



T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**ANTİ-TNF<sub>α</sub> MONOKLONAL ANTİKOR  
TEDAVİSİNİN KARACİĞER REZEKSİYONU  
SONRASI REJENERASYON SÜRECİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. AYKUT SOYDER

DANIŞMAN

Doç. Dr. M. Hakan ÇEVİKEL

**AYDIN - 2008**

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**ANTİ-TNF<sub>α</sub> MONOKLONAL ANTİKOR  
TEDAVİSİNİN KARACİĞER REZEKSİYONU  
SONRASI REJENERASYON SÜRECİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. AYKUT SOYDER

DANIŞMAN

Doç. Dr. M. Hakan ÇEVİKEL

**AYDIN - 2008**

## ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim süresince her zaman bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarım sayın Prof. Dr. Şükrü BOYLU, sayın Doç. Dr. M. Hakan ÇEVİKEL, sayın Doç. Dr. Hedef ÖZGÜN, sayın Doç. Dr. Ahmet Ender DEMİRKIRAN, sayın Doç. Dr. Serdar M. ÖZBAŞ, sayın Doç. Dr. Pars TUNÇYÜREK ve Yrd. Doç. Dr. Hakan ERPEK'e şükranlarımı sunarım.

Ayrıca; tezimin tüm aşamalarında bana destek olan tez danışmanım sayın Doç. Dr. M. Hakan ÇEVİKEL ve sayın Doç. Dr. Pars TUNÇYÜREK'e laboratuvar çalışmalarını yürüten Prof. Dr. Çiğdem YENİSEY'e ve patoloji değerlendirme kısmını yürüten Yrd. Doç. Dr. İbrahim METEOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Katkılarından dolayı karşılıklı sevgi ve saygı ile birlikte çalıştığım araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve bugüne kadar desteğini benden esirgemeyen eşime teşekkür ederim.

Dr. Aykut SOYDER

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>TABLO LİSTESİ</b> :	<b>I</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> :	<b>II</b>
<b>SİMGE VE KISALTMALAR</b> :	<b>III</b>
<b>RESİM VE GRAFİK LİSTESİ</b> :	<b>VI</b>
<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> :	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b> :	<b>4</b>

- Karaciğer
  - Karaciğer Anatomisi
    - Vasküler Anatomi
  - Karaciğer Embriyolojisi ve Fonksiyonel Histolojisi
  - Karaciğerin Fonksiyonları
  - Karaciğer Rejenerasyonu
    - Parsiyel Hepatektomi Sonrası Hücre Replikasyonu
    - Parsiyel Hepatektomi Sonrası Transkripsiyon Faktör Aktivasyonu
    - Karaciğer Rejenerasyonunda Moleküler Mekanizma
    - Karaciğer Rejenerasyonunu Aktive Eden Faktörler
    - Karaciğer Rejenerasyonunu İnhibe Eden Faktörler
- Hepatosellüler Zedelenmenin Değerlendirilmesi
- Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar
  - Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri
  - Serbest Radikallere Karşı Hücrel Savunma (antioksidanlar)

<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b> :	<b>33</b>
--------------------------	-----------

- Deneysel Model
  - Çalışma Grupları
  - Cerrahi İşlem
- Parametreler

- Morfolojik Parametreler
- Biyokimyasal Parametreler
- Karaciğer Doku Takibi
- İmmünohistokimyasal Uygulamalar
- Patolojik Değerlendirme
- Yöntemler
  - Dokuların Homojenizasyonu
  - İstatistiksel Analiz

<b>SONUÇLAR</b>	<b>:</b>	<b>40</b>
● Biyokimyasal İncelemeler		
● Histopatolojik Değerlendirme		
● Rejenerasyon Volümü		
<b>TARTIŞMA</b>	<b>:</b>	<b>47</b>
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>:</b>	<b>56</b>
<b>ÖZET</b>	<b>:</b>	<b>57</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>:</b>	<b>58</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>:</b>	<b>59</b>

## TABLO LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo- I</b> : Parsiyel hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunda gen aktivitesi zinciri.	<b>18</b>
<b>Tablo- II</b> : Regenerasyon sürecindeki kronolojik sıralama.	<b>18</b>
<b>Tablo- III</b> : Hepatik rejenerasyon sırasında büyümeyi etkileyen faktörler.	<b>19</b>
<b>Tablo- IV</b> : Grupların A: AST, B: ALT (U/L) değerleri.	<b>41</b>
<b>Tablo- V</b> : Grupların A: CAT, B: GSH, C: MDA, D: NO değerleri.	<b>42</b>
<b>Tablo- VI</b> : Grupların A: IL-4, B: IL-6 değerleri.	<b>43</b>
<b>Tablo- VI</b> : Grupların BrdU işaretlenme değerleri.	<b>44</b>
<b>Tablo- VII</b> : Grupların volümetrik rejenerasyon oranları.	<b>46</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil- 1</b> : Karaciğer anatomisi.	<b>4</b>
<b>Şekil- 2</b> : Karaciğerin anatomik segmentasyonu.	<b>5</b>
<b>Şekil- 3</b> : Karaciğerin embriyolojik gelişimi.	<b>7</b>
<b>Şekil- 4</b> : Karaciğerin histolojik yapısı.	<b>8</b>
<b>Şekil- 5</b> : Normal sıçan karaciğerinin çıkarımı ve haftalar süresince gerçekleşen rejenerasyonu.	<b>12</b>
<b>Şekil- 6</b> : Rejenerasyon süresince çıkarılan karaciğer yüzdesi ile rejenere olan karaciğer dokusunun toplam ağırlığı arasındaki ilişki.	<b>12</b>
<b>Şekil- 7</b> : Karaciğer rejenerasyonunda gerçekleşen hücresel etkileşim.	<b>13</b>
<b>Şekil- 8</b> : Karaciğer rejenerasyon süreci.	<b>14</b>
<b>Şekil- 9</b> : Karaciğer rejenerasyon sürecinde priming ve progresyon fazları.	<b>15</b>
<b>Şekil- 10</b> : Transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna ve DNA sentezinin başlamasına yol açan olaylar.	<b>16</b>
<b>Şekil- 11</b> : Karaciğer hasarında anti-TNF antikorunun etkinliği.	<b>22</b>
<b>Şekil- 12</b> : İmmün sistemdeki farklı hücrelerde TACE aktivitesine bağlı olarak TNF <sub>α</sub> ekspresyonu.	<b>23</b>
<b>Şekil- 13</b> : Serbest oksijen radikallerinin etkileri sonucunda gelişen hücre hasarı.	<b>29</b>
<b>Şekil- 14</b> : Antioksidan savunma sistemleri.	<b>30</b>
<b>Şekil- 15</b> : % 70' lik karaciğer parankiminin rezeksiyon tekniği.	<b>35</b>

