
A.Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı	7
Tanım	7
Prevelans ve İnsidans	8
Risk Faktörleri	9
Patogenez	10
Histolojik Bulgular	16
Tanı	18
B.Ratlarda Karaciğer Anatomisi ve Karaciğer Rezeksiyon Modelleri	18
C.Karaciğer Rejenerasyonu	20
D.Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör	24
4.GEREÇ VE YÖNTEM	26
5. BULGULAR	35
6. TARTIŞMA	46
7. SONUÇLAR	47
8. KAYNAKLAR.....	48

TABLolar VE ŐEKİLLER

Tablo 1. Yağlı Karaciğer Hastalığının Sebepleri

Tablo 2. Yağlı Dietin İeriği

Tablo 3. G-CSF Verilen ve G-CSF Verilmeyen Ratlarda Makroveziküler, Mikroveziküler Yağlanma Oranları ve Kİ-67 İndeksi

Tablo 4. Karaciğer Yağlanması Olup G-CSF Verilen ve G-CSF Verilmeyen Grupların Kİ-67 İndeksinin Karşılaştırılması.

Tablo 5. Ratların Preoperatif Laboratuvar Değerleri

Tablo 6. Ratların Postoperatif Labaratuvar Değerleri

Tablo 7. G-CSF Verilmeyen Grupta Ortalama Preoperatif Laboratuvar Değerleri ile Postoperatif Laboratuvar Değerlerinin Karşılaştırılması

Tablo 8. G-CSF Verilen Grupta Ortalama Preoperatif Laboratuvar Değerleri ile Postoperatif Laboratuvar Değerlerinin Karşılaştırılması

Tablo 9. Makroveziküler ve Mikroveziküler Yağlanmanın Kİ-67 İndeksine Etkisi

Tablo 10. Karaciğerde Steatoz Sağlanan ve Sağlanamayan Ratların Kİ-67 İndeksinin Karşılaştırılması

Şekil 1. Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığının Patogenezinde Muhtemel Mekanizmalar

Şekil 2. Rat Karaciğer Anatomisi

Şekil 3. Ratlarda Parsiyel Hepatektominin Şematik Açıklanması

Resim 1. Ratların 8 Hafta Boyunca Beslendiği %70 Yağlı Dietin Görünümü

Resim 2. Lateral Sol Lob Pedikül Ligasyonu

Resim 3. Medial Lob Pedikül Ligasyonu

Resim 4. % 70 Hepatektomi Sonrası Karaciğer Görünümü

Resim 5. Hepatektomi materyali

Resim 6. Postoperatif 5.gün Laparotomi

Resim 7. Postoperatif 5.gün Hepatektomi Materyali

Resim 8. Makroveziküler steatoz (H&E, X200)

Resim 9. Makroveziküler steatoz (PAS, X400).

Resim 10. Ki-67 5.günde nükleer boyanma (X100).

Resim 11. Kİ-67 5.günde nükleer boyanma (X400).

KISALTMALAR

G-CSF:	Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör
NASH:	Non-Alkolik Steatohepatit
NAYKH:	Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı
HSC:	Hematopoetik Kök Hücre
US:	Ultrasonografi
BT:	Bilgisayarlı Tomografi
VLDL:	Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
Rad:	Diabet İle İlişkili Ras
PC-1:	İnsulin Direncinde Rolü Olan Membran Proteini
TNF-α:	Tümör Nekroz Faktör-alfa
PPAR- α:	Peroksizom Prolifere Aktive Reseptör-alfa
MDA:	Malondialdehit
HNE:	4-Hidroksinoneal
HGF:	Hepatosit Büyüme Faktörü
IL-6 :	Interlokin-6
IL-2:	Interlokin-2
EGF:	Epidermal Büyüme Faktörü
NFκB:	Nükleer Faktör Kappa B
TGF- α:	Transforme Edici Büyüme Faktörü-alfa,
HSS:	Hepatosit Uyarıcı Madde
FGF:	Fibroblast Büyüme Faktörü
VEGF:	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
T3:	Triiyodotironin
PGE2:	Prostaglandin E2
AST:	Aspartat Aminotransferaz
SGOT:	Serum Glutamik Oksaloasetatik Asit Transferaz
SGPT:	Serum Glutamik Prüvik Transferaz
HE:	Hemotoksilen-Eozin
STAT-3:	Transkripsiyon-3 ü Uyaran Signal İletici
ABD:	Amerika Birleşik Devletleri

1.ÖZET

Amaç

Steatotik karaciğerli ratlarda %70 hepatektomi öncesi verilen granülosit koloni stimüle edici faktörün (G-CSF) karaciğer rejenerasyonuna olan etkisini araştırmak

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışmada, ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen, erkek Wistar-Albino ratlar kullanıldı. Ratlarda karaciğer yağlanması oluşturmak için Lieber ve Carli tarafından tanımlanan karaciğer yağlandırma modeli kullanıldı.

Ratlarda yeterli steatohepatit oluştuğunun kanıtlanması için çalışmanın başlamasından önce pilot çalışma olarak 8 hafta boyunca 3 rat %70 yağlı diyet ile beslenerek karaciğer biyopsisi alındı. Bu ratlarda patolojik olarak karaciğerde steatohepatit derecesinin 2 ve üzerinde olduğu saptanarak steatohepatit modelinin yeterli şekilde uygulanmış olduğu görüldü.

Çalışmada 3 grup oluşturuldu.

Grup 1: Steatohepatit derece 2 ve üzerinde karaciğer yağlanması oluşturulan 7 rata, %70 hepatektomi yapılmasından önceki 5 gün boyunca 50 mcg (5MU) dozunda G-CSF (Neupogen®, Roche, Amgen, Zug, Switzerland) %5 dextroz ile karıştırılarak subkutan olarak uygulandı.

Grup 2: Steatohepatit derece 2 ve üzerinde karaciğer yağlanması oluşturulan 7 rata, %70 hepatektomi yapılmasından önceki 5 gün boyunca 1dzm %5 dextroz solüsyonu subkutan olarak verildi.

Grup 3: Steatohepatit yapılmayan 7 rata 5 gün boyunca 1dzm subkutan %5 dextroz solüsyonu uygulandı.

Grup 1 ve 2'deki ratlardan %70 hepatektomi yapılmasından hemen önce ve Grup 3'teki ratlardan ise %5 dextroz solüsyonu uygulanmasının 5. gününde biyokimya ölçümleri için kuyruk veninden kan alındı.

Grup 1 ve 2'deki ratlara %70 hepatektomi sonrası 5. gün total hepatektomi uygulanarak karaciğer dokusu rejenerasyonun değerlendirilmesi için patolojik incelemeye gönderildi. İntrakardiyak olarak kan alındıktan sonra biyokimya ölçümleri için biyokimya

laboratuvarına gönderildi. Karaciğer rejenerasyonunu göstermek için patoloji laboratuvarında Kİ-67 indeksine bakıldı.

İstatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 15.0 programı kullanıldı.

BULGULAR

Karaciğer yağlanması olup G-CSF verilen grupta karaciğer rejenerasyonu anlamlı olarak daha fazladır ($p= 0,002$). G-CSF verilmeyen grupta postoperatif 5.günde ast,alp ve direk bilirubin değerleri anlamlı olarak artmıştır. G-CSF verilen yağlı karaciğer grubunda ast, alt, alp ve total bilirubin değerleri anlamlı olarak artmıştır. Makroveziküler ve mikroveziküler yağlanma oranı arttıkça Kİ-67 indeksi azalmaktadır.

SONUÇ

G-CSF steotatik karaciğerli ratlarda rejenerasyonu arttırmaktadır. Karaciğer yağlanması rejenerasyonu baskılamaktadır.

ABSTRACT

Aim

To investigate the effect of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) given before 70% hepatectomy on liver regeneration in rats with steatotic liver

Material-Method

This study was performed in Laboratory of Experimental Animals in Dokuz Eylül University School of Medicine. In the study, male Wistar-Albino rats at the average weight of 200-250 gr were used. The liver fattening model described by Lieber and Carli was used to generate liver fattening in rats.

As a preliminary study, 3 rats were fed 70% fat rich diet during 8 weeks and then liver biopsy was performed to prove that the rats had sufficient level steatohepatitis. After we detected pathologically that the grades of steatohepatitis were 2 or higher in all 3 rats, we decided that the steatohepatitis model was performed successfully.

Three groups were chosen in the study:

Group 1: G-CSF (Neupogen®, Roche, Amgen, Zug, Switzerland) at the dose 50 mcg (5MU) mixed with 5% dextrose was injected subcutaneously for 5 days before the 70% hepatectomy to 7 rats which had grade 2 or higher steatohepatitis.

Group 2: 5% dextrose solution at the dose 1 dzm was injected subcutaneously for 5 days before the 70% hepatectomy to 7 rats which had grade 2 or higher steatohepatitis.

Group 3: 5% dextrose solution at the dose 1 dzm was injected subcutaneously for 5 days to 7 rats which had no steatohepatitis.

For biochemical evaluation, blood was taken from the tail vein just before the 70% hepatectomy in group 1 and 2 and on fifth day of injection of 5% dextrose solution in group 3.

In group 1 and 2, total hepatectomy was performed on the fifth day after the 70% hepatectomy and liver tissue was sent for pathological investigation of liver regeneration. Intracardiac blood was taken for biochemical investigation. Ki-67 proliferation index was evaluated pathologically to show liver regeneration.

SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 15.0 programme was used for statistical analysis.

Results

In group 1, liver regeneration was statistically higher ($p=0,002$). In the group which did not receive G-CSF, the levels of AST, ALP and direct bilirubine were statistically higher on postoperative fifth day. In Group 1, the levels of AST, ALT, ALP and total bilirubine were

statistically higher. The increase of macro and microvesicular steatosis reduces the Ki-67 proliferation index.

Conclusion

G-CSF stimulates liver regeneration in rats with steatotic liver. The steatosis suppresses the liver regeneration.

2.GİRİŞ VE AMAÇ

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı önemli miktarda alkol alımı olmayan kişilerde ortaya çıkan alkole bağlı yağlı karaciğer hastalığının histolojik özelliklerini gösteren bir hastalıktır. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) basit steatozdan, steatohepatite, ileri derecede fibroza ve siroza kadar gidebilen geniş bir spekturuma sahiptir.

Karaciğer yağlanması, lipidlerin karaciğer ağırlığının %5'ten fazlasını oluşturması ya da histopatolojik incelemede hepatositlerin %5'ten daha fazlasında yağ vakuollerinin görülmesi olarak tanımlanır (1). Pratikte karşılaştığımız yağlı karaciğer olguları, NAYKH olarak incelediğimiz basit steatoz ve non-alkolik steatohepatit (NASH) olgularıdır (2). Genel populasyonda yağlı karaciğer %20, NASH %3 sıklığında gözlenir (3,4,5).

Hepatosteatoz olgularında karaciğer dokusunda inflamasyon bulunmazken NASH'de inflamasyon bulunmaktadır. NASH'lı hastaların yaklaşık olarak yarısında karaciğer fibrozisi, %15'inde siroz gelişmektedir. Bu olguların %3 karaciğer yetmezliğine ilerlemekte ya da karaciğer transplantasyonu gerektirmektedir (6).

Karaciğerin bir bölümünün çıkarılması karaciğerin selim ve kötü huylu hastalıklarının tedavisinde önemli bir yöntemdir. Karaciğerin parsiyel rezeksiyonu için endikasyonlar arasında primer ve sekonder malign tümörler, benign tümörler, travmatik rüptürler, canlıdan karaciğer nakli, kistler ve abseler vardır (7,8). Major karaciğer rezeksiyonlarından sonra kalan karaciğer dokusunun fonksiyonel ve rejeneratif kapasitesi ameliyat sonrası mortalite ve morbiditeyi önemli ölçüde etkiler (8).

İnsan karaciğerinin %80-85'e varan rezeksiyonları bile tolere edebildiği ve rejene olabildiği bildirilmektedir (8,9). Rezeksiyon %10'dan az olsa bile rejenerasyon olmaktadır (10). Hepatosit hücre bölümlerinden kaynaklanan çeşitli hepatosit büyüme faktörlerinin araştırılması ve rejenerasyonun farklı evrelerinde gen ekspresyonunun monitorize edilmesi, karaciğer rejenerasyonunu anlamamızda önemli ilerlemelere sebep olmuştur (10).

Karaciğer transplantasyonunda önemli bir etken olan karaciğer yağlanması canlı donörlerin NASH olması allogreftte primer nonfonksiyone risklerini arttırmaktadır. Hastalarda son dönem karaciğer hastalığı ve siroz gelişme ihtimali artmaktadır (11).

Granülosit koloni stimulan faktör (G-CSF) nötrofil koloni oluşturan hücrelerin proliferasyonunu ve differansiasyonunu uyaran bir hematopoetik büyüme faktörüdür (12). G-CSF reseptörleri myeloid seri hücrelerinin yanı sıra hepatositler ve vasküler endotelial hücreler gibi non-hematopoetik hücreler tarafından da eksprese edilmektedir (13). Son çalışmalar G-CSF' nin kemirgenlerde hepatik rejenerasyonu uyardığını söylemektedir.

Theocharis ve ark. ratlarda %70 hepatik rezeksiyon ve tiyoasetamide bağlı karaciğer yetmezliklerinde G-CSF tedavisinin hepatik rejenerasyonu artırdığını göstermişlerdir (14,15).

Klinik kullanım için, belli koşullar altında G-CSF nin sistemik kullanımı ile primer ve sekonder karaciğer tümörlerinde daha radikal rezeksiyonlar yapılabilir ve karaciğer rejenerasyon sürecinde geride kalan karaciğer dokusu daha iyi desteklenebilir. Karaciğer greftlerinin rejenerasyon kapasitesi G-CSF gibi uygulamalarla desteklendiği zaman hem kadavradan hem de yaşayan donörlerden segmental karaciğer transferi erişkin bireyler için güvenle yapılabilir.

3. GENEL BİLGİLER

A.Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı

Tanım

Non-alkolik yağlı karaciğer (NAYKH) hastalığı gittikçe daha iyi tanınan bir durumdur. Non-alkolik yağlı karaciğer önemli miktarda alkol alımı olmayan kişilerde ortaya çıkan alkole bağlı yağlı karaciğer hastalığının histolojik özelliklerini gösteren bir hastalıktır. Non-alkolik yağlı karaciğer basit steatozdan, steatohepatite, ileri derecede fibroza ve siroza kadar gidebilen geniş bir spekturuma sahiptir. Patolojik görüntü, alkolle indüklenen karaciğer hasarına benzer, fakat aşırı alkol kullanmayanlarda görülür (16,17). Bu hastalığı ifade etmek için yağlı karaciğer hepatiti, non-alkolik Laennec hastalığı, diyabet hepatiti, alkol benzeri karaciğer hastalığı, non-alkolik steatohepatit gibi çeşitli terimler kullanılmıştır. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı giderek daha çok tercih edilen isim haline gelmektedir. Bu terim basit steatozdan steatohepatite, ileri fibroza ve siroza kadar geniş bir karaciğer hastalığı spektrumuna karşılık gelmektedir. Steatohepatit (non-alkolik steatohepatit), Non-alkolik yağlı karaciğer içinde sadece bir evredir. Non-alkolik yağlı karaciğerin klinik önemi, genel popülasyonda sık görülmesinden, siroza ve karaciğer yetmezliğine ilerleme ihtimalinden kaynaklanmaktadır. Non-alkolik yağlı karaciğer sekonder sebeplere bağlı steatozdan (hepatitle birlikte veya tek başına) ayırt edilmelidir (Tablo 1), çünkü bu durumların patogenezi ve prognozları birbirinden oldukça farklıdır (18).

Tablo 1. Yağlı karaciğer hastalığının nedenleri

A)Metabolik Faktörler

Obezite
Diabetes Mellitus ve Hiperglisemi
Hiperlipidemi
Hızlı kilo kaybı
İntravenöz Glukoz Tedavisi
Total Parenteral Nütrisyon

B)Cerrahi Girişimler

Jejunal Bypass
Morbid obezite cerrahisinde uygulanan gastrik plasti
Biliopankreatik diversiyon, geniş ince barsak rezeksiyonu

C)İlaçlar

Glukokortikoidler
Sentetik östrojenler
Amiodaron
Kalsiyum kanal blokerları
Kumadin
Tamoksifen
Valproik asit
Tetrasiklin
Methotreksat
Perheksilin maleat
Dimetilformamid
Salisilik asit
Vitamin A

D)Diğer Faktörler

Bakteriyel aşırı çoğalmanın geliştiği jejunal divertikülözis
Parsiyel lipodistrofi
Abetalipoproteinemi
Weber Christian Hastalığı
Çölyak hastalığı
Wilson hastalığı
İnsülin reseptör mutasyonları

Prevalans ve İnsidans

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı çeşitli ülkelerde genel nüfusun %10– 24'unu etkilemektedir. Prevalans %57.5'e, hatta obez kişilerde %74'e kadar yükselmektedir (19,20). Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, çocukların %2.6'sında obez çocukların %22.5 ile %52.8'inde görülmektedir (21,22). Non-alkolik yağlı karaciğer kan verenlerde anormal karaciğer enzim sonuçlarını çok sayıda vakada açıklar. Karaciğer hastalığının diğer sebepleri dışlandıktan sonra, aminotransferaz seviyelerinde asemptomatik yükselme vakalarının

%90'nın sebebidir (23). Non-alkolik yağlı karaciğer ABD'deki erişkinlerde anormal karaciğer testi sonuçlarının en sık nedenidir (23). Amerika Birleşik Devletlerinde de NAYKH'nın prevalansı bilinmemektedir. Ama genel nüfusta tip 2 diyabetes mellitusun ve obezitenin bilinen prevalanslarından hareketle iyi bir tahmin yapılabilir. Obezite 20 yaş ve üzerindeki kişilerin %22.5'inde görülmektedir (23). Obez nüfusun üçte ikisinde (diyabetten bağımsız olarak) morbid obez insanların %90'ından fazlasında steatoz bulunmaktadır (24). Steatohepatit zayıf (ideal vücut ağırlıklarının %110'undan daha hafif olanlar) nüfusun %3'unu, obez nüfusun %19'unu, morbid obezlerin hemen hemen yarısını etkilemektedir (24). Dolayısıyla, ABD' nin 2000 yılı (23) nüfusuna bakarak, bu ülkede tahminen 30.1 milyon obez erişkinde steatoz, yaklaşık 8.6 milyon obez erişkinde de steatohepatit olduğu söylenebilir. Diyabetes mellitus ABD erişkin nüfusunun %7.8'ini etkilemekte, diyabetli hastalarında yaklaşık %50'sinde (7.8 milyon kişi ; %21 ile %78 arasında) non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı görülmektedir (23). Diyabetle obezitenin birlikteliği, ek bir risk daha getirmektedir. Diyabeti olan şiddetli obez hastaların %100'ünde en azından hafif steatoz, %50'sinde steatohepatit, %19'unda siroz bulunmaktadır (25). ABD' de NAYKH'nın prevalansı, hepatit C virusu enfeksiyonunun %1.8 olan prevalansından çok daha yüksektir (26). Yine de bu rakamlar, NAYKH'nın gerçek prevalansının altında olabilir. Çünkü pek çok hasta ne obezdir ne de diyabetiktir. Ayrıca hastalığın tanısı çocuk ve adolesanlarda gittikçe daha sık konulmaktadır.