## SİMGE VE KISALTMALAR

- A** : Arteria  
**ALT** : Alanin aminotransferaz  
**ALP** : Alkalen fosfataz  
**AP-1**: Nuclear Adaptor Protein complex-1  
**AST** : Aspartat aminotransferaz  
**BrdU** : 5-bromo2'-deoxy-uridine  
**cAMP** : Siklik adenzin monofosfat  
**CAT**: Katalaz  
**C/EBP** : CCAAT enhancer binding protein-beta  
**DNA** : Deoksiribonükleik asit  
**EGF** : Epidermal büyüme faktörü  
**ELISA** : Enzyme-Linked Immunoassay  
**FGF**: Fibroblast büyüme faktörü  
**GM-CSF**: Granülosit makrofaj koloni stimulan faktör  
**GSH**: Glutasyon  
**GSH-Px**: Glutasyon peroksidaz  
**GST**: Glutasyon S transferaz  
**H&E** : Hemotoksilen-Eosin  
**HDL** : Yüksek dansiteli lipoprotein  
**HGF** : Hepatosit büyüme faktörü  
**HSS**: Hepatosit uyarıcı faktör  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: Hidrojen peroksit  
**IL-1** : İnterlökin-1  
**IL-2** : İnterlökin-2  
**IL-4** : İnterlökin-4  
**IL-6** : İnterlökin-6  
**IL-8** : İnterlökin-8  
**IL-10**: İnterlökin-10  
**IL-13**: İnterlökin-13  
**IL-Ira**: IL-1 reseptör antagonistleri



**LDL** : Düşük dansiteli lipoprotein  
**IEGS**: The immediate early genes (acil erken faz genleri)  
**I\B**: Inhibitor Kappa B  
**Lig**: Ligamentum  
**L**: Leflunomid  
**LOO**: Lipid hidroperoksit  
**MDA**: Malondialdehit  
**MI** : Mitotik indeks  
**m** : Mikrometre  
**NO** : Nitrik oksit  
**NO<sub>2</sub>**: Azot dioksit  
**NOS**: Nitrik oksit sentetaz  
**NF-κB** : B hücreleri kapa zinciri için nükleer faktör  
**OH**: Hidroksil radikali  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>**: Süperoksit  
**O<sub>3</sub>**: Ozon  
**PBS**: Phosphate Buffer Saline (fosfat tuzu tamponu)  
**PCNA** : Prolifere olan hücre nükleer antijeni  
**PH**: Parsiyel hepatektomi  
**PLGSH-Px**: Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz  
**PO<sub>2</sub>**: Parsiyel oksijen basıncı  
**RES** : Retikuloendotelial sistem  
**RO**: Rejenerasyon Oranı  
**ROS**: Reaktif oksijen türleri  
**SOR**: Serbest oksijen radikalleri  
**SOD**: Süperoksit dismutaz  
**STAT<sub>3</sub>** : Transkripsiyon aktivatörleri ve transdüksiyon belirteci  
**TACE**: TNF<sub>α</sub> Converting Enzyme  
**TGF** : Transforming büyüme faktörü  
**TNF** : Tümör nekroze edici faktör  
**TNF-N** :Tumor Necrosis Factor-alfa

**TNFR:** Tümör nekroze edici faktör reseptörü

**VEGF:** Vasküler endotel büyüme faktörü

**VLDL :** ok düsük dansiteli lipoprotein

**C Celcius degree:** Santigrat derece

**mL mililiter:** Mililitre

**mg :** Miligram

**kg:** Kilogram

**cm:** Cantimeter (santimetre)

**rpm:** Revolution per minute (devir/dakika)

**L:** Liter (litre)

**micrometer** (mikrometre=mikron):  $10^{-6}$  metre

## RESİM ve GRAFİK LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Resim- 1</b> : Denek hayvanının karın bölgesinin hazırlanması ve laparotomi uygulaması.	<b>34</b>
<b>Resim- 2</b> : Rezeke edilen %70'lik karaciğer bölümü.	<b>35</b>
<b>Resim- 3</b> : Alınan kan ve doku örnekleri.	<b>36</b>
<b>Resim- 4</b> : Tüm gruplarda hepatositlerde BrdU ile nükleer pozitif boyanma gösteren hücrelere örnekler.	<b>45</b>
<b>Grafik- 1</b> : Grupların A: AST ve B: ALT değerleri	<b>41</b>
<b>Grafik- 2</b> : Grupların A: CAT, B: GSH, C: MDA, D: NO değerleri.	<b>42</b>
<b>Grafik- 3</b> : Grupların A: IL- 4, B: IL- 6 değerleri.	<b>43</b>
<b>Grafik- 4</b> : Grupların BrdU ile işaretlenme değerleri.	<b>44</b>
<b>Grafik- 5</b> : Grupların volümetrik rejenerasyon oranları.	<b>46</b>

## GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer, vücudun en büyük organı olup metabolik fonksiyonların düzenlenmesinde büyük rol oynar. Kan glikoz dengesi, plazma protein sentezi, lipid ve lipoprotein sentezi, safra asit sentezi ve sekresyonu, vitamin depolanması (A, D, E, K ve B<sub>12</sub>), endojen ve eksojen bileşiklerin biyotransformasyonu, detoksifikasyonu ve ekspresyonu gibi birçok temel fizyolojik olaylarda merkezi bir rolü vardır(1). Karaciğerde meydana gelebilecek herhangi bir fonksiyon bozukluğu vücuttaki tüm sistemleri etkiler. Bu nedenle parsiyel hepatektomi sonrası karaciğer fonksiyonlarının devamı için rezeksiyon öncesi ve rezeksiyon sırasındaki iskeminin etkisinin ve süresinin azaltılması, rezeksiyon sonrası hepatik kan akımının artırılması ve bir dizi inflamatuvar olayın kontrol altında tutulması günümüzde giderek önem kazanmaktadır(2).

Karaciğer kendisini onarabilme yeteneği ile vücuttaki diğer organlardan daha avantajlıdır. Karaciğer çeşitli nedenlerle zarar görmesi karşısında, fonksiyonel kütlesini tamamlama yönünde proliferasyona ve replikasyona başlayabilir(3). Hepatektomi, karaciğerin benign ve malign hastalıklarının tedavisinde önemli bir yöntemdir. Hepatektomi için endikasyonlar arasında primer ve sekonder malign tümörler, benign tümörler, travmatik rüptürler, canlıdan karaciğer nakli, kistler ve abseler yer alır. Hepatektomi ve hepatositlerin virüs ya da kimyasallardan zarar görmesi sonrasında hepatosit replikasyonunun arttığı görülür. Normalde nadiren bölünen hepatositler için bu özellik son derece önemlidir. Karaciğerin, önemli doku kaybı durumlarında kendisini birkaç hafta içinde onarabilecek hücreler arası eşsiz bir etkileşim ve karmaşık bir mediatör sistemi bulunur(4). İnsan ve hayvanlarda deneysel olarak parsiyel hepatektomiden sonra rejenerasyonun ve karaciğerin yeniden yapılanması için endokrin, parakrin ve otokrin etkileşimler gereklidir(5).

Majör karaciğer rezeksiyonlarından sonra kalan karaciğer dokusunun fonksiyonel ve rejeneratif kapasitesi ameliyat sonrası mortalite ve morbiditeyi önemli ölçüde etkiler. Günümüzde bilgisayarlı tomografi, anjiyografi ve sintigrafi gibi yöntemlerle yapılan çalışmalarda, karaciğer rezeksiyonu sonrası erişkinlerde üç ile altı ayda, çocuklarda üç aydan daha kısa bir süre içerisinde karaciğerin eski boyutuna ulaştığı gösterilmiştir(6, 7). İnsan karaciğerinin %80-85'e varan rezeksiyonları bile tolere edebildiği bildirilmektedir(8). Rezeksiyon %10'dan az bile olsa rejenerasyon gerçekleşmektedir(9). Hepatosit hücre bölümlerinden kaynaklanan çeşitli hepatosit büyüme faktörlerinin etkilerinin araştırılması ve

rejenerasyonun farklı evrelerinde gen ekspresyonunun monitörize edilmesi, karaciğer rejenerasyonunu anlamamızda önemli ilerlemelere sebep olmuştur. Parsiyel hepatektomi sonrası geride kalan karaciğer dokusunda rejenerasyonun ilk günden itibaren başladığı ve DNA sentezinin, hepatektomi sonrasında ilk 24-48 saatte maksimuma ulaştığı gösterilmiştir(10). Normalde hepatositlerde mitoz çok nadirdir. Fakat parsiyel hepatektomiden sonra 24 saat içinde aktif hücre replikasyonu başlar ve organın normal ağırlığına erişinceye kadar devam eder. İlk 10 gün içinde önemli ölçüde rejenerasyon oluşur ve bu olay dört, beş haftada tamamlanır. Eksize edilen loblar aynen eski şekillerini almazlar. Rejenerasyon daha çok yeni lobüllerin oluşması ve rezidü lobüllerin büyümesi şeklinde olur. Hepatik rejenerasyon için gerekli uyaranlar pankreas, diğer ekstrahepatik organlar ve rejenere olan karaciğerin bizzat kendisinden kaynaklanan humoral faktörlerdir(11,12).

Deneysel çalışmalar göstermiştir ki, bu humoral faktörler insülin, glukagon, hipofizer hormonlar ve arginindir(13). Bilinen en önemli rejenerasyon inhibitörü  $TGF_{\beta 1}$ 'dir. İto hücreleri tarafından hepatektomi sonrası erken dönemde salgılanır. Rejenerasyon devam ettiği sürece  $\alpha_2$  makroglobuline bağlı olarak inaktif formundadır. Zamanı geldiğinde aktive olarak rejenerasyonu sonlandırır. Bu zamanlamayı etkileyen faktörler bilinmemektedir. Karaciğer rejenerasyonunu arttırmak üzere yapılan çalışmalar giderek önem kazanmış ve bu konuya yoğunlaşmıştır. Sitokinlerin kontrol dışı veya aşırı üretimi ile çok sayıda klinik rahatsızlığa neden olduğu konusunda deliller giderek artmaktadır. IL- 1,  $TNF_{\alpha}$ , IL- 6, IL- 8 gibi bazı sitokinler immün reaksiyonların yanı sıra inflamasyonun başlamasında da önemli rol üstlenmektedir. Dolayısıyla bu sitokinlerin inhibisyonunu sağlayan ajanlardan son yıllarda TNF inhibisyonu ile kontrollü klinik çalışmalarda romatoid artrit ve Crohn hastalığı tedavisinde olumlu gelişmeler sağlandığı bildirilmektedir(14, 15, 16).

Karaciğerdeki farklı pro ve anti-inflamatuar sitokinlerin arttırdığı inflamatuvar süreç, birçok akut ve kronik karaciğer hastalığı, fibrozis ve siroz gelişimi ile sonuçlanmaktadır. Alkolik hepatit gelişimi  $TNF_{\alpha}$  ile ilişkilidir. Siroz, fibrozis, alkolik hepatit gibi birçok akut ve kronik karaciğer hastalığının tedavisinde anti TNF ilaçların (İnfliximab, Eternecept) kullanımının denenmesini akla getirmektedir. İnflamatuar sitokinler akut ve kronik karaciğer hastalıklarında önemli rol oynamaktadır. Bunların pro-inflamatuar ajanlar ( $TNF$  antagonisti) ve anti-inflamatuar sitokinler (IL- 10, adiponektin) ile inhibisyonu bu gibi hastalıkların tedavisinde yeni bir gelişim olabilir(17). Bu nedenle sitokinler üzerinde sadece inhibitör veya aktivatör etkinin tek başına fazla bir anlamı bulunmamakta, mümkün olduğu

kadar geniş bir bakış açısından değerlendirilme yapılması gerekmektedir Günümüzde anti-TNF ilaçların kullanımında klinik endikasyonlarını genişletmeye yönelik çalışmalar hızla devam etmektedir.

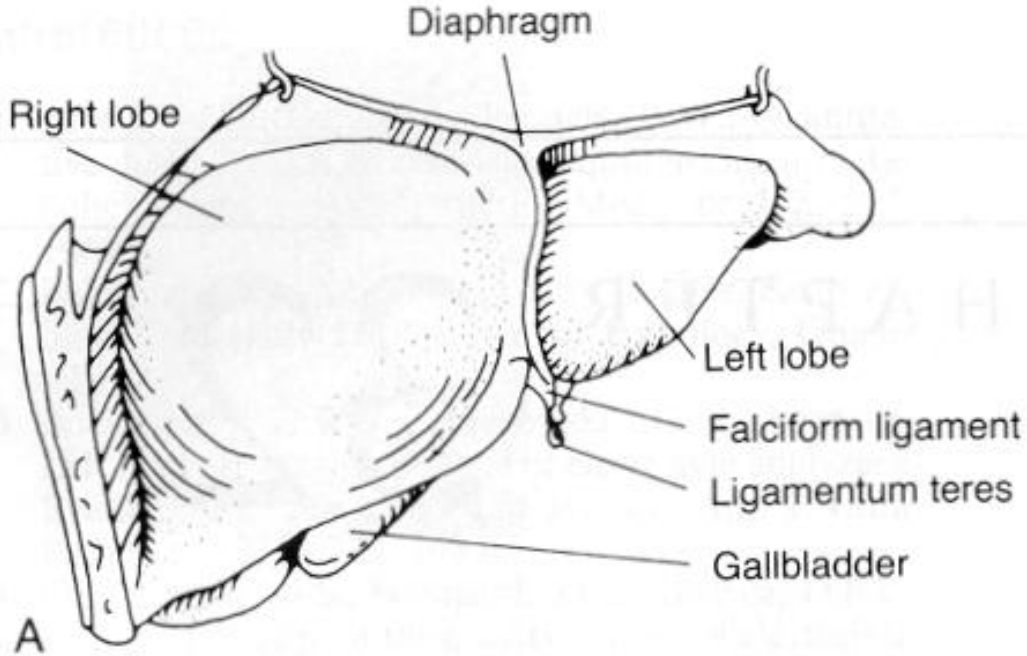
Çalışmamızda sıçanlar üzerinde oluşturduğumuz hepatik rezeksiyon modelinde Anti-TNF $_{\alpha}$  monoklonal antikoru olan infliximab'ın hepatik rejenerasyon süreci üzerine erken dönem etkilerini inceledik.