Risk Faktörleri

Obezite, tip 2 (insuline bağımlı olmayan) diabetes mellitus (DM) ve hiperlipidemi sıklıkla NAYKH'na eşlik eden durumlardır. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı olan bazı hasta serilerinde bildirilen obezite prevalansı %30-100, tip 2 DM prevalansı %10-75, hiperlipidemi prevalansı %20-92 arasında değişmektedir (17,18). Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı olan bazı çocuklarda tip 1 diyabet görülmektedir (27). Obezite vücut kitle indeksinin (kilogram cinsinden ağırlığın metre cinsinden boyun karesine bölünmesine) en az 30 olması olarak tanımlanırsa, obez kişilerde NAYKH'nın prevalansı 4-6 kat artmaktadır (28). Tip 2 DM varlığı, vücut kitle indeksinden bağımsız olarak, NAYKH'nın riskini ve şiddetini anlamlı derecede yükseltmektedir (17,18). Trunkal obezite, vücut kitle indeksi normal kişilerde bile, NAYKH için önemli bir risk faktörüdür (29). Bir çalışmada, hiperlipidemili hastaların yaklaşık yarısında ultrasonografi incelemesinde NAYKH olduğu bulunmuştur (30). Non-

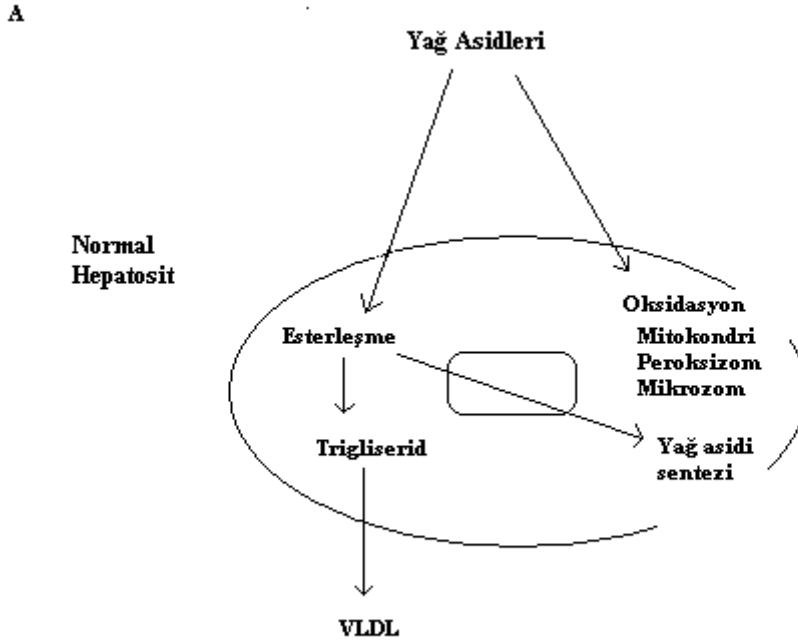
alkolik yağlı karaciğer hastalığı riskini hiperkolesterolemiden çok hipertrigliseridemi arttırmaktadır (30). Ailede steatohepatit veya kriptojenik siroz öyküsünün de bu bozuklukta risk faktörü olduğu belirtilmiştir (28). Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı her yaştan kişide görülebilir. Yine çoğu ırk grubunda tanımlanmıştır. Çoğu seride tipik non-alkolik yağlı karaciğer hastaları, orta yaşlı kadınlardır (25,28). Fakat bazı serilerde NAYKH'nın prevalansı erkeklerde daha yüksek bulunmuştur (30).

Patogenezi

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının patogenezi, hastalık ilk tanımlandığından bugüne kadar iyi anlaşılabilmiş değildir. Güncel görüşlerin çoğu varsayım düzeyindedir, çünkü hastalığın mekanizması veya mekanizmaları hala araştırılmaktadır. Niçin bazı hastalarda basit steatoz bazılarında steatohepatit ve progresif hastalık geliştiği henüz bilinmemektedir. Vücut yağının dağılımındaki veya antioksidan sistemlerdeki farklılıklar, muhtemelen genetik yatkınlık zemininde, açıklamalardan biri olabilir.

İnsulin NAYKH'nın gelişiminde en çok dile getirilen faktördür (31). İnsulin direnci, normal konsantrasyondaki insulinin normalden daha az biyolojik yanıt oluşturmaması durumudur. Başka bir anlatım ile belirli bir konsantrasyondaki insulinin glukoz uptake'ini uyarma etkisinin azalmasıdır. Normalde insulin karaciğerde glukoneogenezi ve glikojenolizi inhibe ederek hepatik glukoz üretimini baskılar. Ayrıca glukozu kas ve yağ dokusu gibi periferik dokulara taşıyarak burada ya glikojen olarak depolanmasını ya da enerji üretmek üzere okside olmasını sağlar. İnsulin direncinde insulinin karaciğer, kas ve yağ dokudaki bu etkilerine karşı direnç oluşarak hepatik glukoz sekresyonu bozulur. Kas ve yağ dokusunda da insulin aracılığı ile olan glukoz uptake azalır. Bu durumda oluşan insulin direncini karşılayacak ve dolayısıyla normal biyolojik yanıtı sağlayacak kadar insulin salgısı artışı ile metabolik durum kompanse edilir. Böylelikle hipergliseminin önlenmesi için beta hücreleri sürekli olarak insulin salgısını arttırmaya yönelik bir çaba içerisine girer. Sonuçta normoglisemi sağlanırken, insulin düzeylerinde de 1.5-2.0 kat yükseklik oluşur.

Şekil 1. Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının patogenezinde muhtemel mekanizmalar.
Şekil 1A.



Şekil 1A’da görüldüğü gibi, hepatik yağ asitleri normalde trigliseritlerle esterleşir. Trigliseritlerden bazıları çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) ile hepatositlerin dışına taşınır. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı olanlarda hepatositler içinde lipit düzeyinin artması (çoğunlukla trigliserit formunda), yağ asitlerinin alımını ve sentezini uyaran enzim sistemleriyle yine yağ asitlerinin oksidasyonunu ve hücre dışına taşınmasını uyaran enzim sistemleri arasındaki dengesizlikten kaynaklanır.

İnsulin direncinin moleküler patogenezi, anlaşıldığı kadarıyla multifaktöryeldir. İnsulin etkisinin inhibisyonunda rol oynayan bazı moleküler hedefler tanımlanmıştır. Bunlar arasında aşağıdakiler sayılabilir: Rad (ras associated with diyabet), temel hücre işlevlerini (büyüme, farklılaşma, veziküler transport ve sinyal transdüksiyonu) engeller (34). PC-1 (insulin direncinde rolü olan bir membran glikoproteini), insulin tarafından uyarılan trozin kinaz aktivitesini azaltır (34,35). Leptin, insulin reseptörü substrat-1’in defosforilasyonunu indükler; yağ asitleri, insulin tarafından uyarılan periferik glukoz alımını engeller; tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), insulin reseptörü substrat-1’in insulin tarafından indüklenen fosforilasyonunu azaltır (34,35). İnsuline bağımlı glukoz transport molekülü Glut4’ün ekspresyonunu düşürür. İnsulin direnci hepatositlerde iki temel mekanizma ile yağ birikimine yol açar: lipoliz ve hiperinsulinemi (Şekil 1B).

B

The diagram illustrates the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its progression to non-alcoholic steatohepatitis (NASH). It shows the interaction between adipose tissue and the liver (hepatocytes).

Adipoz dokü (Adipose Tissue): Releases **Artmış lipoliz** (Increased lipolysis) and **Yağ asidlerinin artmış tutulumu** (Increased accumulation of fatty acids). It also releases **TNF-alfa**, **Rad**, **PC-1**, **Leptin**, and **Yağ asidleri** (Fatty acids).

Hepatosit (Hepatocyte):

- İnsulin** (Insulin) acts on the hepatocyte.
- Yağ asidleri** (Fatty acids) enter the hepatocyte and are converted to **Yağ asitleri** (Fatty acids).
- Yağ asitleri** enter the **Mitokondrial beta oksidasyon** (Mitochondrial beta oxidation).
- Artmış sitokrom P-450 4A** and **Artmış sitokrom P-450 2E1** (Increased cytochrome P-450 4A and 2E1) are involved in **Lipid peroksidasyon** (Lipid peroxidation).
- Artmış glikoliz** (Increased glycolysis) leads to **Yağ asidi sentezi** (Fatty acid synthesis).
- Yağ asidi sentezi** leads to **Trigliserid birikimi** (Triglyceride accumulation).
- Trigliserid birikimi** leads to **VLDL** (Very Low Density Lipoprotein).
- Trigliserid birikimi** also leads to **Apolipoprotein B-100 azalma** (Decrease in Apolipoprotein B-100).
- Apolipoprotein B-100 azalma** leads to **x** (a marker of liver damage).
- x** leads to **VLDL**.

Hiperinsulinemi (Hyperinsulinemia): Affects the hepatocyte and is associated with **Artmış sitokrom P-450 4A** and **Artmış sitokrom P-450 2E1**.

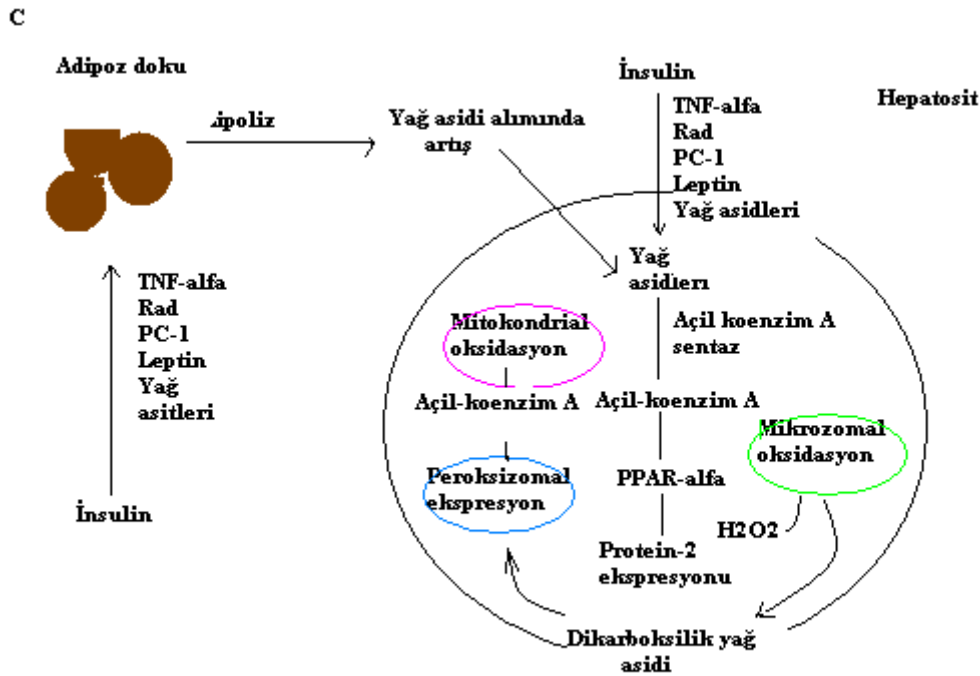
İnsulin (Insulin) also acts on the adipose tissue, leading to **Artmış lipoliz** and **Yağ asidlerinin artmış tutulumu**.

Steatohepatitli hastaların karaciğerinde sitokrom P-450 2E1 seviyesi mutlaka artar ve hepatosit membranlarında lipit peroksidasyonunu indüklemeye yeteneği olan oksijen radikallerinin üretimine yol açar (36). Sitokrom P-450 2E1 geninin baskılandığı transgenik farelerde de yaygın lipit peroksidasyonu görülmektedir (36). Bu durum başlıca rolün sitokrom P-450 4A enzimlerine ait olduğunu düşündürmektedir. İnsulin direncinden kaynaklanan hiperinsulinemi, glikolizi arttırarak hepatositlerde yağ asidi sentezini arttırmakta, karaciğerde apolipoprotein B-100 üretimini azaltarak hepatositler içinde trigliseritlerin birikimini kolaylaştırmaktadır.

12

β oksidasyonla ve peroksizomal β - oksidasyonla yakından ilişkilidir (Şekil 1C). Peroksizomal β - oksidasyon enzimlerinin eksikliğinin, makroveziküler steatozun ve steatohepatitin önemli bir sebebi olduğu anlaşılmıştır (37). Açıl-koenzim A oksidaz eksikliği çok uzun zincirli yağ asitlerinin ve dikarboksilik asitlerin oksidasyonunu bozarak yaygın mikroveziküler steatoza ve steatohepatite yol açar. Bu enzimin kaybı aynı zamanda, peroksizom-proliferatif aktive reseptor- α 'nın (PPAR- α) uzun süreli aktivasyonuna sebep olarak PPAR- α ile regüle olan genlerin transkripsiyonal up-regulasyonunu uyarabilir (37). NAYKH olan hastaların karaciğerlerinde eksprese edilen taşıyıcı protein-2'nin hepatik sentezini uyarmada da PPAR- α 'nın rolü olduğu vurgulanmıştır (37).

Şekil 1C.

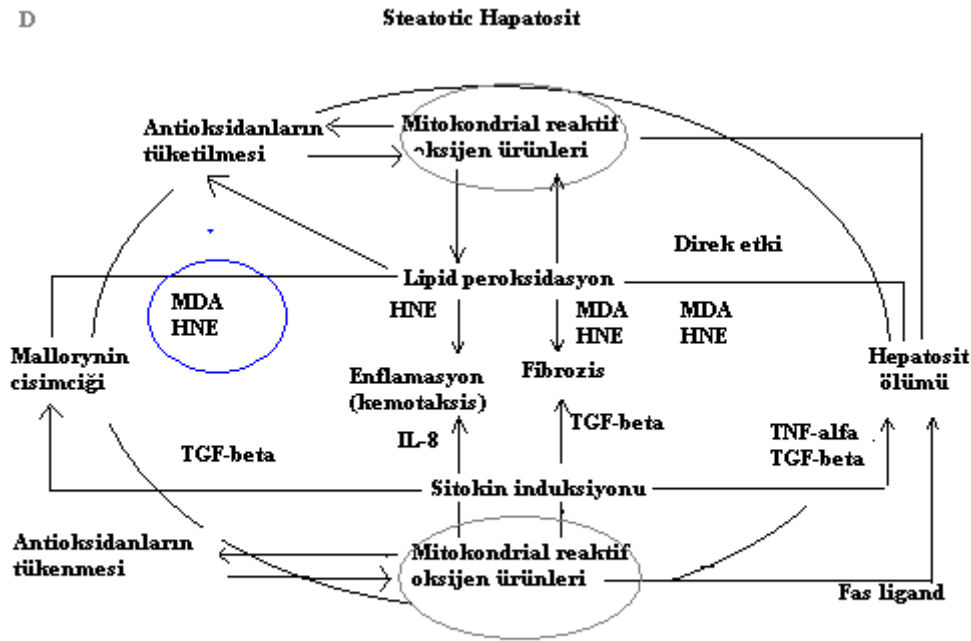


Şekil 1C'de mikrozoimal ω -oksidasyon, peroksizomal β - oksidasyon ve mitokondriyal β - oksidasyon arasındaki ilişki, ayrıca peroksizom proliferatif-aktive reseptör- α (PPAR- α) ligandın düzenleyici rolü olduğu görülmektedir. Yağ asitlerinin mikrozoimal ω -oksidasyonu sonucunda dikarboksilik yağ asitleri oluşur, bunlar da peroksizomal β -oksidasyon yoluyla yıkılır. Peroksizomal β - oksidasyon sonucunda zinciri kısalmış açıl-koenzim A ortaya çıkar. Çok uzun zincirli yağ asitleri, açıl-koenzim A sentaz etkisiyle, açıl-koenzim A'ya dönüştürülür. Açılkoenzim A peroksizomal oksidasyon için substrat olarak işlev görür, fakat

metabolize olmadan kalırsa PPAR- α ligandı olarak fonksiyonunu icra eder. PPAR- α karaciğerde mikrozomal, peroksizomal, mitokondriyal yağ asidi oksidasyonu sistemlerinde rol alan genlerin induksiyonunu kontrol eder; ayrıca taşıyıcı protein 2'nin hepatik sentezini uyarır (38). Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının patogeneğinde bu proteinin rolü hala net değildir. Hepatosit apoptozunun inhibisyonuna yardımcı olabilir. Ayrıca yağlı hepatositlerin, daha sonra sekonder saldırılara (endotoksin veya TNF- α gibi) maruz kaldıklarında hasarlanmaya yatkınlıkları artabilir (38).