# GENEL BİLGİLER

## 1. KARACİĞER

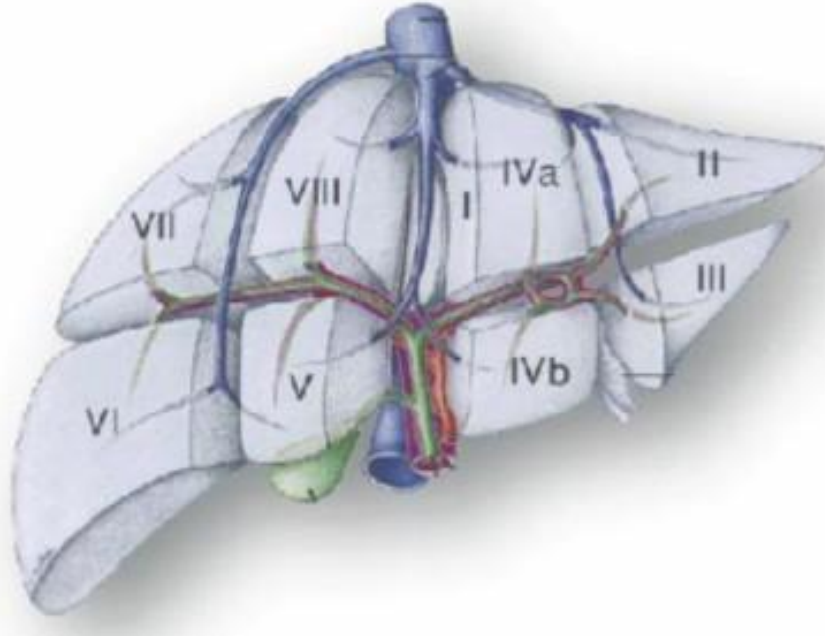
### 1.1. Karaciğerin Anatomisi

Karaciğer, sağ dördüncü ile altıncı interkostal aralıktan midklaviküler hat boyunca kostal arka kadar uzanır. İnférieurunda duodenum, transvers kolon, sağ böbrek, sağ sürrenal bez ile medialde ise özofagus ve mide ile komşudur. Karaciğer üst yüzeyi diafragma ile sınırlıdır. Karaciğer vücudun deriden sonra insanda en büyük organı olup 1400-1600 gram kadardır. Yeni doğanlarda vücuda oranla daha büyüktür. Karaciğeri örten Glisson kapsülü iki yaprağa ayrılarak diafragmaya yapışır, bu iki yaprak anterior ve posterior koronar ligamentler adını alır. Bu ligamentler sağda ve solda triangüler ligamentleri oluşturur ve önde birleşerek falsiform ligamenti meydana getirirler. En alt kısmında oblitere sol umbikal venin oluşturduğu ligamentum teres hepatis yer alır (Şekil- 1). Karaciğeri falsiform ligament, lig. teres hepatis ve koronar ligamentler ön karın duvarına ve diafragmaya bağlar. Hepatoduodenal ligament içinde koledok, hepatik arter ve vena porta bulunur. Lig. hepatogastricum da karaciğeri yerinde tutan ligamentlerden biridir(18).



Şekil- 1: Karaciğer anatomisi

Dorsal yüzde safra kesesi yer alır. Glisson kapsülü karaciğer parankimi içerisine doğru uzanan, içerisinde kan damarları ve safra duktusları içeren fibröz septalar verir. Karaciğer falsiform ligament ile anatomik olarak sağ ve sol lob olarak ikiye ayrılır. Sağ lob daha büyüktür. Kuadrat lob inferior yüzde solda umbilikal fissür, sağda safra kesesi yatağı ve arkada portal triadın çevrelediği dikdörtgen bölümdür. Kaudat lob ise solda falsiform ligamanın posterior uzantısı ile inferior vena kava'nın karaciğer üzerindeki impresyonu arasında yer alır(7). Cerrahi anatomi portal pediküllerin dağılımı ve bunların hepatik venlerle olan ilişkisi, safra yolları ve arteryel anatomi göz önüne alınarak karaciğer sekiz segmente ayrılmıştır(19) (Şekil- 2). Segmenter anatomi kalan segmentlerin biliyer ve vasküler devamlılığını sağlamada, segmenter veya birkaç segmentin birlikte çıkarıldığı rezeksiyonlarda önem kazanır.



**Şekil- 2:** Karaciğerin anatomik segmentasyonu (C. Couinaud, 1999).

Sağ lob V-VIII. segmentlerden, sol lob I-IV. segmentlerden oluşur. Lig. falciforme ve Lig. Teres IV. segmenti II. ve III. segmentlerden ayırır. Karaciğer rezeksiyonları anatomik ve non-anatomik olmak üzere ikiye ayrılır. Vasküler anatomiye esas alan rezeksiyon tipleri anatomik rezeksiyon olarak adlandırılır. Bu tip rezeksiyonlarda anatomik fissürlere uyulur, fonksiyonel ve anatomik olarak tanımlanmış karaciğer bölümleri çıkarılır. Anatomik rezeksiyonların amacı fonksiyonel bölünmelere uyarak daha kansız ameliyat yapmak, diğer bölümlerin



kanlanmasını bozmamaktır. Anatomik rezeksiyonlar sağ ve sol hepatektomiler, sektörektomiler, segmentektomiler ve subsegmentektomilerdir(20).

Karaciğer rezeksiyonu endikasyonları şunlardır(4);

I. Malign tümörler:

- a. Primer karaciğer tümörleri
- b. Metastatik karaciğer tümörleri
- c. Hepatobiliyer malignensiler (Safra kesesi tümörleri, kolanjio sellüler karsinom vb.)

II. Benign hastalıklar:

- a. Alveolar veya hidatik kist
- b. Adenom
- c. Hemanjiom
- d. Abse

III. Travma

IV. Transplantasyon

### 1.1.1. Vasküler anatomi

Normal hepatik kan akımı, erişkinde 1550 ml kadar olup %25–30'u hepatik arterle, %70-75'i vena porta ile gelir. Hepatik arter karaciğerin oksijen tüketiminin %50-55'ini sağlar. Portal vendeki oksijen saturasyonu normalde %85'tir. Total kan akımı kalp debisinin %25-30'unu oluşturur.

**Hepatik arter:** Arteria gastrica sinistra ve a. lienalis ile birlikte çöliak trunkustan çıkan a. hepatica propria, a. hepatica communis'in dalıdır ve omentum minus içerisinde, koledoğun solunda, vena portanın önünde seyrederek karaciğere girer(21). Hepatik arter öncelikle karaciğer pedikülü içinde sağ ve sol sonrasında da karaciğerin segmentlerine göre dallara ayrılarak interlobüler arterleri oluşturur. Hepatik arterin varyasyonu çoktur. Sağ hepatik arter %25 oranında superior mezenterik arterden çıkabilir ve portal venin sağ yanında seyreder. Sol hepatik arter %25 oranında sol gastrik arterden çıkabilir. Sol medial segment arteri %25 sıklıkta sağ hepatik arterden çıkabilir. Sağ hepatik arter safra yolunun önünde seyredebilir. A. Hepatica propria tümüyle superior mezenterik arterden çıkabilir(22-24).

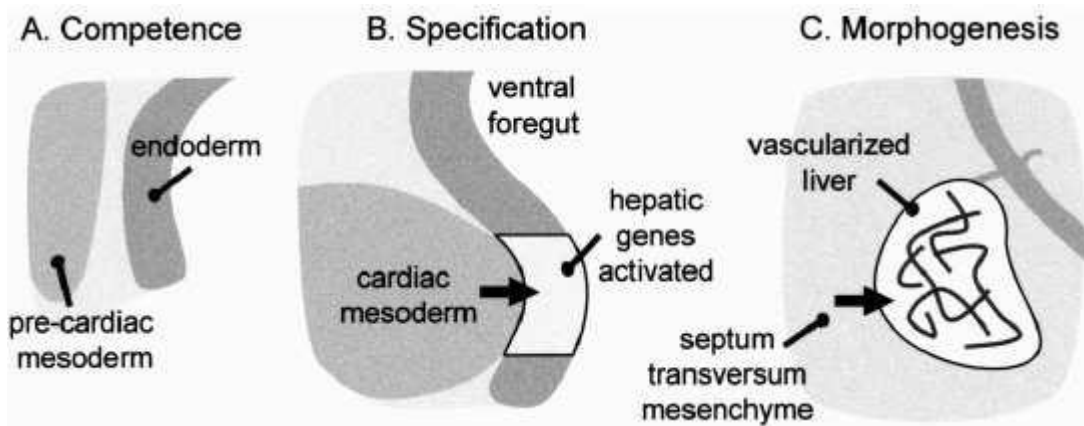
**Hepatik venler:** Karaciğerin venöz drenajı üç major hepatik venle sağlanır. Sol hepatik ven ikinci ve üçüncü segmentlerin kanını alır, orta hepatik venle birleşmek üzere yukarı yönde

parankim içinde oldukça yüzeysel bir şekilde seyrederek. Sağ lobun kanı ise sağ hepatik ven ile inferior vena kavaya boşalır. İnsanların %50'sinde üçüncü ve dördüncü segmentten kan alıp sol hepatik vene getiren ve “*umbilikal fissür veni*” adı verilen bir ven daha vardır. Bu ven orta hepatik venin bağlandığı fakat dördüncü segmentin rezeke edilmediği durumlarda bu segmentin drenajını sağlar. Orta hepatik ven genellikle sol hepatik venle birleşip tek trunkus halinde inferior vena kavaya açılır. Ayrıca %25 oranında sağ karaciğerden doğrudan inferior vena kavaya ulaşan hepatik venler vardır. İzole segment rezeksiyonlarında bu hepatik venlerin varlığı rezeksiyonu kolaylaştırır(23, 25).

**Portal ven:** Splenik ven ve superior mezenterik ven pankreas boynu hizasında birleşirler. Inferior mezenterik ven bu venlere katılır ve portal ven oluşur. İçerisinde valv sisteminin olmadığı portal venin uzunluğu ortalama yedi cm, çapı 1,2 cm'dir. Portal ven; mide, ince ve kalın barsaklar, pankreas ve dalaktan gelen venöz kanı karaciğere taşır. Hepatoduodenal ligamentin içinde, duodenum birinci kısmının arkasından geçer, porta hepatis'e ulaşır ve orada sağ ve sol olmak üzere iki dala ayrılır. Portal ven, karaciğer hilusuna gelmeden sol gastrik veni (koronar ven) ve bazı küçük dalları alır. Sol portal ven dalı sağa göre daha uzun ve yataydır. Portal ven dalları karaciğer içinde segmentlere göre dağılım gösterir(21, 26, 27).

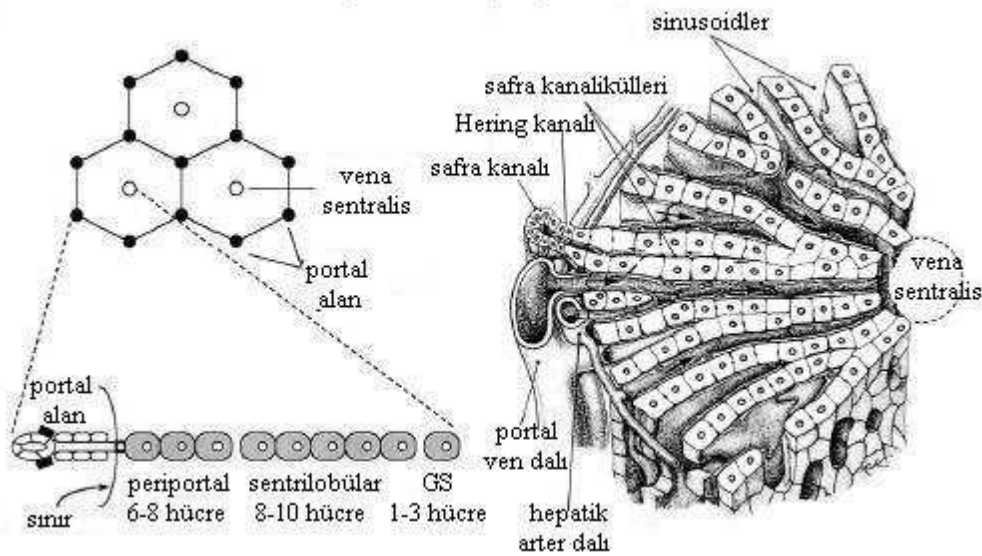
## 1.2. Karaciğer Embriyolojisi ve Fonksiyonel Histolojisi

Karaciğer, ön barsağın (foregut) endoderminden ve septum transversumun mezoderminden köken alır. Dört haftalık embriyoda ön barsağın, daha sonra duodenumun gelişeceği ventral bölgesinden bir divertikül meydana gelir. Divertikülün kaudal bölümü duktus sistikus ve safra kesesi şeklinde gelişir. Kranial bölümden ise karaciğer meydana gelir (28) (Şekil- 3).



Şekil- 3 : Karaciğerin embriyolojik gelişimi (Zaret, 2000).

Hepatik parankim üç ana hücre grubundan oluşmuştur. Bunlar hepatositler, biliyer epitel hücreleri, kupffer hücreleridir(29). Karaciğer 50.000-100.000 arasında değişen anatomik ünitelerden oluşur. Her lobül merkezindeki venin (santral ven) etrafında silindirik olarak sıralanmış hepatositlerden oluşur. Lobülün çevresinde dört ile beş portal yol yer almaktadır. Portal yollarda hepatic arteriyoller, portal venüller, safra kanalcıkları, lenfatikler ve sinirler vardır (Şekil- 4). Sinüzoidlerin endotel tabakası ile hepatositler arasındaki disse aralığı denilen kısımda karaciğer lenfi oluşur. Yağ depolayıcı hücreler (İto hücreleri) disse aralığına yerleşmiş yıldız hücrelerdir. Endotel tabakası hücreleri arasında aktif fagositoz görevi olan kupffer hücreleri bulunur.



Şekil- 4: Karaciğerin histolojik yapısı (Fausto and Campbell, 2003).

### 1.3. Karaciğerin Fonksiyonları

Karaciğerin temel fonksiyonları; barsaklardan dönen kanın depolanması ve filtrasyonu (vasküler fonksiyon), vücudun metabolik sisteminin büyük kısmının koordinasyonu ve regülasyonu (metabolik fonksiyon), safranın yapılıp safra kanallarıyla gastrointestinal sisteme ulaştırılması (sekretuar ve ekskretuar fonksiyon) olarak özetlenebilir(8).

**Karbonhidrat metabolizması:** Karaciğer karbonhidrat metabolizmasında glikojen depolama, galaktoz ve früktozu glikoza çevirme, glikoneogenez ve karbonhidrat metabolizmasının ara ürünlerinden birçok önemli kimyasal maddenin oluşturulması gibi birçok önemli fonksiyonları yürütür(30, 31, 32).

**Protein metabolizması:** Karaciğer hücresi, kendisi için gerekli proteinlerin sentezine ek olarak, çeşitli plazma proteinlerini de sentezler. Karaciğerin protein metabolizmasındaki görevleri; aminoasitlerin deaminasyonu, plazma proteinlerinin sentezi, vücut sıvılarından amonyağın temizlenerek üre oluşumu ve değişik aminoasitlerin sentez ve birbirine dönüşümüdür(30).