Yağ asitlerinin intrahepatik seviyelerinde artış, bir oksidatif stres kaynağı meydana getirir. Bu da büyük ölçüde steatozdan steatohepatite ve siroza ilerlemeden sorumlu olabilir. Mitokondriler, reaktif oksijen türlerinin başlıca hücresel kaynağıdır. Reaktif oksijen türleri lipid peroksidasyonu, sitokin induksiyonu, Fas ligand induksiyonu ile steatohepatiti ve fibrozu başlatabilir. (Şekil 1D).

Şekil 1D.



Şekil 1D'de mitokondrial reaktif oksijen türlerinin, steatozdan steatohepatite ve fibroza ilerlemeyi üç mekanizma ile uyardığı görülmektedir: lipid peroksidasyonu, sitokin induksiyonu ve Fas ligand induksiyonu. Reaktif oksijen türleri lipid peroksidasyonunu başlatabilir. Bu da hücre ölümü ve malondialdehit (MDA) ile 4- hidroksinonenal (HNE) salınmasıyla sonuçlanır. MDA ve HNE hücre ölümüne sebep olur, proteinler arasında çapraz

bağlar teşkil ederek Mallory cisimciği oluşumuna yol açar , Stellate hücreleri aktive ederek kollajen sentezini hızlandırır (39). HNE, nötrofillere kemotaktik etkisi olduğundan doku enflamasyonunu uyarır (39). Reaktif oksijen türleri de sitokin oluşumunu ($\text{TNF-}\alpha$, dönüştürücü büyüme faktörü β [$\text{TGF-}\beta$], interlekin-8) indükler. $\text{TNF-}\alpha$ ve $\text{TGF-}\beta$ kaspaz aktivasyonuna ve hücre ölümüne sebep olur (39,40). $\text{TGF-}\beta$ stellat hücreler tarafından kollajen sentezini etkinleştirir , sitoskeletal proteinleri çapraz bağlayan doku transaminazını aktive eder, böylece Mallory cisimciği oluşumunu sağlar. İnterloklin-8, insan nötrofilleri için güçlü bir kemoatraktandır (39). Reaktif oksijen türleriyle indüklenen $\text{TNF-}\alpha$, mitokondrilerde solunum zincirindeki elektronların akımını daha da bozar (40). Mitokondriyal reaktif oksijen türleri hepatik antioksidanları tüketebilir, böylece daha reaktif oksijen türleri birikir (41). Mitokondriyal reaktif oksijen türleri hepatositlerde Fas ligandın ekspresyonuna yol açar (hepatositler normalde membran reseptörü Fas'ı eksprese eder) (41). Sonra da bir hepatosit üzerindeki Fas ligandı, diğer bir hepatosit üzerindeki Fas ligandı ile etkileşerek “fraksiyonel öldürmeye” sebep olabilir.

Steatohepatitli hastalarda ultrastrüktürel mitokondriyal lezyonlar bulunabilir (megamitokondrilerdeki çizgisel kristal inklüzyonlar gibi) (41). Basit steatozlu çoğu hastada ve sağlıklı bireylerde bu mitokondri hasarına rastlanmaz (41). Steatohepatitli hastalar, fruktoz (karaciğerde akut ATP azalmasına sebep olur) verilmesinden sonra, invivo şartlarda ATP'yi yavaş bir biçimde yeniden sentezler (42). Bu bozukluk, steatohepatitli hastalarda bulunan mitokondriyal hasardan kaynaklanabilir (41,42).

Demek ki obez, diyabetik veya hiperlipidemisi olan yağlı karaciğerli hastalarda karaciğer hastalığı belirtileri nadiren gelişir; ancak steatotik karaciğer yeni saldırılarla karşılaştığında daha fazla hasar görmeye yatkın olabilir. Bu bulgu, şu varsayıma yol açmıştır: Basit steatozdan steatohepatite ve ilerlemiş fibroza progresyon, iki farklı olaydan kaynaklanabilir (43). Birincisi, insülin direnci hepatositlerin içinde yağ birikimine sebep olur; ikincisi, mitokondriyal reaktif oksijen türleri lipid peroksidasyonuna, sitokin induksiyonuna ve Fas ligand induksiyonuna sebep olur.

Histolojik Bulgular

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, histolojik olarak, alkol suistimalinden kaynaklanan karaciğer hasarından ayırt edilemez. Karaciğer biyopsisinde gözlenen özellikler; steatoz, karma enflamasyon hücreleri infiltrasyonu, hepatosit balonlaşması ve nekrozu, glikojen nükleusları, Mallory cisimciği ve fibrozdur (Şekil 1). Bütün bu özelliklerin tek başlarına veya birlikte bulunmaları, NAYKH spektrumunun neden bu kadar geniş olduğunu da açıklar. Portal kanallar iltihaptan nispeten korunmuştur, ancak NAYKH olan çocuklarda lobüler enfiltratın tersine portal iltihap baskınlığı görülebilir (32). Mallory cisimciği NAYKH olan çocuklarda ya hiç yoktur ya da çok seyrek (31,32). Bazı sirozlu hastalarda steatoz ve nekroenflamatuvar aktivite özellikleri artık bulunmayabilir (33). Steatoz, mononükleer veya polimorfonükleer hücre infiltrasyonu, hepatosit balonlaşması ve yama tarzında nekroz birarada bulunduğu, bu durum non-alkolik steatohepatit olarak adlandırılır. Bu türde NAYKH olan hastaların çoğunda bir dereceye kadar fibroz vardır. Mallory cisimciği'nin de olması şart değildir. Steatozun şiddeti, etkilenen parankimin yaygınlığına bakarak derecelendirilebilir (Tablo.2) (32). Son zamanlarda steatoz ve nekroenflamasyon lezyonlarını ‘‘derece’’ler, fibroz tiplerini de ‘‘evreler’’ halinde birleştiren bir sistem önerilmiştir (32).

Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığında Histolojik Lezyonların Derecelendirilmesi ve Evrelemesi (32)

Steatozun Derecelendirilmesi :

Derece 1: Hepatositlerin %33'ünden azı etkilenmiştir.

Derece 2: Hepatositlerin %33-66'sı etkilenmiştir.

Derece 3: Hepatositlerin %66'sından fazlası etkilenmiştir.

Steatohepatitin Derecelendirilmesi :

- Derece 1, hafif

Steatoz: Daha çok makroveziküler, lobüllerin % 66'ya varabilen bölümünü etkilemiş

Balonlaşma: Zon 3 hepatositlerde zaman zaman görülür.

Lobüler enflamasyon: Dağınık ve hafif akut enflamasyon (polimorfonükleer hücreler) ve kronik enflamasyon (mononükleer hücreler)

Portal enflamasyon: Yok veya hafiftir.

- Derece 2,orta

Steatoz: Her şiddette olabilir; genellikle karışık makroveziküler ve mikroveziküler

Balonlaşma: Belirgin ve zon 3'te belirgin

Lobüler enflamasyon: Balonlaşmış hepatositlerle birlikte polimorfonükleer hücreler görülebilir; periselüler fibroz; hafif kronik enflamasyon görülebilir

Portal enflamasyon: Hafif - orta şekildedir.

- Derece 3, şiddetli

Steatoz: Tipik olarak lobüllerin %66'sından fazlasını tutar (panasiner); yaygın miks steatoz vardır.

Balonlaşma: Baskın olarak zon 3; belirgindir.

Lobüler enflamasyon: Dağınık akut ve kronik enflamasyon; polimorfonükleer hücreler, zon 3'te balonlaşma ve fibroz alanlarında yoğunlaşmış olabilir

Portal enflamasyon: Hafif ile şiddetlidir.

Fibrozun Evrelemesi :

Evre 1:Zon 3 perivenüler, perisinuzoidal veya perisellüler fibroz; fokal veya yaygın

Evre 2:Zon 3 perivenüler, perisinuzoidal veya perisellüler fibroz, ayrıca fokal veya yaygın periportal fibroz

Evre 3:Köprüleşme fibrozu, fokal veya yaygın

Evre 4:Siroz

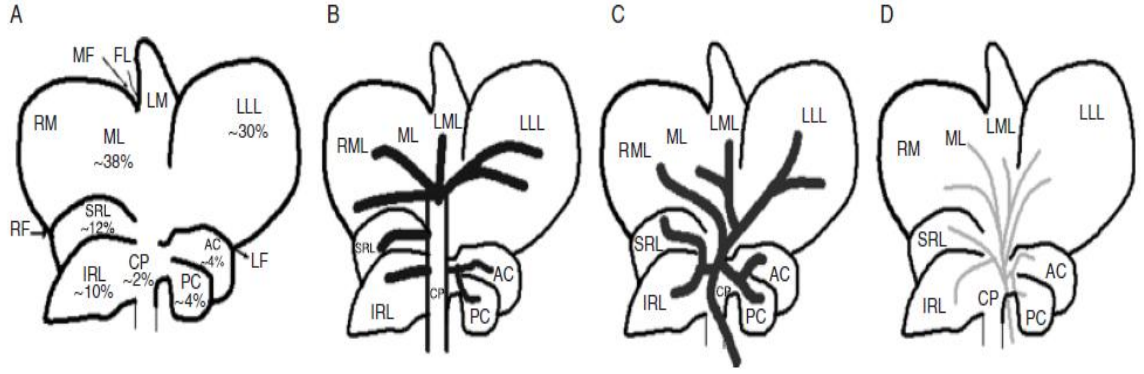
Tanı

Aminotransferaz seviyelerinde asemptomatik yükselme, yağlı karaciğere ait radyolojik bulguları ve açıklanamayan inatçı hepatomegalisi olan kişilerde non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı tanısından şüphelenilir. Klinik tanının ve karaciğer testlerinin histolojik tutulumla ilişkin olarak tahmin değerleri zayıftır (43). Görüntüleme çalışmaları karaciğerde yağlı infiltrasyonun varlığını ve miktarını belirlemede yararlıdır, ama karaciğer hasarının şiddetini kesin olarak belirlemede kullanılmaz. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve şiddeti konusunda duyulan klinik şüphe, sadece karaciğer biyopsisi ile doğrulanabilir. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı tanısı koyabilmek için, karaciğer hastalığının sebebinin alkol suistimali olmadığının ortaya koymak gerekir. Kadınlarda günde 20 g, erkeklerde günde 30 g kadar düşük dozlar alkolle indüklenen karaciğer hastalığı oluşturmak için yeterli olabilir (Şu miktarlardaki içkilerin her biri 10 g alkol içerir: 350 ml bira, 120 ml şarap, 45 ml sert likör) (43). Diğer sebepler de (virüsler, otoimmün cevaplar, metabolik veya kalıtsal faktörler, ilaçlar veya toksinler) dışlanmalıdır. Serolojik testlerin ne dereceye kadar yapılacağına hastaya göre karar verilmelidir. Spesifik laboratuvar test sonuçlarıyla birlikte karaciğer biyopsisindeki bazı histolojik bulgular çoğu vakada tanı koydurur.

B. Ratlarda Karaciğer Anatomisi ve Karaciğer Rezeksiyon Modelleri

Ratlarda karaciğer 4 ana loba ayrılır. Caudat (CL), sağ lob (RLL), orta lob (MLL) ve sol dış lobtur (LLL) .Caudat lob, caudat çıkıntı, ön (AC) ve arka (PC) caudat lob olmak üzere üçe ayrılır. RLL, süperior sağ lob (SRL) ve inferior sağ lob (İRL) olarak ikiye ayrılır. Medial lob, sağ orta lob (RML) ve sol orta lob (LML) şeklinde ikiye ayrılır (44).

Kongure'nin çalışması rat karaciğer anatomisini açıklar ve Couinaud tarafından gösterilen insan karaciğer segmentasyonu ile uyumluluk gösterir (45). Bu çalışmaya göre ratların CL, LLL, LML, RML, IRL ve SRL sırasıyla insan karaciğerinde 1, 2, (3 ve 4), (5 ve 6), 6 ve 7. segmentlere uyar. Rat karaciğerinde safra kesesi bulunmaz.



ŞEKİL 2. Rat karaciğer anatomisi

A:Herbir lob için karaciğer ağırlık yüzdeleri

B:Hepatik venlerin dağılımı

C:Portal ven dağılımı

D:Bilier sistem

AC; anterior kaudal lob, PC; posterior kaudat lob, SRL; süperior sağ lateral lob, IRL; inferior kaudat lob, ML; median lob, LML;orta lobun sol kısmı, LLL;sol lateral lob, MF;median fissür (umblikal fissür), LF;sol fissür,RF;sağ fissür, FL;falsiform ligament

Ratlarda Karaciğer Rezeksiyon Modelleri

Ratlarda klasik parsiyel hepatektomi modeli Higgins ve Anderson tarafından 1931’de tanımlanmıştır. Bu araştırma iki anterior lobun (ML) ve (LLL) rezeksiyonunu gösterir. Uygulaması kolaydır. Karaciğerin yaklaşık %70’i çıkartılır. Klasik %70 hepatektomi modeli kapsamlıca çalışıldığı için oldukça popüler olmuştur. Bileşik pediküle yapılan tek ligasyon ile hızlı ve başarılı şekilde sonlandırılır, ayrıca karaciğer nakli çalışmalarında da kullanılır (46,51).

%90, 95, 97’lik karaciğer rezeksiyonu modelleri ise karaciğer rejenerasyonu ve akut karaciğer kaybı çalışmalarında kullanılır (47). %90 lık modelde sağ lob, ML, ve MLL rezeke edilir. %95 lik modelde AC de rezeke edilir.% 97 lik modelde ise AC ve PC de çıkarılır sadece paracaval kısım kalır. Diğer genişletilmiş hepatektomi modelleri de çalışılmıştır fakat daha zor teknikler gerektirmektedir ve daha fazla komplikasyon gözlenir.

Karaciğer Rejenerasyon Modeli

Hepatik rejenerasyon gelişimi ratlarda ve insanlarda benzerdir. Ratlarda elde edilen sonuçlar insan karaciğerine de uygulanabilir. Ratlarda yapılan %70 hepatektomi modeli rejenerasyon çalışmaları için en kapsamlı çalışılan ve en değerli çalışmadır (48,49).

Karaciğer rejenerasyonu yaralanmanın ardından tetiklenir. Ratlarda rezeksiyonun 16. saatinden itibaren DNA replikasyonu başlar. Ratlarda %70 hepatektominin ardından 24-72. saatte kalan karaciğer dokusu rezeksiyon öncesi karaciğer dokusunun %45-%70 ine ulaşır. 5-12. günde %93 üne ulaşır. 20. günden itibaren kalan lobların hiperplazisi ile orijinal karaciğer volumüne ulaşır.(50). İnsanlarda da rejenerasyon çabuk başlar. Donördeki rezidü karaciğer 7. günde ağırlığının 2 katına ulaşır. Alıcı da ise transplante edilen sağ karaciğer 14 günde ağırlığının 2 katına ulaşır. Dönör ve alıcıda karaciğer 60 günde orijinal ağırlığına ulaşır. Fakat orijinal ağırlığa ulaşmasına rağmen rejenerasyon ve remodeling devam eder.

C. Karaciğer Rejenerasyonu

Yaralanma veya rezeksiyondan sonra karaciğerin kendini rejenere etme kabiliyeti uzun süredir araştırmacıları büyülemektedir. Karaciğerin rejeneratif kapasitesi ile ilgili ilk bilgilere Hesiodos' un Theogoni' sinde 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. Ancak gerçek anlamda karaciğer rejenerasyonu fikrini ilk kez 1833'te Cruveilhier ortaya atmıştır (52).

Karaciğer erişkin boyutlara ulaştığında büyümesi durur. Normal bir karaciğerin herhangi bir zamanda yapılan kesitlerde hepatosit populasyonunun çok seyrek mitoz göstermesi bu durgunluğun bir ifadesidir (52,53). Bununla beraber karaciğerde doku kaybı ile sonuçlanan yaralanmalar, hastalıklar (viral hepatit, siroz ve toksik olaylar) veya karaciğerin cerrahi olarak bir kısmının çıkartılması gibi olaylardan sonra hızla kompensatuvar bir büyüme görülür ve bu büyüme karaciğer erişkin boyutlarına ulaşınca yine durur.

Geniş metabolik yüküne rağmen karaciğer en geniş hücre proliferasyon özelliğine sahip organdır. Hepatositlerin sadece %0.0012-%0.01'i hayatın herhangi bir döneminde mitotik ugramaktadır (54,55). Sağlıklı karaciğerdeki bu düşük turn-over toksik karaciğer hasarı veya cerrahi rezeksiyon durumunda değişmektedir. Karaciğerin 2/3'ün kaybından sonra iki hafta içinde fonksiyonel karaciğer iyileşmesi tamamlanmaktadır. Rejenerasyon cevabı tipik olarak kalan karaciğer dokusunun asiner yapısının proliferasyonuna bağlıdır (55).

Karaciğer rezeksiyonu veya parsiyel hepatektomi karaciğer kütlesini azaltır fakat az da olsa geride hasarlı hücreler bırakır. 2/3 parsiyel hepatektomi modelinde, sol ve medial loblar ligate edilip eksize edilir. Böylece karaciğerin %65-70'i eksize edilmiş olur (49). Parsiyel hepatektomi sonrası geride kalan hepatik segmentler artan portal kan akımı ve basıncının etkisi altında kalmasına rağmen, parsiyel hepatektominin halen hücresel hasarın eşlik etmediği pür karaciğer rejenerasyonu 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. Eksize edilen loblar aynen eski şekillerini almazlar. Rejenerasyon daha çok yeni lobüller oluşması ve artık lobüllerin genişlemesi şeklinde olur. Hepatik rejenerasyon için gerekli uyaranlar pankreas diğer ekstrahepatik organlar ve rejenere olan karaciğerin bizzat kendisinden kaynaklanan humoral faktörlerdir (56).

Günümüzde bilgisayarlı tomografi, anjiyografi, sintigrafi gibi yöntemlerle yapılan çalışmalarda, karaciğerin rezeksiyon sonrası erişkinlerde 3-6 ayda, çocuklarda 3 aydan daha kısa sürede eski boyutuna ulaştığı gösterilmiştir. Siroz varlığında bu süre 9-15 aya kadar çıkmaktadır.

Karaciğer rejenerasyonunda birçok büyüme faktörü ve sitokinler rol alır. Bu faktörler şunlardır:

1- Hepatosit büyüme faktörü (HGF): En çok karaciğer Ito ve Kupffer hücrelerinde olmak üzere birçok dokuda ve plazmada bulunan protein yapısında bir büyüme faktörüdür (57). Hepatektomiye takiben 5 dakika içinde ürokinaz aktive olur ve plazminojenin plazmine dönüşümünde rol alır. Plazmin matriks yıkıcı metaloproteinazları uyarır. Matriks yıkımı sonucu HGF salgılanır. Ratlarda hepatektomi sonrası bir saat içinde plazma HGF konsantrasyonu 20 katına çıkar (57). İnsanlarda karaciğer rezeksiyonunu takiben 1 ile 3.

günler arasında plazma HGF seviyesi maksimuma ulaşır (57). Karbontetraklorür (CCl₄) ve D-galaktozamin gibi hepatotoksik maddeler de nonparankimal karaciğer hücrelerinde HGF artışına neden olmaktadır. Bir büyüme faktörü olmasına karşın yüksek konsantrasyonlardaki HGF'nin bazı kanser ve sarkom hücre kültürlerinde büyümeyi yavaşlattığı bildirilmektedir (57).

2- Tümör Nekroz Faktör- α ve IL-6: Tümör Nekrozis Faktör- α nin fonksiyonu kupper hücrelerinin IL-6 salgılamasına bağlıdır. Rezeksiyon sonrası üretimi 48. saatte pik yapar ve mitokondriden oksijen radikallerinin salınımını sağlayarak hepatosit kültüründe sitotoksik etki gösterir (7, 8). IL-6, TNF- α uyarısı altında kupper ve satelit hücrelerden salınır (7). Rezeksiyon sonrası 24. saatte üretimi pik yapar (7,8). IL-6, IL-1 ve TNF- α karaciğer rejenerasyonunun erken döneminde iki farklı transkripsiyon faktörünün üretimini uyarır. Bunlar post hepatectomy factor /nucleer factor kappa B' (PHF/NF κ B) ve signal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3) dür (5,8). Bu transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu c-fos, c-jun, c-myc gibi erken genlerin transkripsiyonuna yol açar. Bu genlerin delesyonu durumunda hepatosit çoğalmasında azalma veya artmış hücre ölümü söz konusudur (7,8). Bu durum G1-hücre siklusu düzenleyicisi olan siklin E ve D1 bağımlı kinazların aktivasyonundaki azalma veya gecikmeyle açıklanabilir (7, 8).

3- Epidermal büyüme faktörü (EGF): Hepatositlerde DNA sentezini uyardığı belirlenen ilk faktördür (58). Hepatosit kültürlerinde mitojen etkisi kanıtlanmıştır. Hepatektomi sonrası artan noradrenalin uyarısıyla submandibular bezlerden ve Brunner bezlerinden salınımı artmaktadır (58).

4- Transforme edici büyüme faktörü alfa (TGF- α): Karaciğer rejenerasyonunun başlangıç safhasından sonra rol oynadığı düşünülmektedir. EGF ile aynı reseptör üzerine etki eder. Hepatosit kültürlerinde DNA sentezini arttırmaktadır (57,58).

5- Norepinefrin: α 1-adrenerjik reseptörler yoluyla direkt, EGF'yi arttırarak indirekt yoldan karaciğer rejenerasyonunu arttırır. Sempatik denervasyon ve α 1 reseptör blokajı DNA sentezini azaltmaktadır (10).

6- İnsulin: Portosistemik şant sonucu gelişen karaciğer atrofisi insulin verilmesiyle engellenebilmektedir (60). Primer mitojen olmamasına karşın hücre kültürlerinde diğer büyüme faktörlerinin etkisini arttırmaktadır (10).

7- Hepatosit uyarıcı madde (HSS): 53 kilodalton ağırlığında bir proteindir. İn vitro ve in vivo olarak hepatotrofik etkisi vardır (61).

8- Seks hormonları: Hepatektomi sonrası hepatositlerde östrojen reseptörleri artarken androjen reseptörleri azalmaktadır. Östrojenin hücre kültürlerinde hepatosit bölünmesini

arttırıcı etkisi vardır. Antiöstrojen bir ajan olan tamoksifenin invitro ve invivo karaciğer rejenerasyonunu azalttığı gösterilmiştir (62). Buna karşın antiandrojenlerin belirgin bir etkisi gösterilememiştir (62).

9- Diğerleri: Fibroblast büyüme faktörü (FGF), vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), triiyodotironin (T3), retinoik asit, bazı ilaçlar (barbutüratlar, diazepam, hipolipidemik ajanlar, antiepileptik ajanlar), büyüme hormonu, PGE₂, siklosporin, FK506, vazopressin gibi faktörlerin karaciğer rejenerasyonuna olumlu katkıları olduğu bildirilmektedir (10,63,64).

10- Bilinen en önemli rejenerasyon inhibitörü TGF- β 1' dir. İto hücreleri tarafından hepatektomi sonrası erken dönemde salgılanır. Rejenerasyon devam ettiği sürece α 2 makroglobuline bağlı inaktif formundadır. Zamanı geldiğinde aktive olarak rejenerasyonu sonlandırır (10). Bu zamanlamayı etkileyen faktörler bilinmemektedir.

Rejenerasyon hücre düzeyinde başlar. Hücre siklusunun basamakları G0, G1 (gap 1- ara 1), S (sentez), G2 (gap 2- ara 2), M(mitoz) dur. G0 evresi, hücrenin stabil ve DNA/RNA sentezinin olmadığı evredir. DNA sentezi, G1 evresiyle birlikte başlar. Özellikle S evresinde olmak üzere M evresine kadar sürer (65).

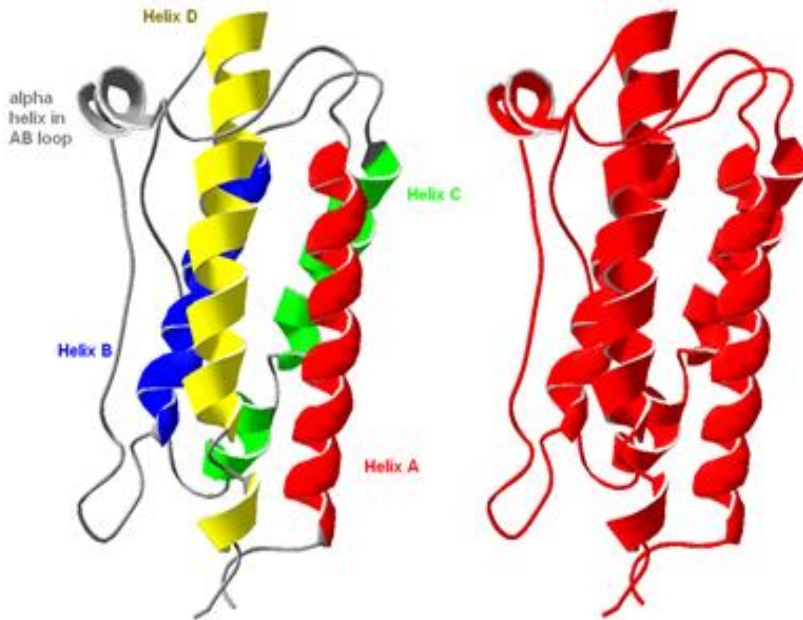
Parsiyel hepatektomi veya diğer karaciğer hasarlarından sonraki erken dönemde, kalan hepatositler hücre siklusunun G0 döneminden çıkarlar ve G1 safhasına girerler. Mitojenik uyarı sonrası rejenerasyon, öncelikle karaciğer lobüllerinin periportal bölgelerindeki hepatositlerde başlar. Sonra sırasıyla safra duktus hücreleri, Kupper hücreleri, ito hücreleri (vitamin A depolayan, bağ dokusu proteinleri ve büyüme faktörleri sentezleyen karaciğere özgü satellit hücreler) ve sinuzoidal endotel hücrelerinde mitoz görülür. Sonuçta mevcut lobüllerin genişlemesi ve yeni lobüllerin eklenmesiyle karaciğer eski büyüklüğüne ulaşır. Mitojenik uyarı sonrası rejenerasyon, öncelikle karaciğer lobüllerinin periportal bölgelerindeki hepatositlerde başlar. Sonra sırasıyla safra duktus hücreleri, Kupfer hücreleri, ito hücreleri (vitamin A depolayan, bağ dokusu proteinleri ve büyüme faktörleri sentezleyen karaciğere özgü satellit hücreler) ve sinuzoidal endotel hücrelerinde mitoz görülür. Sonuçta mevcut lobüllerin genişlemesi ve yeni lobüllerin eklenmesiyle karaciğer eski büyüklüğüne ulaşır.

Yapılan çalışmalarda rejenerasyon kriterlerinin tanımlanması için DNA sentezi ve mitoz sayısı, karaciğer volümü, hücre proliferasyonu ve mitokondrial aktivite gibi birçok marker kullanılmıştır (63,64,65). Ayrıca rejenerasyon kriterlerinin tanımlanması ve tespitinde bazı maddeler kullanılmıştır. Bunlar DNA timidin içeriği, 5-bromo-2'-deoksiuridin, PCNA

(Prolifering Cell Nuclear Antigen), plazma fibronektin seviyesi ve stimulator substans gibi maddelerdir (65,66).

Bunların dışında ilk kez 1983’de Gerdes ve ark. Tarafından hücre çekirdeğinde bulunan Ki-67 antijen ve buna karşı oluşan monoklonal antikor tariflenmiştir (67,68). Ki-67 proteini tüm hücre sikluslarında tariflenmiştir (68). Hücre siklusu ilerledikçe antijen içeriği artar. G2-M evresinde maksimal seviyeye erişir. Ki-67 antijenine karşı tanımlanan monoklonal antikor ise hücre siklusunun G0 evresi hariç diğer tüm evrelerinde gösterilmiştir. Bu antikorum prognostik olarak korelasyon gösterdiği durumlar arasında non hodgkin lenfoma, yumuşak doku sarkomları, santral sinir sistemi tümörleri (glioma, oligodendrioglioma, pineoblastoma, primer sinir sistemi lenfoması ve norofibroma), meme Ca sayılabilir. Ki-67’nin diğer kullanılan yöntem ve maddelerden farkı sadece S evresinden ziyade hücredeki siklusun tüm büyüme evrelerinin sınıflandırılabilmesidir. Bu sınıflandırma, hücresel proliferasyon aktivitesinin bir göstergesi olarak kullanılabilir (69,70).

D. Granülosit Koloni Stimule Edici Faktör



Granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF), nötrofil koloni oluşturan hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasını uyaran bir hematopoetik büyüme faktörüdür (12). G-CSF reseptörleri myeloid seri hücrelerinin yanı sıra hepatositler ve vasküler endotelial hücreler gibi non-hematopoetik hücreler tarafından da eksprese edilmektedir (12,14). Son çalışmalar

G-CSF' nin kemirgenlerde hepatik rejenerasyonu uyardığını söylemektedir. Theocharis ve ark. ratlarda %70 hepatik rezeksiyon ve tiyoasetamide bağı karaciğer yetmezliklerinde G-CSF tedavisinin hepatik rejenerasyonu artırdığını göstermişlerdir (15).

G-CSF' nin bir diğer etkisi de hematopoetik kök hücre (HSC)' lerin mobilizasyonudur. Son çalışmalar CD24-pozitif HSC' lerin iskelet kası myoblastları, kardiyak myoblastlar, vasküler endotel hücreleri, akciğerin epitelyal hücreleri, barsak ve cilt hücreleri gibi nonhematopoetik hücre serilerine differansiye olabildiğini göstermektedir. Bu diferansiasyonun mekanizması net olarak bilinmemekle birlikte farelerde, ratlarda ve insanda doku stresi durumunda HSC' lerin hepatositlere dönüşebildiği bazı çalışmalarda bildirilmiştir (14,15).

Klinik kullanım için, belli koşullar altında G-CSF nin sistemik kullanımı ile primer ve sekonder karaciğer tümörlerinde daha radikal rezeksiyonlar yapılabilecektir ve karaciğer rejenerasyon sürecinde geride kalan karaciğer dokusu daha iyi desteklenebilecektir. Karaciğer greftlerinin rejenerasyon kapasitesi G-CSF gibi uygulamalarla desteklendiği zaman hem kadavradan hem de yaşayan donörlerden segmental karaciğer transferi erişkin bireyler için güvenle yapılabilir

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışma planlandıktan sonra Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (Protokol No: 20/2011).

Çalışmada, ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen, erkek Wistar-Albino ratlar kullanıldı. Çalışma süresince deney hayvanlarının yeterli miktarda su almaları sağlandı ve 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusları oluşturuldu.

Ratlarda karaciğer yağlanması oluşturmak için Lieber ve Carli tarafından tanımlanan karaciğer yağlandırma modeli kullanıldı (71). Bu modele uygun olarak ratlara 8 hafta boyunca kesintisiz olarak %70 yağlı diyet verildi. Altromin® yağlı diet (Altromin Co, Germany) kullanılmıştır, diet içeriği tablo 2 de belirtilmiştir. (Resim 1).

Ratlarda yeterli steatohepatit oluştuğunun kanıtlanması için çalışmanın başlamasından önce pilot çalışma olarak 8 hafta boyunca 3 rat %70 yağlı diyet ile beslenerek karaciğer biyopsisi alındı. Bu ratlarda patolojik olarak karaciğerde steatohepatit derecesinin 2 ve üzerinde olduğu saptanarak steatohepatit modelinin yeterli şekilde uygulanmış olduğu görüldü. Çalışma sırasında %70 hepatektomi yapıldıktan sonra alınan karaciğer dokusunda steatohepatit derecesi 2'nin altında olan ratlar çalışma dışı bırakıldı ve bu deneklerin yerine derece 2 ve üzerinde steatohepatit yapılmış ratlar kullanıldı.

Çalışmada 3 grup oluşturuldu.

Grup 1: Steatohepatit derece 2 ve üzerinde karaciğer yağlanması oluşturulan 7 rata, %70 hepatektomi yapılmasından önceki 5 gün boyunca 50 mcg (5MU) dozunda G-CSF (Neupogen®, Roche, Amgen, Zug, Switzerland) %5 dextroz ile karıştırılarak subkutan olarak uygulandı.

Grup 2: Steatohepatit derece 2 ve üzerinde karaciğer yağlanması oluşturulan 7 rata, %70 hepatektomi yapılmasından önceki 5 gün boyunca 1dzm %5 dextroz solüsyonu subkutan olarak verildi.

Grup 3: Steatohepatit yapılmayan 7 rata 5 gün boyunca 1dzm subkutan %5 dextroz solüsyonu uygulandı.

Grup 1 ve 2'deki ratlardan %70 hepatektomi yapılmasından hemen önce ve Grup 3'teki ratlardan ise %5 dextroz solüsyonu uygulanmasının 5. gününde beyaz küre, AST, ALT, ALP, GGT, total bilirubin ve direkt bilirubin ölçümleri için kuyruk veninden kan alındı.



Resim1. Ratların 8 hafta boyunca beslendiği %70 yağlı dietin görünümü.