**Lipid metabolizması:** Karaciğer yağ asitleri ile nötral yağları hem sentez hem de katabolize eden bir organdır. Kolesterol sentezi ve esterleştirilmesi esas olarak karaciğerde oluşur. Karaciğerin lipid metabolizmasındaki temel fonksiyonları şöyle sıralanabilir: yağ asitlerinin büyük bir hızla beta oksidasyonu ve asetoasetik asit oluşumu, başta şilomikronlar olmak üzere LDL, HDL ve VLDL gibi lipoproteinlerin yapımı, büyük miktarlarda kolesterol ve fosfolipid sentezi ve karbonhidrat ve proteinlerin yağlara dönüştürülmesidir(30).

**Detoksifikasyon fonksiyonu:** Karaciğer vücutta salgılanan birçok hormonun ve başta kalsiyum olmak üzere elektrolitlerin yıkım ve atılım yeridir(30). Karaciğer bu detoksifikasyon fonksiyonunu, oksidasyon, metilasyon, asetilasyon, esterifikasyon ve konjugasyon gibi işlemlerle yapar(21).

**Demir metabolizması:** Hemoglobindeki hem molekülündeki demir hariç geriye kalan demirin büyük kısmı karaciğerde ferritin olarak depolanır. Karaciğer hücrelerinde bulunan apoferritin tampon fonksiyonunu yürütür(21).

**İmmünolojik fonksiyon:** Karaciğer, retiküloendotelial sistemdeki kupffer hücreleri aracılığı ile bakterilerin, boya maddelerinin ve diğer artıkların fagositoz yoluyla kandan temizlendikleri büyük bir filtre görevi görür. Karaciğerdeki kupffer hücreleri, RES hücrelerinin % 60'ını oluşturur(21, 29).

**Vitamin metabolizması:** A, D, E, K ve B<sub>12</sub> vitaminlerinin ana deposu karaciğerdir(21).

**Hematolojik fonksiyonlar:** Kan pıhtılaşmasında rol oynayan proteinlerin çoğu öncelikle karaciğerde sentez edilir. Bu arada fibrinojen, protrombin ve V, VII, VIII, IX, X, XI ve XII. faktörlerin sentezi karaciğerde yapılır. Protrombin ile VII, IX ve X'uncu faktörlerin yapımı için K vitamini gereklidir. Karaciğer kandaki plazminojen aktivatörlerini uzaklaştırarak kontrolsüz fibrinolizis olayına da engel olur. Embriyolojik yaşamda hematopoetik sistemin temel hücreleri olan miyelositlerin, megakaryositlerin, eritrosit ve eritroblastların üretim yeri karaciğerdir. Normal şartlarda doğumdan sonra duran bu fonksiyon, kemik iliğinin görevini yapamadığı durumlarda tekrar aktif hale gelir(21, 30).

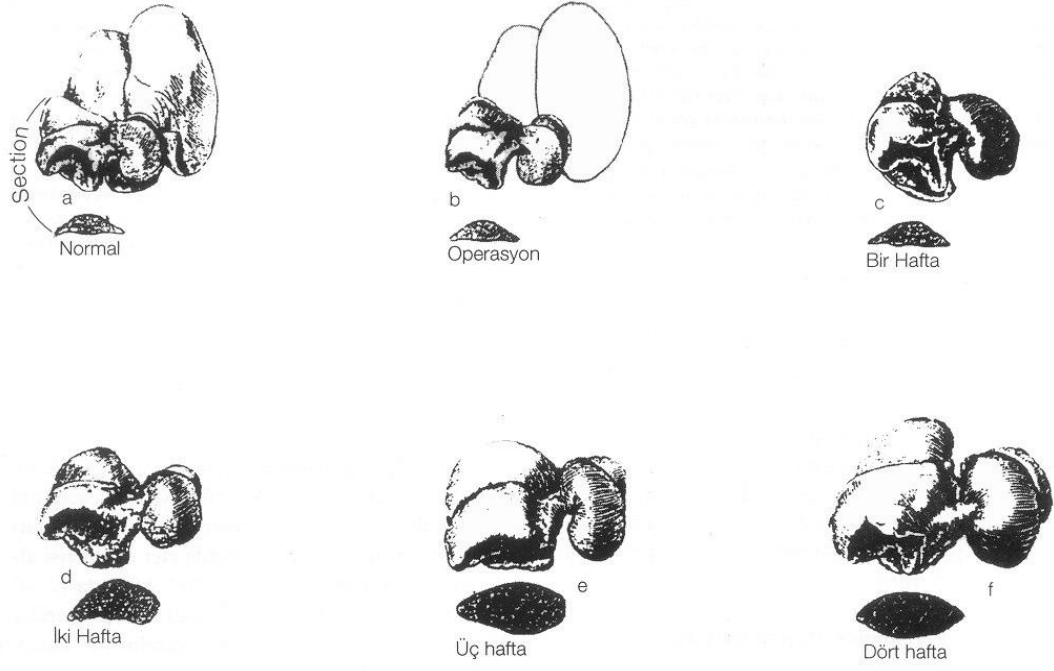
**Safra üretimi ve salınımı:** Safra, başta konjuge bilirubin olmak üzere safra pigmenti, safra asitlerinin bağlı tuzları, fosfolipitler (temel olarak lesitin), kolesterol, az miktarda protein (özellikle albümin), inorganik elektrolitler, su ve birçok metabolitin karışımından meydana gelen karmaşık bir çözeltidir. Osmolalitesi 300 mOsm/kg'dır. Günde 500-1500 ml kadar safra salgılanır. Karaciğer safra asitlerini kolesterolden sentez eder ve safra kolesterolün vücuttan atıldığı başlıca yoldur. Safranın hemen tamamı, başlıca distal ileumda olmak üzere, ince barsaklarda geri emilir ve günde altı ila on kez olmak üzere enterohepatik dolaşıma girer(21).