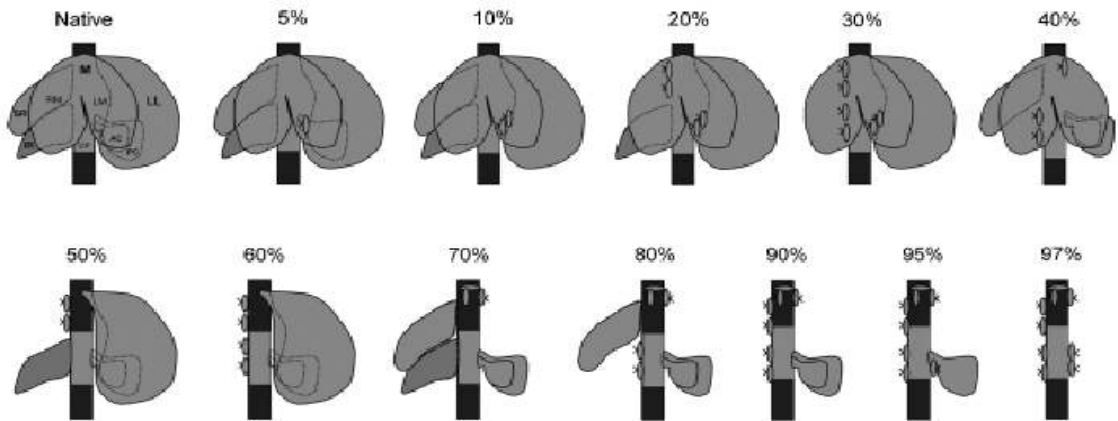
Tablo 2. Yağlı Diet İçeriği

Ham besin maddeleri	%	Yağdan kaynaklanan kalori	%71
Ham yağ	50.5	Proteinden kaynaklanan kalori	%18
Ham protein	22.5	Karbonhidrattan kaynaklanan kalori	%11
Ham fiber	6		
Nitrojenden fakir ürün	5.0		
Mineraller	%	Vitaminler	
Kalsiyum	0.9	Vitamin A	15000IU
Fosfor	0.7	Vitamin D3	600IU
Magnezyum	0.2	Vitamin B1	18 mg
Sodyum	0.2	Vitamin B2	12 mg
Potasyum	0.9	Vitamin B6	9 mg
		Vitamin B12	24 µg
		Vitamin C	36 mg
		Vitamin K3	3 mg
		Vitamin E	75 mg
		Folik asid	2 mg
		Biotin	60 µg
		Nikotinik Asid	36 mg
Eser Elementler	ppm	Amino Asidler	%
Demir	150	Alanin	1.0
Mangan	50	Arginin	1.5
Çinko	60	Aspartik asid	2.3
Bakır	13	Glutamik asid	4.3
Selenyum	0.6	Glisin	0.9
Kobalt	0.3	Histidin	0.5
		İsolösin	1.0
		Lösin	1.8
		Lizin	1.2
		Metyonin	0.7
		Fenilalanin	1.1
		Prolin	1.4
		Valin	1.1

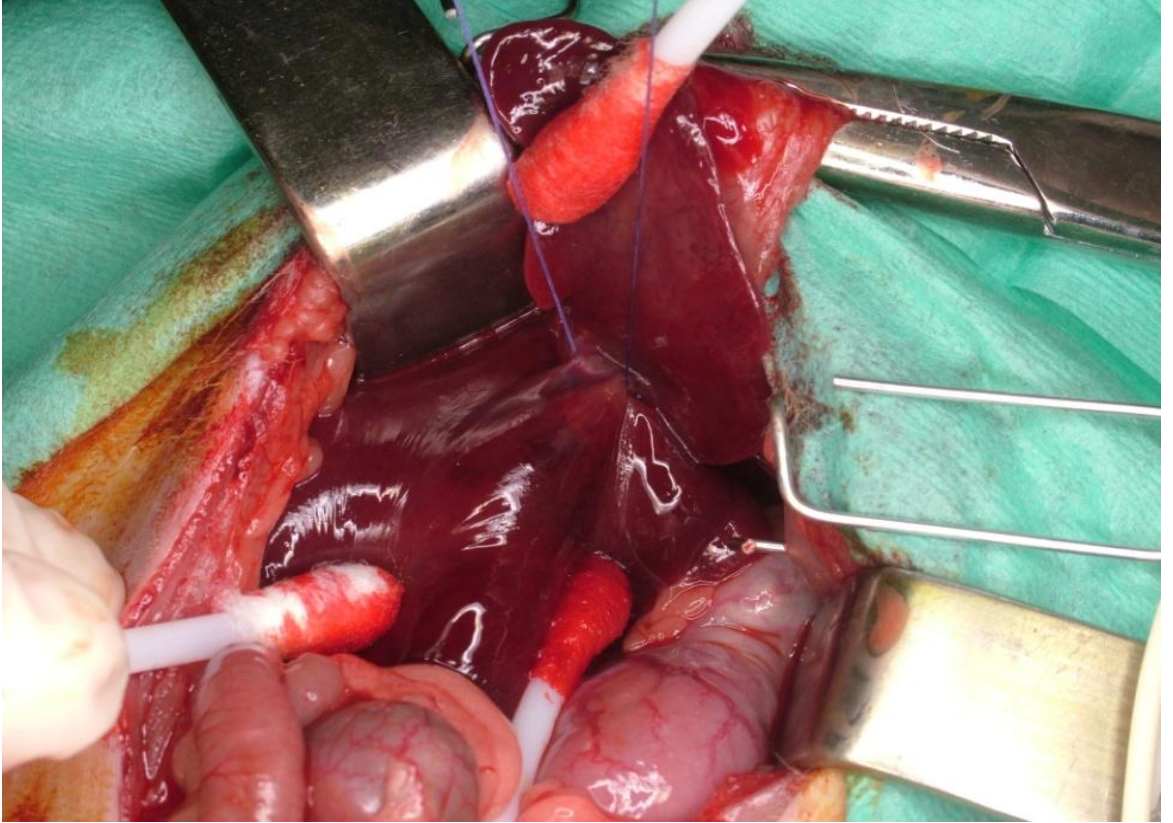
%70 Hepatektomi İşlemi

Ratlara ksilazin (Alfazyne %2, Alfasan International, Holland) 10 mg/kg ve ketamin (Ketalar® flakon 50 mg/mL, Eczacıbaşı İlaç ve Ticaret AŞ, İstanbul) 50 mg/kg dozlarında kombinasyon halinde intraperitoneal yolla verilerek genel anestezi uygulandı. Gerekğinde ratların anestezi derinliğini sabit tutmak için ketamin, uygulandığı ilk dozun yarısı miktarında refleks yanıtla bakılarak tekrarlandı. Anestezi işlemi tamamlandıktan sonra ratların karın ve toraks ön duvarlarında %10 povidon iyodür solüsyonu ile deri asepsisi sağlandıktan ve steril örtülerle ameliyat alanı örtüldükten sonra orta hat yaklaşık 3 cm'lik kesi ile açılarak batına girildi. Literatürde tanımlandığı şekilde, orta ve sol lob pedikülleri ve hepatik venleri 4/0 poliglactin 910 sütür ipliğiyle (Vicryl®, Ethicon, Johnson&Johnson, Spreitenbach, Switzerland) bağlanarak rezeke edildi ve %70 hepatektomi uygulandı (Resim 2, Resim 3, Resim 4) (47,48). İntraperitoneal olarak 1 mL %0.9'luk NaCl solüsyonu verildikten sonra karın ön duvarı ve deri 3/0 poliglactin 910 sütürle (Vicryl®, Ethicon, Johnson&Johnson, Spreitenbach, Switzerland) devamlı sütür tekniği ile kapatıldı ve cerrahi işlem sonlandırıldı. Çıkarılan karaciğer dokusu patolojik incelemeye gönderilerek steatohepatit derecesi değerlendirildi.

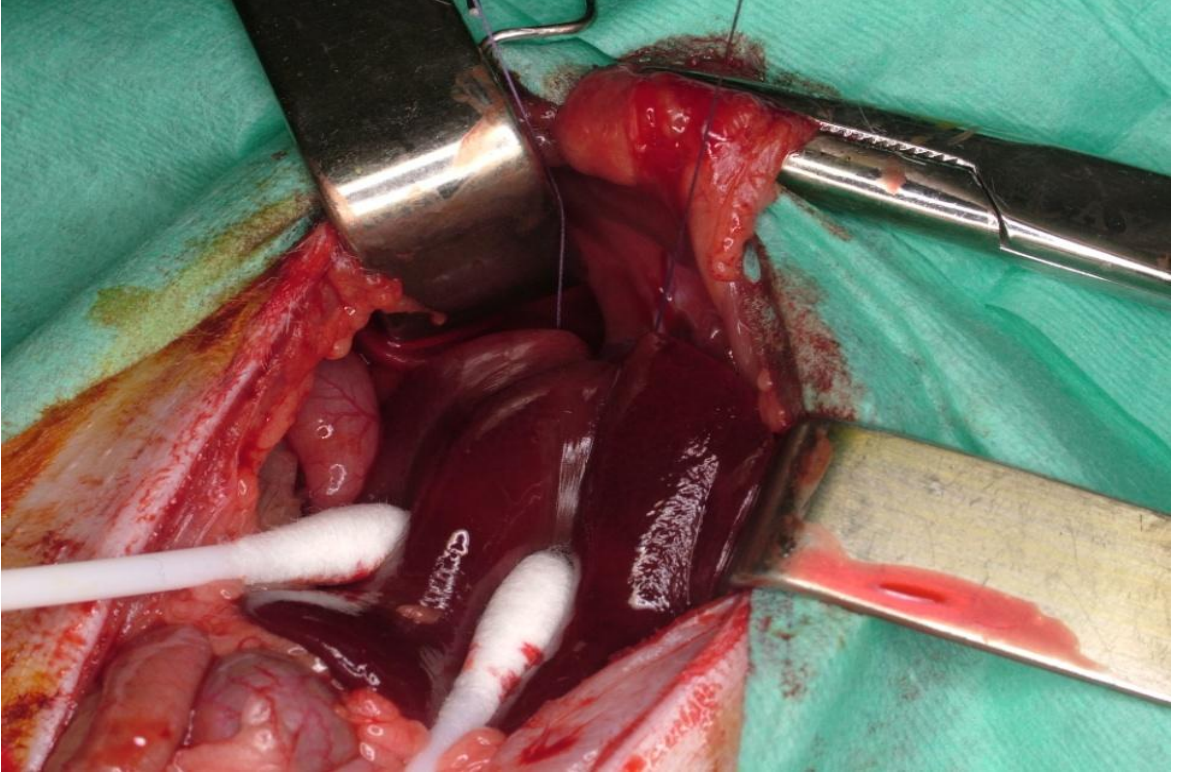
Grup 1 ve 2'deki ratlara %70 hepatektomi sonrası 5. gün total hepatektomi uygulanarak karaciğer dokusu rejenerasyonun değerlendirilmesi için patolojik incelemeye gönderildi. İntrakardiyak olarak kan alındıktan sonra beyaz küre, AST, ALT, ALP, GGT, total bilirubin ve direkt bilirubin ölçümleri için biyokimya laboratuvarına gönderildi ve ratlar sakrifiye edildi.



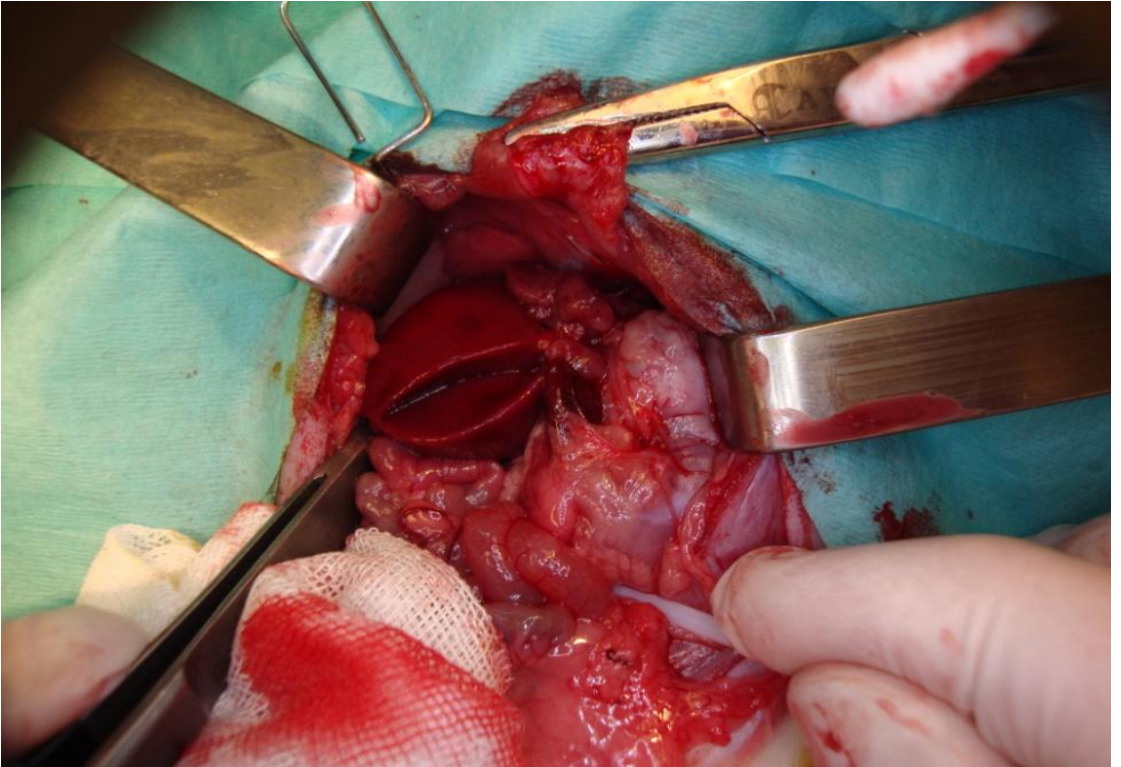
Şekil 3. Ratlarda parsiyel hepatektomilerin şematik açıklanması



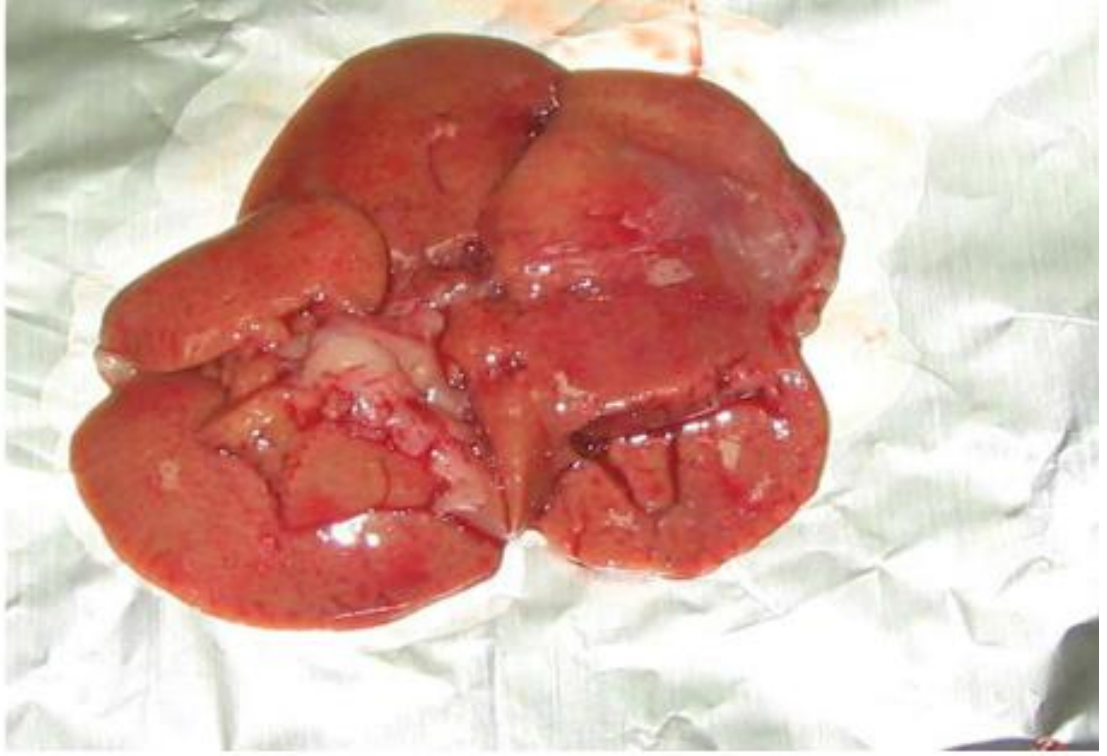
Resim 2.Lateral sol lob pedikül ligasyonu



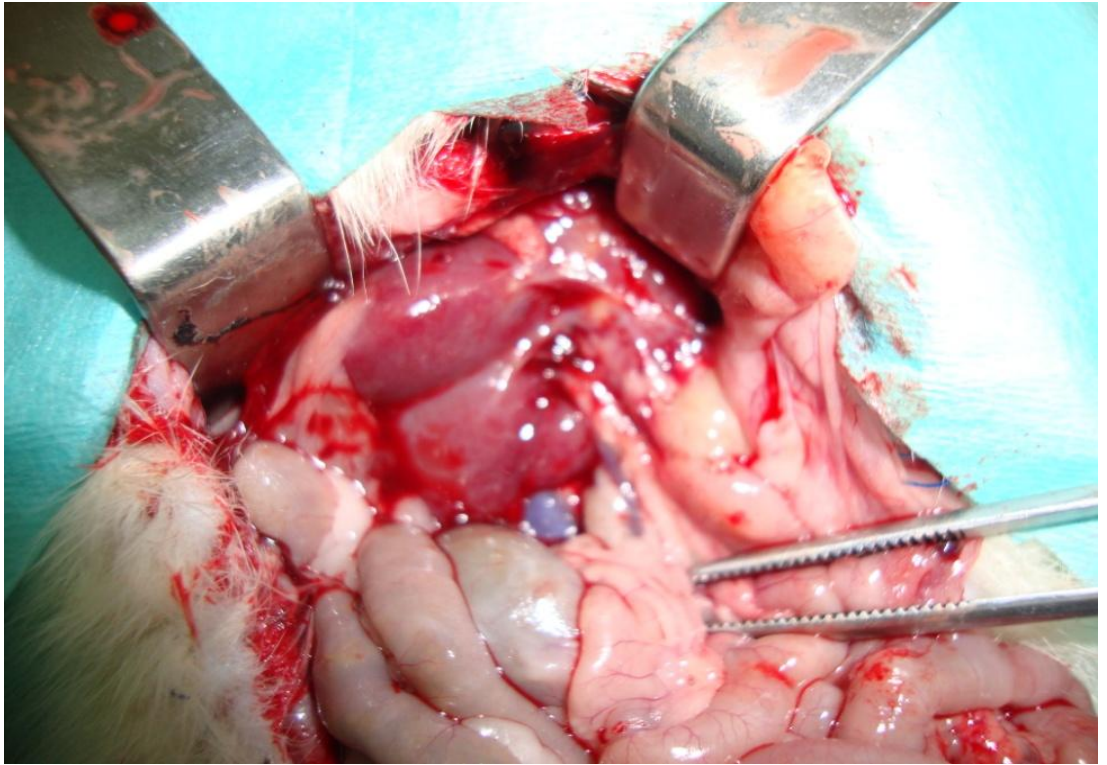
Resim 3.Medial lob pedikül ligasyonu



Resim 4. %70 hepatektomi sonrası karaciğer görünümü



Resim 5. Hepatektomi materyali



Resim 6. Postoperatif 5.gün laparotomi



Resim 7. Postoperatif 5.gün hepatektomi materyali

Biyokimyasal İncelemeler

Biyokimyasal incelemeler Dokuz Eylül Üniversite Hastanesi Biyokimya Laboratuvar'ında yapıldı. Ratlardan alınan kanlarda beyaz küre, AST, ALT, ALP, GGT ölçümleri yapıldı.

İmmünohistokimyasal İnceleme

Patolojik değerlendirme, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Patoloji Laboratuvarı'nda yapıldı. Alınan doku örnekleri histopatolojik inceleme için %10'luk tamponlanmış formalinde tespit edildi. Histopatolojik incelemede steatoz derecesi hematoksilin-eozin boyama ile yapıldı.

Ki-67 ekspresyonunu belirlemek amacı ile parafin bloklardan 5 mikrometre kalınlığında hazırlanan kesitler 'Poly-L-Lysine'li lamlara alındı. Ki-67(SP6) (Neomarkers, USA) kullanıma hazır rat monoklonal antikoru ile immünohistokimyasal boyama işlemi uygulandı. Etüvde bütün gece 6 saat 37⁰C sıcaklıkta bırakılan kesitler, ertesi gün 60⁰C'de 60 dakika bekletildi. Kesitler, deparafinizasyon amacıyla üç kez 5'er dakika ksilende ve iki kez 10'ar dakika absolu alkolde ve rehidratasyon için 1 dakika distile suda bekletildi. 1/10

oranında distile su ile sulandırılan antijen retrieval solüsyonu (sitrata buffer), önce mikrodalgada 750 watt'ta 2 dakika, sonra 350 watt'ta 30 saniye ve daha sonra 15 dakika boyunca 5'er saniye aralar ile 160 watt'ta 30 saniye bekletildi. Mikrodalgadan çıkarılan kesitler, oda sıcaklığında 20 dakika tutulduktan sonra distile su ile yıkandı. Kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için %3'luk hidrojen peroksit ile 20 dakika inkübe edildi ve distile su ile iki kez 1'er dakika daha yıkandı. Ki-67 monoklonal antikoru ile oda sıcaklığında 90 dakika inkübe edildi. Phosphate buffer saline (PBS) ile üç kez 5'er dakika yıkandıktan sonra HRP AEC yöntemi ile rutin boyama işlemi tamamlandı (69).

Ki-67 boyanma paterni değerlendirilirken Wintzer ve arkadaşlarının yöntemi esas alındı (69). Değerlendirmeye alınan lamalar üzerinde 400 büyük büyütme alanında 500 ile 1000 hücre sayıldı. Ki-67 nükleer boyanma gösteren hücrelerin sayısının toplam hücre sayısına oranı binde olarak hesaplandı.

İstatistik Değerlendirme

İstatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 15.0 programı kullanıldı. Niceliksel verilerin karşılaştırılmasında; gruplar arasındaki farklılığın incelenmesinde Kruskal-Wallis testi, farklılığı oluşturan grubun tespitinde Mann-Whitney U testi ve grup içi karşılaştırmalarda ise Wilcoxon işaret testi kullanıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında değerlendirildi ve anlamlılık $p<0.05$ olarak kabul edildi.

İstatistik

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 15.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken niceliksel verilerin karşılaştırılmasında gruplar arasındaki farklılığın incelenmesinde Kruskal Wallis testi, farklılığı oluşturan grubun tespitinde Mann Whitney U test kullanıldı. Grup içi karşılaştırmalarda ise Wilcoxon işaret testi kullanıldı. Sonuçlar % 95'lik güven aralığında, anlamlılık $p<0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

5. BULGULAR

G-CSF verilen ve verilmeyen gruplarda makroveziküler yağlanma, mikroveziküler yağlanma ve Kİ-67 indeksleri tablo 3 gösterilmiştir. G-CSF verilen grupta Kİ-67 indeksi en yüksek makroveziküler yağlanmanın %10 mikroveziküler yağlanmanın %100 ve steohepatit derecesi 2 olan 11.sıradaki ratta %212 olarak ölçülmüştür. G-CSF verilmeyen grupta ise grupta Kİ-67 indeksi en yüksek makroveziküler yağlanmanın %20 mikroveziküler yağlanmanın %100 ve steohepatit derecesi 2 olan 2.sıradaki ratta %117 olarak ölçülmüştür.

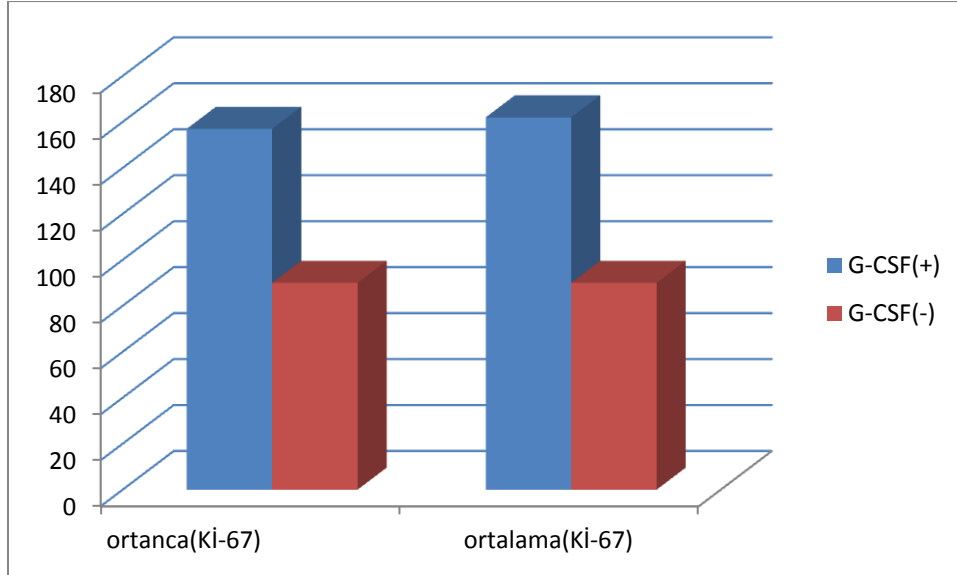
Tablo 3: G-CSF verilen ve G-CSF verilmeyen ratların makroveziküler ,mikroveziküler yağlanma oranları ve Kİ 67 indeksi

RAT	G-CSF	MAKROVEZİKÜLER YAĞLANMA (%)	MİKROVEZİKÜLER YAĞLANMA(%)	Kİ 67 (%)
1	(-)	20	100	51
2	(-)	20	100	117
3	(-)	10	10	99
4	(-)	70	100	102
5	(-)	10	100	82
6	(-)	10	10	90
7	(-)	10	10	90
8	(+)	10	10	204
9	(+)	40	90	136
10	(+)	30	50	142
11	(+)	10	100	212
12	(+)	10	100	122
13	(+)	10	100	166
14	(+)	10	100	157

Tablo 4. Karaciğer yağlanması olup G-CSF verilen ve G-CSF verilmeyen grupların KI-67 indeksinin karşılaştırılması. Karaciğer yağlanması olup G-CSF verilen grupta karaciğer rejenerasyonu anlamlı olarak daha fazladır. (p= 0,002)

Ki-67	G-CSF verilen grup N=7	G-CSF verilmeyen grup N=7	p değeri
Ortanca	157	90	0.002*
Ortalama	162	90.1	
Standard sapma	34.1	20.6	

*Mann-Whitney U test



Grafik 1. Steatozlu karaciğerli ratlarda G-CSF verilen grupta KI-67 rejenerasyon indeksinin ortalaması 162, ortanca 157, G-CSF verilmeyen grupta ortalaması 90.1, ortanca 90 dır. Steatozlu karaciğerli ratlarda G-CSF verilen grupta karaciğer rejenerasyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (p=0.002)

Tablo 5. Ratların preoperatif laboratuvar değerleri.

RAT	G-CSF	AST	ALT	ALP	GGT	TOTAL BİLİRUBİN	DİREK BİLİRUBİN	BEYAZ KÜRE	NÖTROFİL
1	(-)	52	34	168	4	0.2	0.17	2800	1200
2	(-)	34	51	144	4	0.19	0.12	3100	2000
3	(-)	57	55	56	4	0.21	0.12	6800	4000
4	(-)	45	44	67	4	0.16	0.14	8200	4800
5	(-)	68	43	83	4	0.30	0.11	6700	3200
6	(-)	44	88	152	4	0.17	0.15	3300	1500
7	(-)	41	67	167	4	0.20	0.13	5800	3800
8	(+)	51	45	123	4	0.25	0.14	5700	900
9	(+)	78	58	189	4	0.22	0.13	4100	1100
10	(+)	62	46	136	4	0.26	0.15	3100	950
11	(+)	24	62	89	4	0.19	0.13	8600	5200
12	(+)	75	67	78	4	0.21	0.15	6100	3800
13	(+)	48	70	93	4	0.20	0.12	2100	1200
14	(+)	55	69	85	4	0.20	0.17	9200	6000

G-CSF:Granulosit koloni stimüle edici faktör, AST:Aspartat aminotransferaz, ALT:Alanin transaminaz, ALP:Alkalen fosfataz, GGT:Gama glutamil transferaz, TBİL:Total bilirubin, D.BİL:Direk bilirubin

Tablo 6. Ratların postoperatif laboratuvar değerleri

RAT	G-CSF	AST	ALT	ALP	GGT	TOTAL BİLİRUBİN	DİREK BİLİRUBİN	BEYAZ KÜRE	NÖTROFİL
1	(-)	121	56	162	4	0.30	0.20	3100	1300
2	(-)	185	95	258	4	0.20	0.10	4000	2900
3	(-)	94	102	312	4	0.30	0.20	5600	3200
4	(-)	98	87	254	4	0.40	0.30	8400	4600
5	(-)	119	44	397	4	0.25	0.17	11000	6600
6	(-)	189	79	471	4	0.21	0.18	8400	3300
7	(-)	107	48	625	4	0.22	0.16	8400	5600
8	(+)	130	55	431	4	0.30	0.15	12000	3800
9	(+)	132	68	434	4	0.22	0.16	11000	6800
10	(+)	174	174	532	4	0.32	0.21	9400	3100
11	(+)	189	189	544	4	0.30	0.11	8800	5400
12	(+)	196	198	644	4	0.40	0.20	9200	5800
13	(+)	170	170	578	4	0.30	0.11	2800	1300
14	(+)	168	168	621	4	0.40	0.20	1500	2800

G-CSF: Granulosit koloni stimüle edici faktör, AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin transaminaz, ALP: Alkalen fosfataz, GGT: Gama glutamil transferaz, TBİL: Total bilirubin, D.BİL: Direk bilirubin

Tablo 7. G-CSF verilmeyen grupta ortalama preoperatif laboratuvar değerleri ile ortalama postoperatif laboratuvar değerlerinin karşılaştırılması. G-CSF verilmeyen grupta postoperatif 5.günde ast,alp ve direk bilirubin değerleri anlamlı olarak artmıştır.

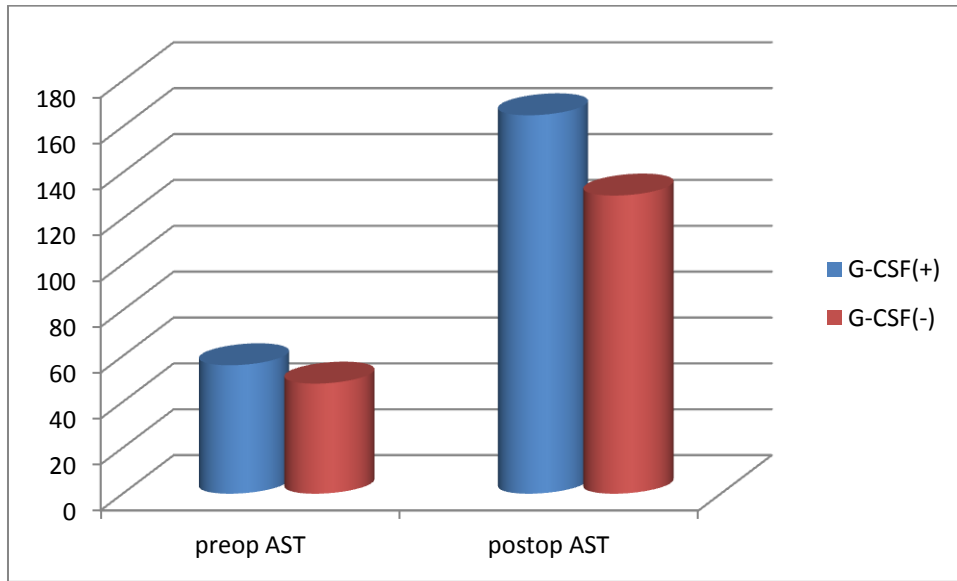
G-CSF verilmeyen	Ortalama Preoperatif Değer	Ortalama Postoperatif değer	P değeri
AST	48,71	130.4	0.018*
ALT	54,57	73	0,128*
GGT	4	4	1.00*
ALP	119,5	382,7	0.018*
Total Bilirubin	0.211	0.268	0.0184*
Direkt Bilirubin	0,131	0,187	0.042*
Lökosit sayısı	5242	6985	0.091*
Nötrofil sayısı	2928.5	3885.71	0.128*

*Wilcoxon signed-rank test

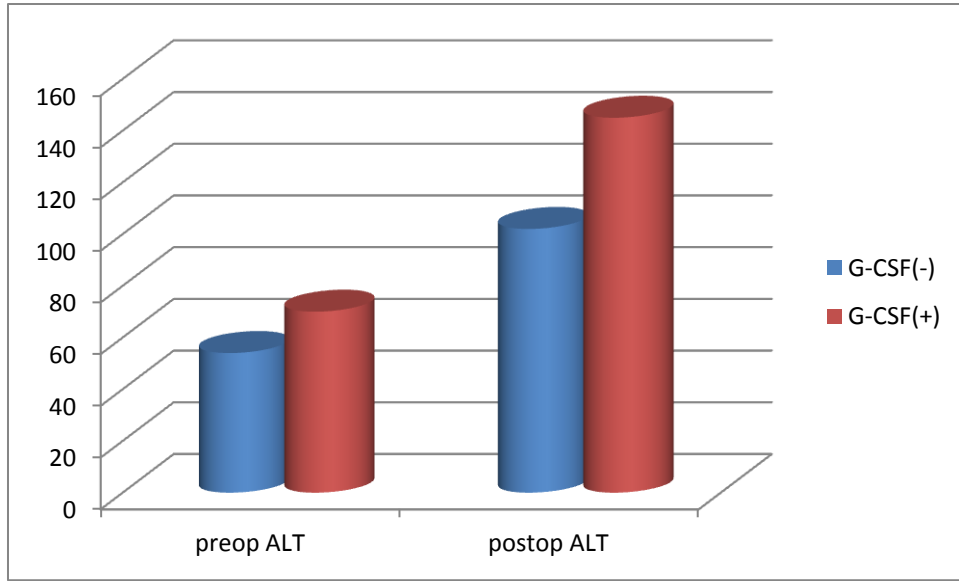
Tablo 8. G-CSF verilen grupta ortalama preoperatif laboratuvar değerleri ile ortalama postoperatif laboratuvar değerlerinin karşılaştırılması. G-CSF verilen yağlı karaciğer grubunda ast, alt, alp ve total bilirubin değerleri anlamlı olarak artmıştır.

G-CSF verilen	Ortalama Preoperatif Değer	Ortalama Postoperatif değer	P değeri
AST	56.14	165.57	0.018*
ALT	59.57	145.5	0.018*
GGT	4	4	1.00*
ALP	113.2	540.57	0.018*
Total Bilirubin	0.2257	0.331	0.018*
Direkt Bilirubin	0.141	0.162	0.089*
Lökosit sayısı	5557.14	7814.29	0.236*
Nötrofil sayısı	2735,71	4142,86	0.176*

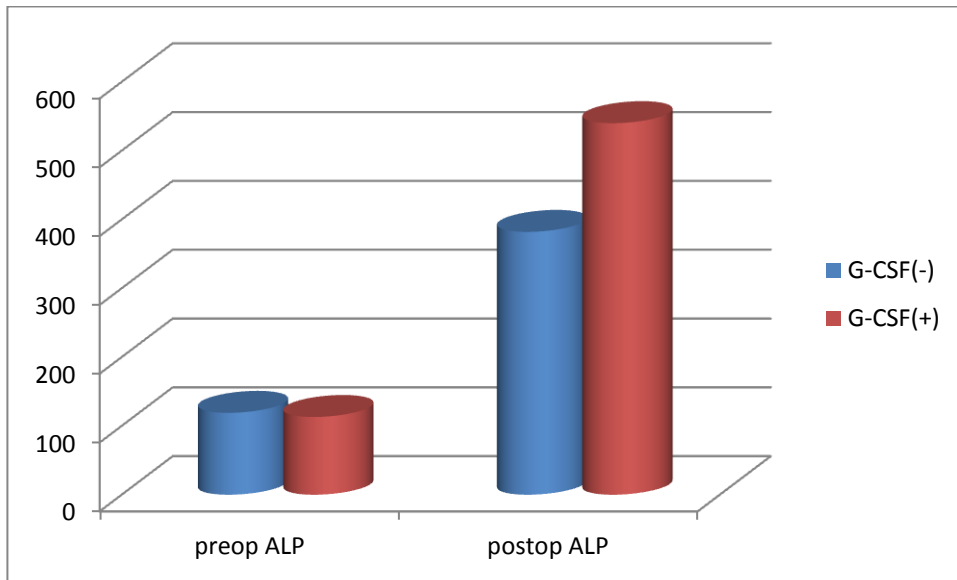
*Wilcoxon signed-rank test



Grafik 2. Her iki grupta preoperatif dönemde alınan laboratuvar değerleri tablo 4'te gösterilmiştir. G-CSF verilmeyen grupta en yüksek preoperatif AST değeri 68, ortalama AST değeri 48.71 dir. G-CSF verilen grupta preoperatif AST değeri en yüksek 78, ortalama 56.11 dir. G-CSF verilmeyen grupta postoperatif 5.gün alınan AST değeri 189, ortalama 130.4 dır. G-CSF verilen grupta postoperatif 5.gün en yüksek AST değeri 196, ortalama 165.57 dir. Hem G-CSF verilen grupta hemde G-CSF verilmeyen grupta preoperatif AST değerleri postoperatif AST değerleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (p=0.018)

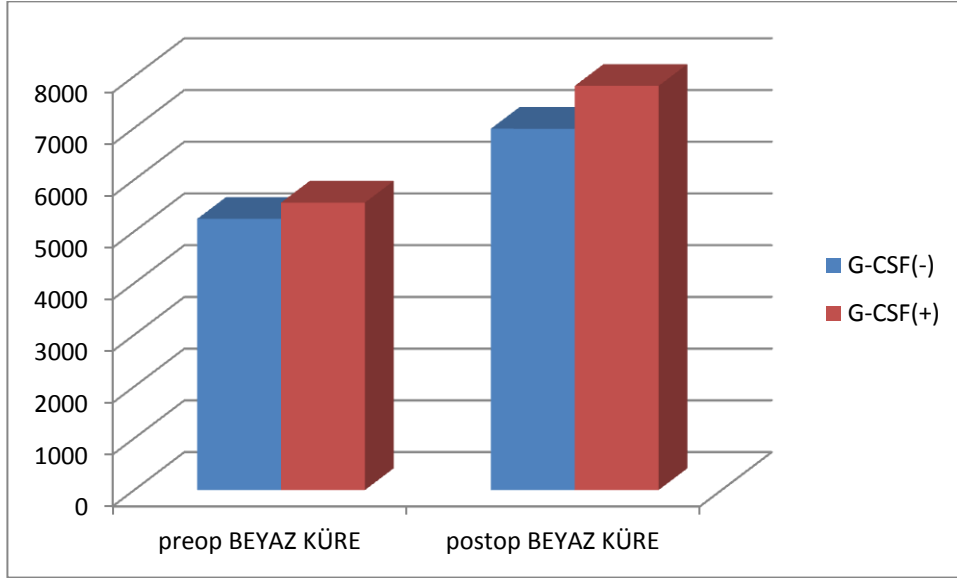


Grafik 3. G-CSF verilmeyen grupta en yüksek preoperatif ALT değeri 88, ortalama ALT değeri 54.57 dir. G-CSF verilen grupta preoperatif ALT değeri en yüksek 70, ortalama 59.57 dir. G-CSF verilmeyen grupta postoperatif 5.gün alınan ALT değeri en yüksek 102, ortalama 79.57 dür. G-CSF verilen grupta postoperatif 5.gün en yüksek ALT değeri 198, ortalama 145.5 dir. G-CSF verilen grupta preoperatif ALT değerleri postoperatif ALT değerleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p=0.018$). G-CSF verilmeyen grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış yoktur.