#### **1.4. Karaciğer Rejenerasyonu**

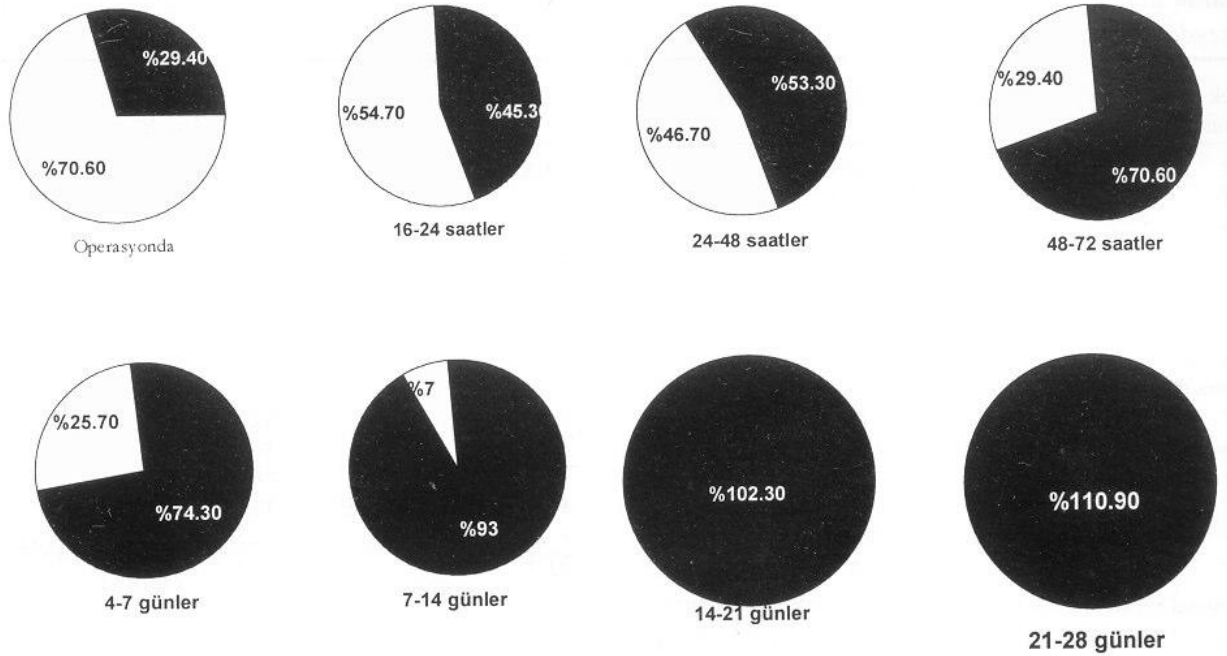
Karaciğer yüksek rejenerasyon kapasitesi ve komplike fonksiyonlarının varlığı ile farklı özellikleri olan bir organdır. Karaciğerin rejenerasyon yeteneği, rezeksiyon veya zedelenme sonrası karaciğer kitlesini korumaya yönelik eşsiz bir reaksiyondur. Rejenerasyon süreci bir takım sitokin ve büyüme faktörlerinin tetiklediği sinyallerle gerçekleşir. Rejenerasyon doku kaybı ya da harabiyetine karşı gelişen tamamlayıcı hipertrofik ve/veya hiperplazik bir yanıttır. Karaciğer dokusunun herhangi bir nedenle kaybı sonrasında öncesindeki karaciğer kütle ve fonksiyonlarının yeniden kazanılması süreci karaciğer rejenerasyonudur(3, 9, 33, 34, 35). 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(36). Bilimsel çalışmalar 1900'lü yıllarda Amerikalı Higgins ve Anderson adlı bilim adamları tarafından sıçanlarda eter anestezisi altında subtotal lobektomiyle (%70-80) orta ve sol lobu çıkartmışlardır. %75'lik karaciğer ağırlığının kaybının bir ayda giderildiğini gözlemişlerdir(37-40). Sıçanlardaki deneysel rezeksiyon modelinde rejenerasyon cevabı karaciğerin 2/3'ü rezeke edildiğinde maksimumdur(37). Daha küçük miktarda parankim çıkarıldığı zaman restorasyon daha yavaş ilerler. 2/3'ü aşan rezeksiyonlarda DNA sentezi ve mitotik aktivite de bozulma olur, sıçanlarda subtotal(% 90) hepatektomi rejenerasyon olmaksızın ölüme yol açar(41,42). Segmental veya lobar rezeksiyonlar ise insanlarda tümör cerrahisi yada canlı donörlerden transplantasyon amacıyla sıklıkla uygulanmaktadır(43). 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 ulaştığında durur. Normal bir karaciğerin herhangi bir zamanda yapılan kesitlerinde hepatosit popülasyonunun çok seyrek mitoz göstermesi bu durgunluğun bir ifadesidir(44).

Karaciğer en geniş hücre proliferasyon özelliğine sahip organdır. Hepatositlerin sadece %0.0012-%0.01'i hayatın herhangi bir döneminde mitozu uğramaktadır(45-47). Sağlıklı karaciğerdeki bu düşük turnover toksik karaciğer hasarı veya cerrahi rezeksiyon durumunda %3 veya daha yüksektir(38, 39). Karaciğerin 2/3'nin kaybından sonra iki hafta içinde fonksiyonel karaciğer iyileşmesi tamamlanmaktadır. Rejenerasyon cevabı tipik olarak kalan karaciğer dokusunun asiner yapısının proliferasyonuna bağlıdır. Rezeksiyon vakalarında bu sonuç, rezeke edilen lobun restorasyonundan ziyade kalan karaciğer dokusunun hipertrofinine bağlıdır(37). Karaciğer rezeksiyonu veya parsiyel hepatektomi karaciğer kütesini 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(6). Parsiyel hepatektomi sonrası geride kalan hepatik segmentler artan portal kan akımı ve basıncının etkisi altında kalmasına rağmen, parsiyel hepatektominin halen hücrel 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 dört, beş haftada tamamlanır (Şekil- 5 ve 6). Eksize edilen loblar aynen eski şekillerini almazlar. Rejenerasyon daha çok yeni lobüller oluşması ve artık lobüllerin genişlemesi şeklinde olur(38). Rezidü hepatositlerde DNA sentezi sıçanlarda ilk 24 saat içerisinde pik yapar ve dokudaki mitotik aktivite artar. Hepatik rejenerasyon için gerekli uyarılar, pankreas diğer ekstrahepatik organlar ve rejenerasyon olan karaciğerin bizzat kendisinden kaynaklanan humoral faktörlerdir(7).



**Şekil- 5:** Normal sıçan karaciğerinin çıkarımı ve haftalar süresince gerçekleşen rejenerasyonu (Higgins; 1931, Bucher; 1995).

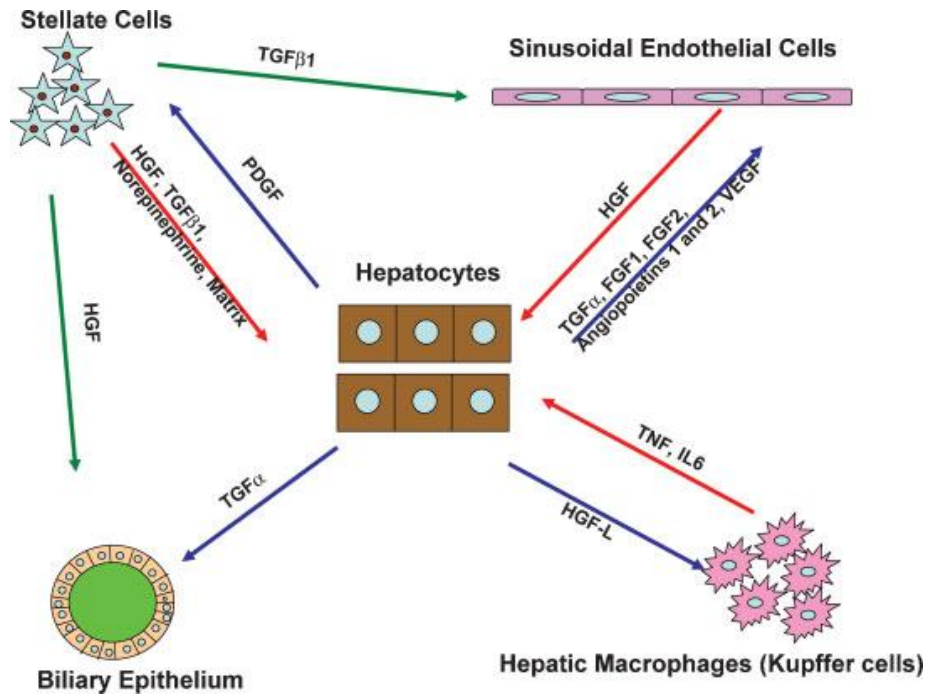


**Şekil- 6:** Rejenerasyon süresince çıkarılan karaciğer yüzdesi ile rejenere olan karaciğer dokusunun toplam ağırlığı arasındaki ilişki (Higgins; 1931, Bucher; 1995).