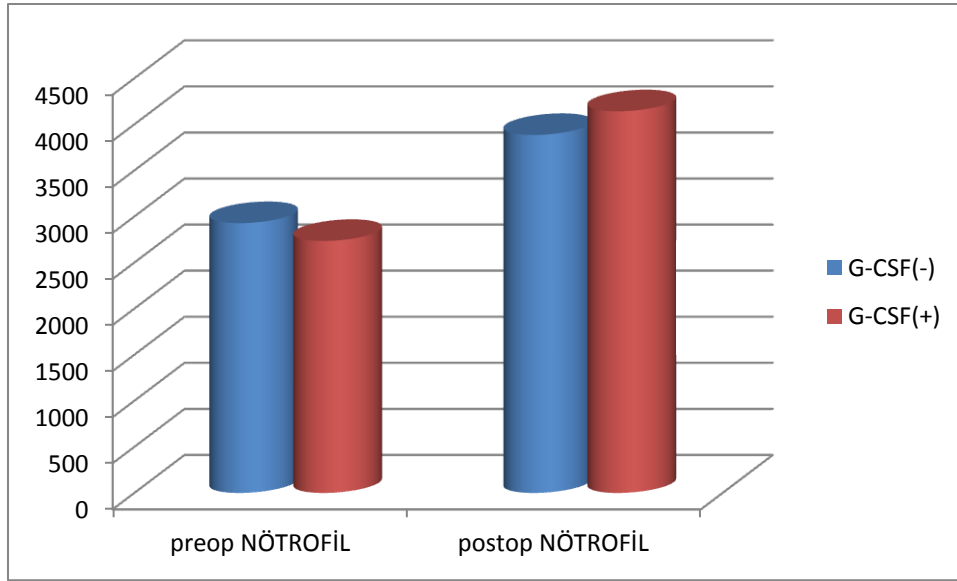


Grafik 4. G-CSF verilmeyen grupta en yüksek preoperatif ALP değeri 168, ortalama ALP değeri 119.5 dir. G-CSF verilen grupta preoperatif ALP değeri en yüksek 189, ortalama 113.2 dir. G-CSF verilmeyen grupta postoperatif 5.gün alınan ALP değeri en yüksek 625, ortalama 382.7 dır. G-CSF verilen grupta postoperatif 5.gün en yüksek ALP değeri 644, ortalama 540.57 dir. G-CSF verilen verilmeyen gruplarda preoperatif ALP değerleri

postoperatif ALP değerleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p=0.018$). G-CSF verilmeyen grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış yoktur.



Grafik 5. G-CSF verilmeyen grupta en yüksek preoperatif beyaz küre değeri 8200, ortalama beyaz küre değeri 5242 dir. G-CSF verilen grupta preoperatif beyaz küre değeri en yüksek 9200, ortalama 5557 dir. G-CSF verilmeyen grupta postoperatif 5.gün alınan beyaz küre değeri en yüksek 11000, ortalama 6985 dır. G-CSF verilen grupta postoperatif 5.gün en yüksek ALP değeri 12000, ortalama 7814.29 dur. G-CSF verilen verilmeyen gruplarda preoperatif beyaz küre değerleri postoperatif postoperatif değerleriyle karşılaştırıldığında artmıştır fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Grafik 6. G-CSF verilmeyen grupta en yüksek preoperatif nötrofil değeri 4800, ortalama beyaz küre değeri 2928.5 dir. G-CSF verilen grupta preoperatif nötrofil değeri en yüksek 6000, ortalama 2735.7 dir. G-CSF verilmeyen grupta postoperatif 5.gün alınan nötrofil değeri en yüksek 6600, ortalama 3885.7 dır. G-CSF verilen grupta postoperatif 5.gün en yüksek nötrofil değeri 6800, ortalama 4142.8 dur. G-CSF verilen verilmeyen gruplarda preoperatif nötrofil değerleri postoperatif değerleriyle karşılaştırıldığında artmıştır fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Tablo 9. Makroveziküler ve mikroveziküler yağlanmanın Kİ-67 indeksine etkisi

	Makroveziküler Yağlanma (n=14)	Mikroveziküler Yağlanma (n=14)	Kİ67 (n=14)
Makroveziküler Yağlanma n=14	1.00	-0.182	-0.085*
Mikroveziküler Yağlanma n=14	-0.182	1.00	-0.096*
Kİ67 n=14	-0.085	-0.096	1.00*

*Correlations

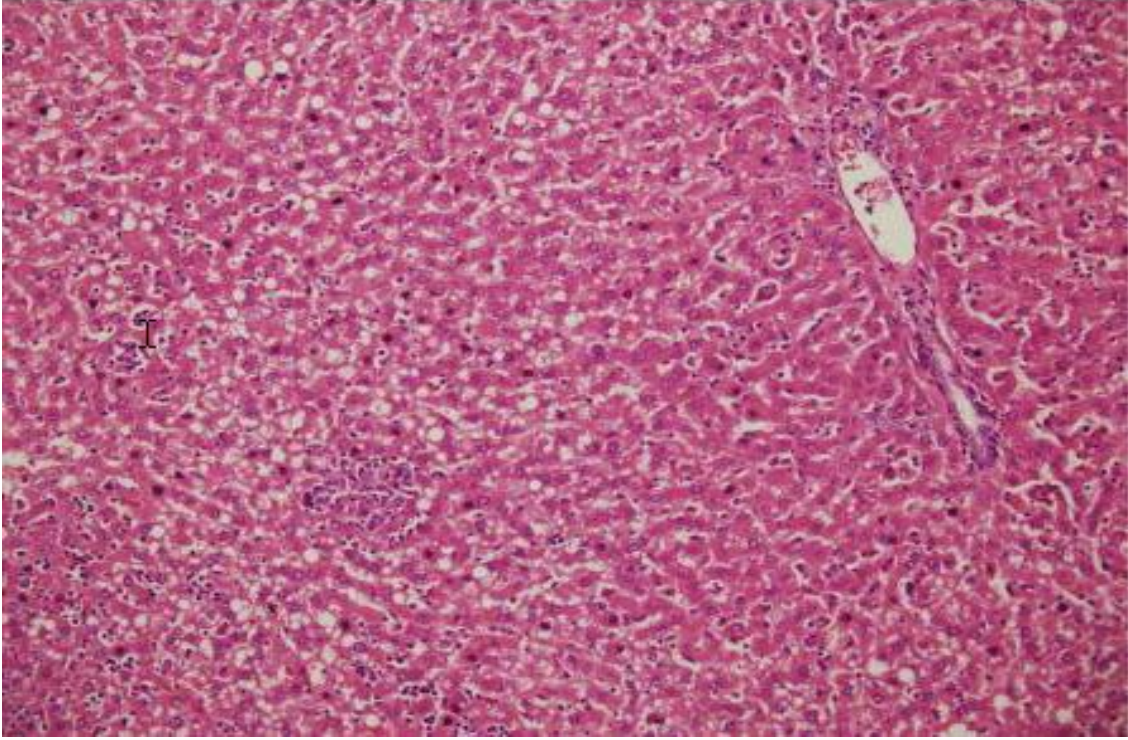
Makroveziküler yağlanma, mikroveziküler yağlanma ve ki67 arasında olumsuz yönde orta kuvvette anlamlı bir ilişki vardır.

%70 yağlı diyetle 8 hafta beslendikten sonra karaciğerinde yağlanma sağlanamayan ratlarda oldu. Bu ratlardan üçü G-CSF verilen grupta, üçü ise G-CSF verilmeyen gruptaydı.

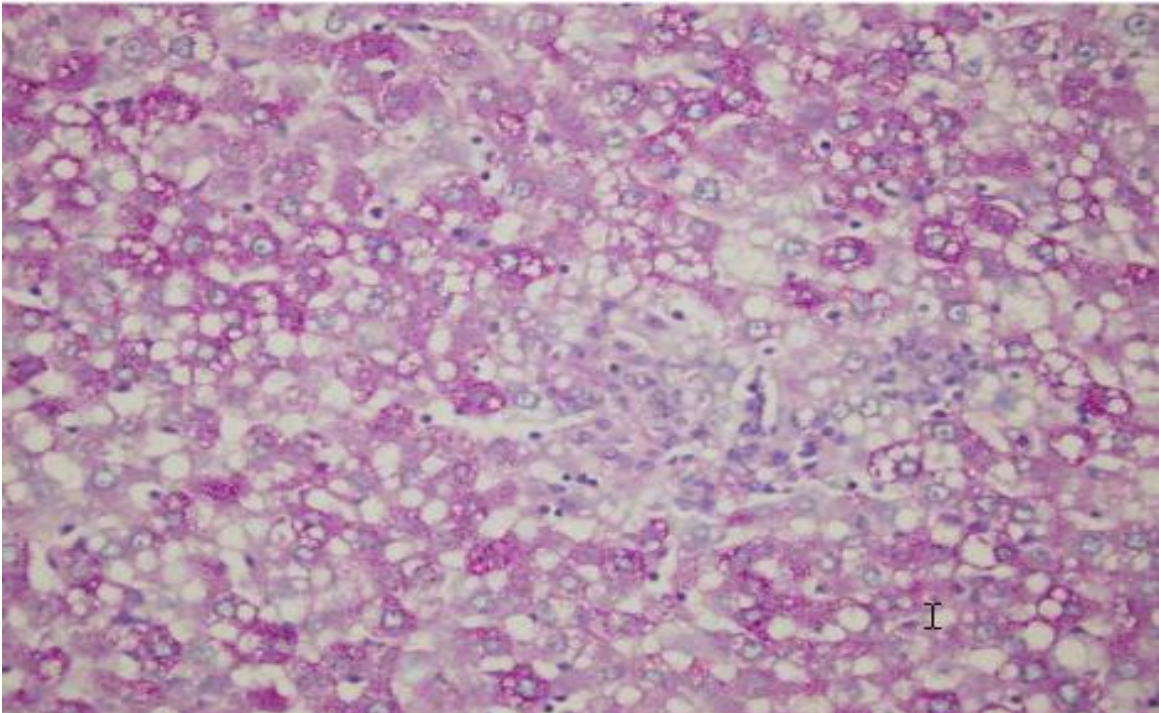
Aşağıdaki tabloda karaciğerde yağlanma sağlanamayan ratlarda grup içine alarak Ki-67 ile makroveziküler ve mikroveziküler yağlanma oranlarının korelasyonu hesaplanmıştır.

Tablo 10. Karaciğerde steatoz sağlanamayan ve steatoz sağlanan ratların Kİ-67 indeksi karşılaştırılması. Dört grup arasında karaciğer rejenerasyonu açısından anlamlı olarak fark var. G-CSF verilen gruplarda verilmeyen gruplara göre rejenerasyon anlamlı olarak daha fazladır. Karaciğer yağlanması olan ve olmayan gruplarda G-CSF kullanımı benzer olarak rejenerasyonu arttırmıştır.

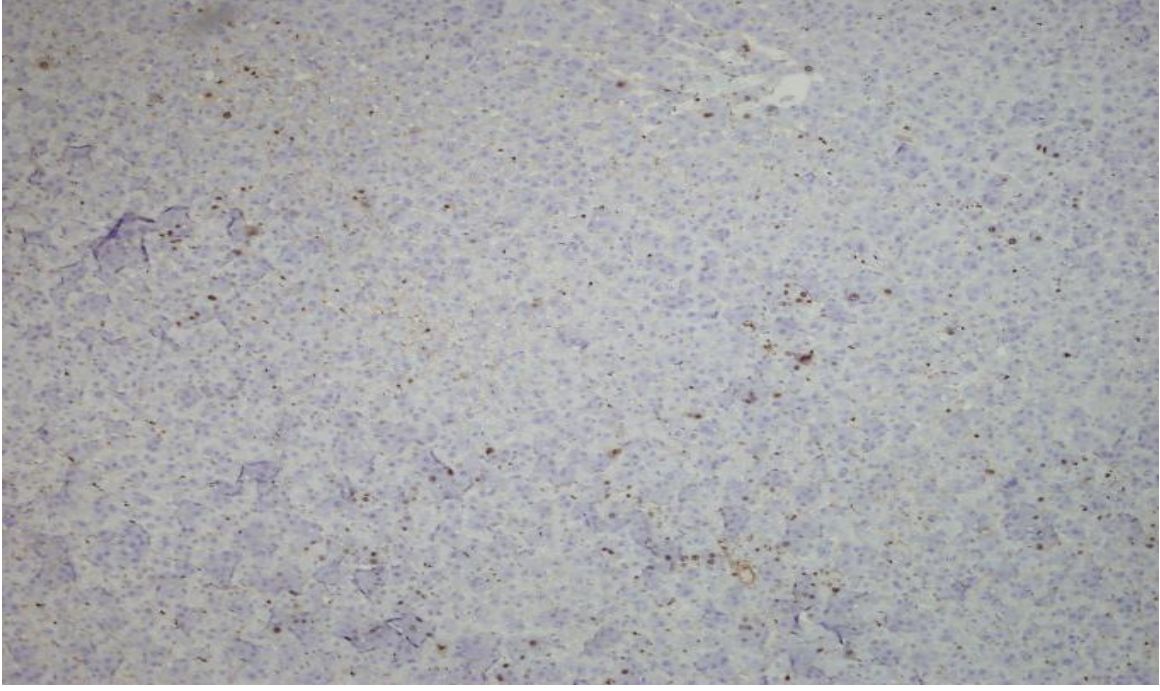
Kİ67	n	Ortalama	Standart Deviasyon	
Karaciğer yağlanma olmayan ve G-CSF verilmeyen	3	67,67	17,502	
Karaciğerde yağlanma olmayan ve G-CSF verilen	3	203,33	20,817	P=0,001
Karaciğerde yağlanma olan ve G –CSF verilmeyen	7	90,14	20,570	
Karaciğerde yağlanma olan ve G-CSF verilen grup	7	162,71	34,101	
Toplam	20	129,15	54,956	



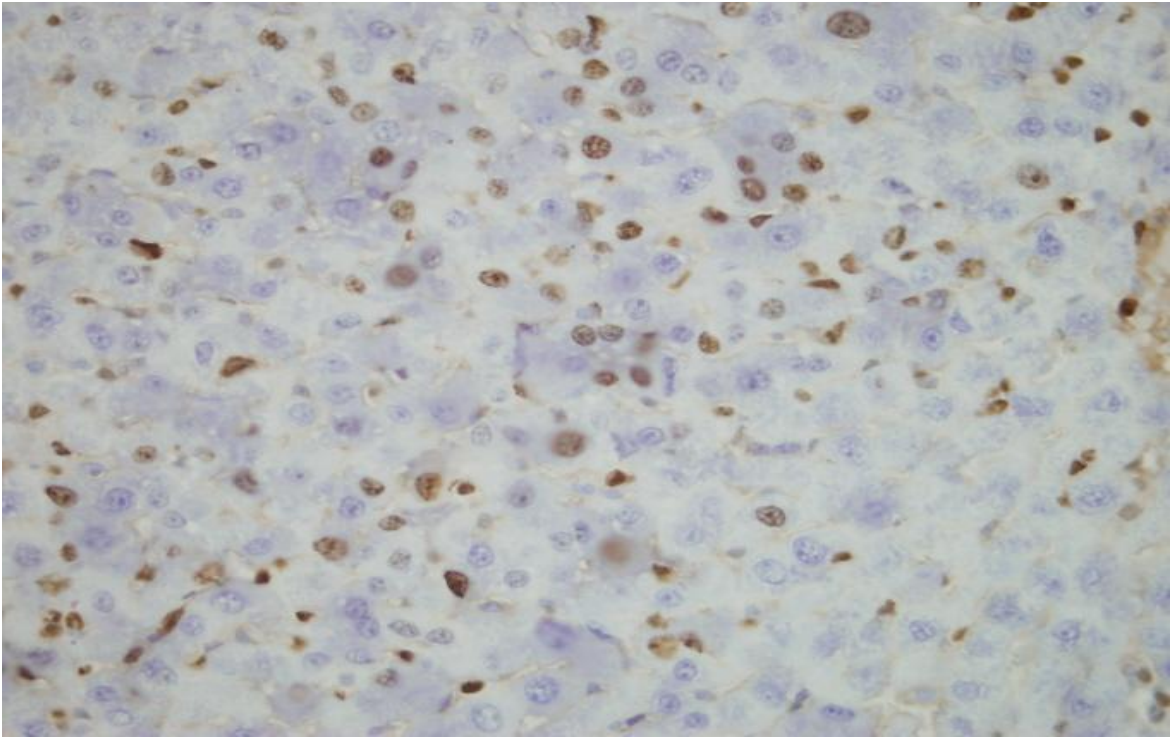
Resim 8. Makroveziküler steatoz belirgin lobuler ve portal alan inflamasyon izlenmektedir (H&E, X200) .



Resim 9. Makroveziküler steatoz ve portal alan inflamasyonu daha net izlenmektedir (PAS, X400).



Resim 10. Ki-67 5.günde nükleer boyanma (X100).



Resim 11. KI-67 5.günde nükleer boyanma (X400).

6. TARTIŞMA

Günümüzde majör hepatik rezeksiyon yapılacak ya da karaciğer transplantasyonu amacıyla donör hepatektomi uygulanacak kişilerde en önemli sorunlardan biri kalan karaciğer dokusunun yeterliliğidir. Beslenme alışkanlıklarının düzensizliği, kullanılan birçok ilaç ve hastalıklar kişilerde NAYKH'na sebep olmaktadır. Karaciğer yağlanması rejenerasyonu olumsuz yönde etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda karaciğer rejenerasyonunu arttırmak için vasküler endotelial büyüme faktörü, kalsitonin gen peptit, fosfat gibi maddeler kullanılmaktadır (75,76) . Literatürde normal karaciğerde G-CSF ninde rejenerasyonu arttırdığı gösterilmiştir (12,14,15,73). Çalışmamızda G-CSF nin steatotik karaciğerde rejenerasyona etkisini araştırdık.

G-CSF nötrofil koloni oluşturan hücrelerin proliferasyonunu ve differansiasyonunu uyaran bir hematopoetik büyüme faktörüdür (12). G-CSF reseptörleri myeloid seri hücrelerinin yanı sıra hepatositler ve vasküler endotelial hücreler gibi non-hematopoetik hücreler tarafından da eksprese edilmektedir (12). Son çalışmalar G-CSF' nin kemirgenlerde hepatik rejenerasyonu uyardığını söylemektedir. Theocharis ve ark. ratlarda %70 hepatik rezeksiyon ve tiyoasetamide bağlı karaciğer yetmezliklerinde G-CSF tedavisinin hepatik rejenerasyonu artırdığını göstermişlerdir (12,14,15). Bir diğer çalışmada ratlarda %83 hepatektomi öncesi verilen G-CSF in karaciğer rejenerasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (73). Fakat literatürde steatotik karaciğerli ratlarda G-CSF in karaciğer rejenerasyonuna etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada steatotik karaciğerli ratlarda preoperatif verilen G-CSF in karaciğer rejenerasyonunu istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı gösterildi.

Ratlar için çeşitli yağlandırma modelleri mevcuttur. Bunlar yüksek şükroz/fruktozlu diet, argininden fakir diet, methionin ve kolinden fakir diet, steroid ve tamoksifenle oluşturulan diet ve bizimde çalışmamızda uyguladığımız Liber ve Carli'nin tanımladığı yüksek yağ içerikli diettir (%71 yağ,%11 karbonhidrat,%18 protein). Bu dieti kullanmamızın nedeni ise karaciğer yağlanmasını kısa bir sürede arttırması, kolay uygulanabilir ve kolay temin edilebilir olmasıdır. Yukarıda bahsettiğim karaciğer yağlandırma modelleri içerisinde yer alan methionin ve kolinden fakir diet en hızlı şekilde ratlarda karaciğer yağlanması sağlamaktadır (71,72).

Litaratürde ratlarda karaciğer rejenerasyonunu göstermek için en uygun modelin bizimde uyguladığımız %70 hepatektomi modeli olduğu gösterilmiştir (47,48). %70

hepatektomi modelinde bir haftalık sürede %100'ü yaşar (47). Bizim çalışmamızda 5 günlük mortalite %14 olarak tespit edilmiştir.

Serum transaminazlarının hepatosit hasarını göstermede duyarlılığı çok yüksektir, etiyolojik faktörden bağımsız olarak karaciğer zedelenmesi sürdüğü tüm durumlarda serum seviyeleri yükselir. Karaciğerde hücre yıkımını gösteren en güvenilir parametrelerden birisi ALT düzeyidir (74). Bizim çalışmamızda tüm gruplarda yapılan %70 hepatektomi ALT ve AST düzeylerinin yüksek olmasında etken olmuştur. G-CSF verilmeyen grupta postoperatif 5.günde AST, ALP ve direk bilirubin değerleri anlamlı olarak artmıştır. G-CSF verilen yağlı karaciğer grubunda da postoperatif 5.günde AST, ALT, ALP ve total bilirubin değerleri anlamlı olarak artmıştır. G-CSF kullanılan nötropenik hastalarda nötrofil sayısını arttırdığı gösterilmiş ve klinik uygulamada uzun süreden beri kullanılan bir preparattır. Ancak bu çalışmada G-CSF verilen ratların nötrofil sayıları artmış lakin istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Yapılan çalışmalarda karaciğer rejenerasyon kriterlerinin tanımlanması için DNA sentezi ve mitoz sayısı, karaciğer volümü, hücre proliferasyonu ve mitokondrial aktivite gibi birçok marker kullanılmıştır (14). Gerdes ve ark. tarafından hücre çekirdeğinde bulunan Ki-67 antijen ve buna karşı oluşan monoklonal antikor tariflenmiştir (67,68,69). Ki-67 proteini tüm hücre sikluslarında tariflenmiştir (67,68,69). Hücre siklusu ilerledikçe antijen içeriği artar. G2-M evresinde maksimal seviyeye erişir. Ki-67 antijenine karşı tanımlanan monoklonal antikor ise hücre siklusunun G0 evresi hariç diğer tüm evrelerinde gösterilmiştir. Bizde çalışmamızda rejenerasyon göstergesi olarak Ki-67'yi kullandık.

Parsiyel hepatektomiden 5 gün sonra gerçekleştirilen total hepatektomi piyesinde G-CSF verilmeyen gruptaki Ki-67 indeksinin, G-CSF verilen gruptakiler ile karşılaştırıldığında çok daha düşüktü. Bu da bize G-CSF in karaciğer rejenerasyonunu belirgin bir şekilde arttırdığını göstermektedir. G-CSF kullanımı bize daha geniş karaciğer rezeksiyonları yapma şansı verecektir. Ancak G-CSF in klinik uygulamada karaciğer rejenerasyonunu arttırıcı etkisi nedeniyle kullanılması için daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. SONUÇLAR

***G-CSF steotatik karaciğerli ratlarda rejenerasyonu istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırmaktadır (p=0.002).**

***Karaciğer yağlanması rejenerasyonu baskılamaktadır.**

8.KAYNAKLAR

1. Rasjeza-Wyszomirska J ,Lawniczak M, Marlicz W, Miezyńska-Kurtycz J, P.Non-alcoholic fatty liver disease. Pol Merkur Lekarski 2008 ;24(144):56871
2. Brunt EM, Elizabeth M. Nonalcoholic steatohepatitis:Definition and pathology. Seminar in liver disease 2001;21:3-16
3. Harrison SA, Kadaika S, Lang KA, Schenker S. Nonalcoholic steatohepatitis: What we know in the new millenium. The American Journal of Gastroenterology 2002; 97(11):2714:2724
4. Neuschwander-Tetri BA. Evolving pathophysiologic concepts in nonalcoholic steatohepatitis. Curr Gastroenterol Rep 2002 ;4(1):31-6
5. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. Mayo Clin Proc 1980;55:434-438.
6. Astarcioglu H, Karademir S, Atila K, Astarcioglu I. The effects of vascular bed expansion in steatotic rat liver graft viability. Transpl Int. 2004 ;17(4):188-94.
7. Nagasue N, Yukaya H, Ogawa Y et al. Human liver regeneration after major hepatic resection. Ann Surg 1987;206:30-9.
8. Wheatley J, Rosenfield NS, Berger L. Liver regeneration in children after major hepatectomy for malignancy. J Surg Res 1996;61:183-189.
9. Adam R, Reynes M, Johann M, Astarcioglu I, Kafetzis I, Bismuth H, The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. Transplant Proc. 1991 ;23(1 Pt 2):1538-40.
10. Michalopoulos GK, De Frances MC. Liver regeneration. Science 1997;276:60-66
11. Burke A, Lucey MR. Non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and orthotopic liver transplantation. Am J Transplant. 2004 ;4(5): 686-93.
12. Holm M. Not all healthy donors mobilize hematopoietic progenitor cells sufficiently after G-CSF administration to allow for subsequent CD34 purification of the leukapheresis product. J Hematother.1998;7:111–113.
13. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. Blood. 1991;78:2791–2808.

14. Theocharis SE, Agapitos EB, Margeli AP, Goutas ND, Kittas CN, Davaris PS. Effect of two forms of granulocyte-colony-stimulating factor on hepatic regeneration after 70% partial hepatectomy in rats. *Clin Sci (Lond)*. 1997;92:315–320.
15. Theocharis SE, Margeli AP, Kittas CN. Effect of granulocyte colony-stimulating-factor administration on tissue regeneration due to thioacetamide-induced liver injury in rats. *Dig Dis Sci*. 1999;44:1990–1996
16. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980;55:434-438.
17. Schaffner F, Thaler H. Nonalcoholic fatty liver disease. *Prog Liver Dis* 1986;8:283-298.
18. Angulo P, Nonalcoholic fatty liver disease. *New England J of medicine* 2002;346:1221-1231
19. Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in northern Italy. *Ann Intern Med* 2000;132:112-117.
20. Luyckx FH, Desai C, Thiry A, et al. Liver abnormalities in severely obese subjects: effect of drastic weight loss after gastroplasty. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998;22:222-226.
21. Tominaga K, Kurata JH, Chen YK, et al. Prevalence of fatty liver in Japanese children and relationship to obesity: an epidemiological ultrasonographic survey. *Dig Dis Sci* 1995;40:2002-2009.
22. Clark JM, Brancati FL, Diehl AME. Nonalcoholic fatty liver disease: the most common cause of abnormal liver enzymes in the U.S. population. *Gastroenterology* 2001;120
23. Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, et al. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes Care* 1998;21:518-524.
24. Manton ND, Lipsett J, Moore DJ, Davidson GP, Bourne AJ, Couper RTL. Nonalcoholic steatohepatitis in children and adolescents. *Med J* 2000;173:476-479
25. Struben VMD, Hespenheide EE, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis and cryptogenic cirrhosis within kindreds. *Am J Med* 2000;108:9-13.
26. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999;341:556-562.
27. Rashid M, Roberts EA. Nonalcoholic steatohepatitis in children. *J Pediatr Gastroenterology Nutr* 2000;30:48-53.
28. Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in northern Italy. *Ann Intern Med* 2000;132:112-117.

29. Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X, Schneider S. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes* 1998;47:699-713.
30. Assy N, Kaita K, Mymin D, Levy C, Rosser B, Minuk G. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. *Dig Dis Sci* 2000;45:1929-1934.
31. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999;107:450-455.
32. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-2474
33. Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL. Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998;22:3947
34. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997;46:3-10. [Erratum, *Diabetes* 1997;46:536.]
35. Hotamisligil GS, Peraldi SP, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665-668
36. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000;105:1067-1075.
37. Fan C-Y, Pan J, Usuda N, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK. Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase: implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. *J Biol Chem* 1998;273:15639-15645.
38. Chavin KD, Yang SQ, Lin HZ, et al. Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem* 1999;274:5692-5700.
39. Leonarduzzi G, Scavazza A, Biasi F, et al. The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor 1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *FASEB J* 1997;11:851-857.
40. Watson AM, Poloyac SM, Howard G, Blouin RA. Effect of leptin on cytochrome P-450, conjugation, and antioxidant enzymes in the ob/ob mouse. *Drug Metab Dispos* 1999;27:695-700.
41. Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, et al. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999;31:430-434.

42. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-1192.
43. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 2001;121:91-100.
44. Paulo N. A. Martins, Tom P. Theruvath and Peter Neuhaus ,Rodentmodels of partial hepatectomies, *Liver International* 2007; 1478-3223
45. Kongure K, Ishizaki M, Nemoto M, Kuwano H, Makuuchi M. A comparative study of the anatomy of the rat and human livers. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999; 6: 171–5.
46. Wang J, Tahara K, Hakamata Y, et al. Auxiliary partial liver grafting in rats: effect of host hepatectomy on graft regeneration, and review of literature on surgical technique. *Microsurgery* 2002; 22: 371–7.
47. Martins PN, Neuhaus P. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver Int* 2007; 27: 384–92.
48. Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, Dahmen U. Marginal hepatectomy in the rat: from anatomy to surgery. *Ann Surg* 2006; 244: 89–98.
49. Shirabe K, Shimada M, Gion T, et al. Postoperative liver failure after major hepatic resection for hepatocellular carcinoma in the modern era with special reference to remnant liver volume. *J Am Coll Surg* 1999; 188: 304–9.
50. Grisham JW. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res* 1996; 22: 842–9.
51. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. Restoration oh the liver of the white rat following surgical removal. *Arch Pathol* 1931;12:186-206.
52. Ethier C, Kestekian R, Christine B, Dube C et all. Vitamin D depletion retardsthe normal regeneration process after partial hepatectomy in the rat. *Endocrinology* 1990;126: 2947 2959.
53. Holt DR, Thiel DV, Edelstein S, Brems JJ. Hepatic resections. *Arch Surg* 2000;135:1353-1358.
54. Diehl AM, Rai R. Review:regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11:466-470.
55. Fausto N, Webber EM. Liver regeneration. In:Arias I, Boyer J, Fausto N, et al.eds. *The liver:biology and pathobiology*. New York: Raven Pres; 1994:1059-1084.

56. Perek S, Kapan S, Ed:Değerli U,Bozfakıoğlu Y. Cerrahi Gastroenteroloji. s.194-208. 5.Basım, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2000.
57. Nishizaki T, Takenaka K, Yoshizumi T. Alteration in levels of human hepatocyte growth factor following hepatectomy. J Am Coll Surg 1995;181:6-10.
58. Michalopoulos GK. Liver regeneration: molecular mechanism of growth control. FASEBJ 1990;4:176-87.
59. Hashimoto M, Kothary BC, Raper S. The effects of transforming growth factor alpha and somatostatin on regenerating hepatocytes in the rat. Regulatory peptides 1993;44:49-59.
60. Strazl TE, Porter KA, Kashiwagi N. Portal hepatotrophic factors, diabetes mellitus and acute liver atrophy, hypertrophy and regeneration. Surg Gynecol Obstet 1975;141:843-58.
61. Francavilla A, Polimeno L, Barone M. Hepatic regeneration and growth factors. J Surg Oncol 1993;13:1-7.
62. Van Thiel DH, Stauber R, Gavalier JS et al. Hepatic regeneration. Effects of age, sex hormone status, prolactin and cyclosporine. Dig Dis Sci 1991;36:1309-12.
63. Ekberg S, Luther M, Nakamura T. Growth hormone promotes early initiation of hepatocyte growth factor gene expression in the liver of hypophysectomised rats after partial hepatectomy. J Endocrinol 1992;135:59-67.
64. Goss JA, Mangino MJ, Callery MP. Prostaglandin E2 down regulates kupffer cell production of IL-1 and IL-6 during hepatic regeneration. Am J Physiol 1993;601-8.
65. Maruyama H, Harada A, Kurokawa T, Kobayashi H, Nonami T, Nakao A. Duration of liver ischemia and hepatic regeneration after hepatectomy in rats. J Surg Res 1995; 58:290/294.
66. Chow PKH, Jeyaraj P, Tan SY, Cheong SF, Soo KC. Serial ultrasound-guided percutaneous liver biopsy in a partial hepatectomy porcine model: a new technique in the study liver regeneration. J Surg Res 1997;70:134-137.
67. Hopf NJ, Brem J, Bohl J, Perneczky A. Image analysis of proliferating cells in tumors of the human nervous system:an immunohistological study with the monoclonal antibody Ki-67. Neurosurgery 1994; 35(5): 917-923.
68. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a Mouse monoclonal antibody reactive with a human antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer 1983;31:13-20.
69. Hopf NJ, Brem J, Bohl J, Perneczky A. Image analysis of proliferating cells in tumors of the human nervous system:an immunohistological study with the monoclonal antibody Ki-67. Neurosurgery 1994; 35(5): 917-923.

70. Dalquen P, Baschiera B, Chaffard R, Dieterich H, Feichter GE. MIB-1 (Ki-67) immunostaining cancer cells in cytologic smears. *Acta Cytol* 1997;41(2):229-237
71. Lieber CS, Leo MA, Mak KM, et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004;79:502-9.
72. Okan A, Astarcioglu H, Tankurt E, Sagol O, Astarcioglu I, Gonen O ; Effect of ursodeoxycholic acid on hepatic steatosis in rats. *Dig Dis Sci.* 2002 ;47(11):2389-97.
73. Inderbitzen D, Beldi G, Sidler D, Studer P, Keogh , Granulocyte Colony-stimulating Factor Supports Liver Regeneration in a Small-for-size Liver Remnant Mouse Model. *J Gastrointest Surg* (2007) 11:280–285
74. Hamanoue M, Kawaida K, Takao S et al. Rapid and marked induction of hepatocyte growth factor during liver regeneration after ischemic or crush injury. *Hepatology* 1992;16:1485-92.
75. Hung KC, Hsiao PM, Yang KL, Lin KJ, Hung CH, Effect of thalidomide on the expression of vascular endothelial growth factor in a rat model of liver regeneration. *J.Surg Res* 2013 ;852-856
76. Mizutani T, Yokoyama Y, Kokuryo T, Kawai K, Nagino M Calcitonin gene-related peptide regulates the early phase of liver regeneration. *J.Surg Res*, 2012