Günümüzde bilgisayarlı tomografi, anjiyografi, sintigrafi gibi yöntemlerle yapılan çalışmalarda, karaciğerin rezeksiyon sonrası erişkinlerde üç ile altı ayda, çocuklarda üç aydan daha kısa sürede eski boyutuna ulaştığı gösterilmiştir. Siroz varlığında bu süre 9–15 aya kadar çıkmaktadır(8, 48).

#### 1.4.1. Parsiyel Hepatektomi Sonrası Hücre Replikasyonu

Karaciğer kütlesinin %80'ini, hücre sayısı olarak %60'ını oluşturan hepatositler hücre siklusuna en hızlı başlayan hücrelerdir. Bu hücrelerdeki değişiklikler dakikalar içinde meydana gelmektedir(49, 50). Hepatositler diğer hücre tipleri için mitojenik ajanlar üretirler (Şekil- 7).

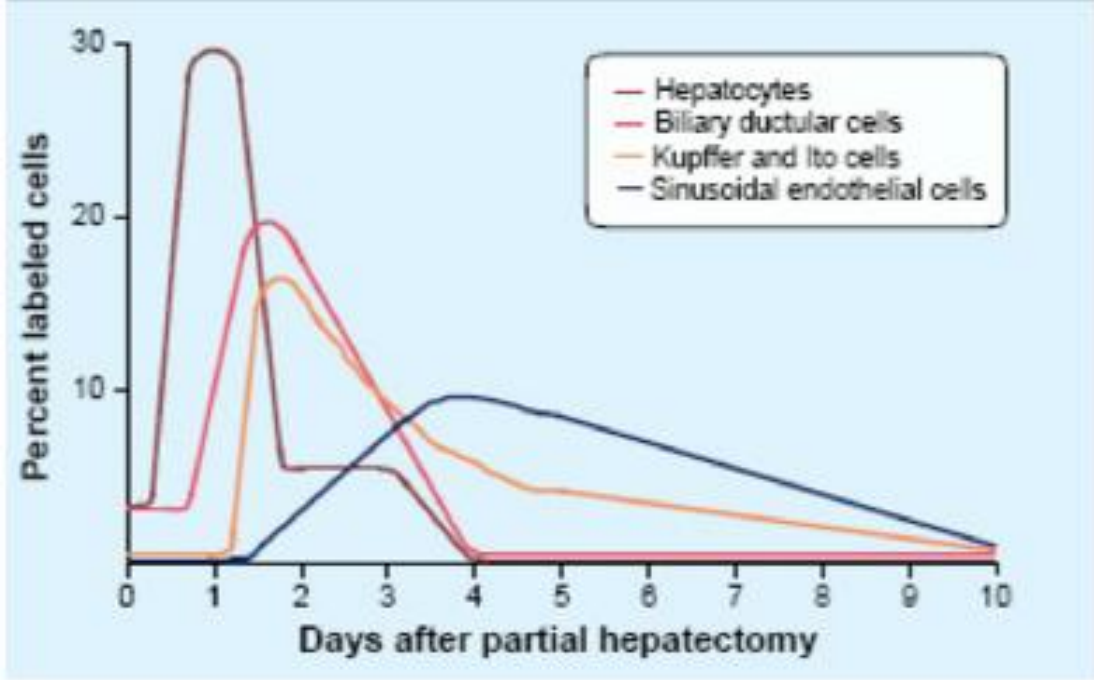


**Şekil- 7:** Karaciğer rejenerasyonunda gerçekleşen hücresel etkileşim (George K.Michalopoulos–2007).

PH modelindeki rejenerasyon sürecinde teorik olarak hücrelerin 1.66 proliferasyon yapması gereklidir. Rejenerasyon esnasında hepatositlerin büyük çoğunluğu 1 veya 2 sefer proliferate olmaktadır. Karaciğerde bulunan tüm hücreler bölünerek rejenerasyon sürecine katılmaktadırlar. Hepatositlerdeki en üst DNA sentezi 24. saatte görülmektedir. Hepatositleri



sırasıyla duktus epitel hücreleri, kupffer hücreleri, stellate hücreler ve sinüzoidal endotel hücreleri izlemektedir(51, 52) (Şekil- 8).



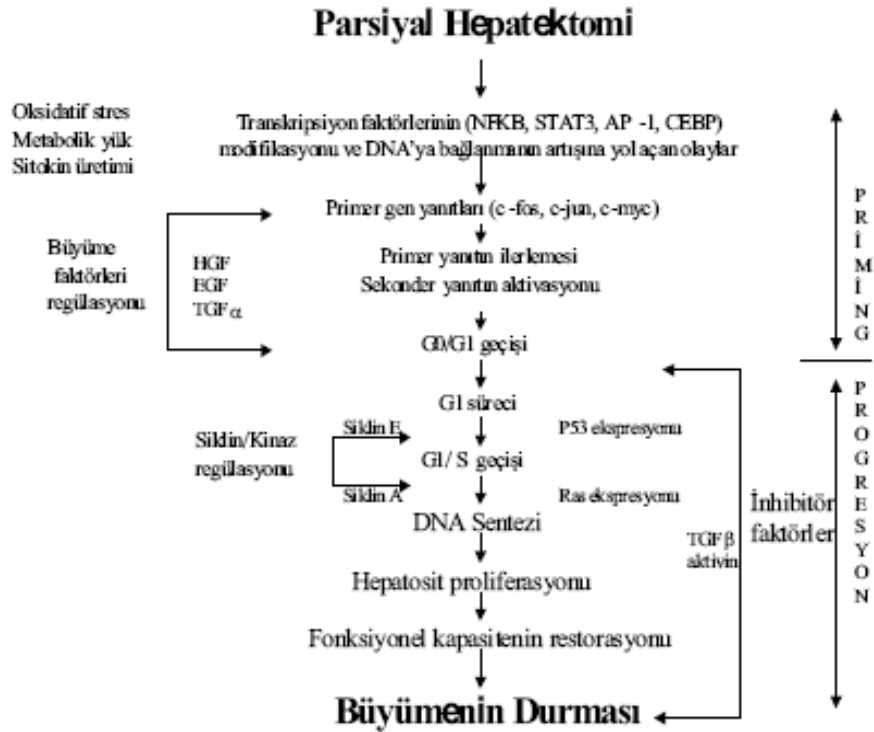
Şekil- 8: Karaciğer rejenerasyon süreci (Michalopoulos and DeFrances, 1997)

Hepatosit proliferasyonu lobulün periportal alanından perisantral alanına doğru mitoz dalgası şeklinde yayılır(53). Santral ven çevresindeki glutamin sentetaz enzimi içeren hepatositler hücre replikasyonuna en son katılan hücrelerdir.

#### 1.4.2. Parsiyel Hepatektomi Sonrası Transkripsiyon Faktör Aktivasyonu

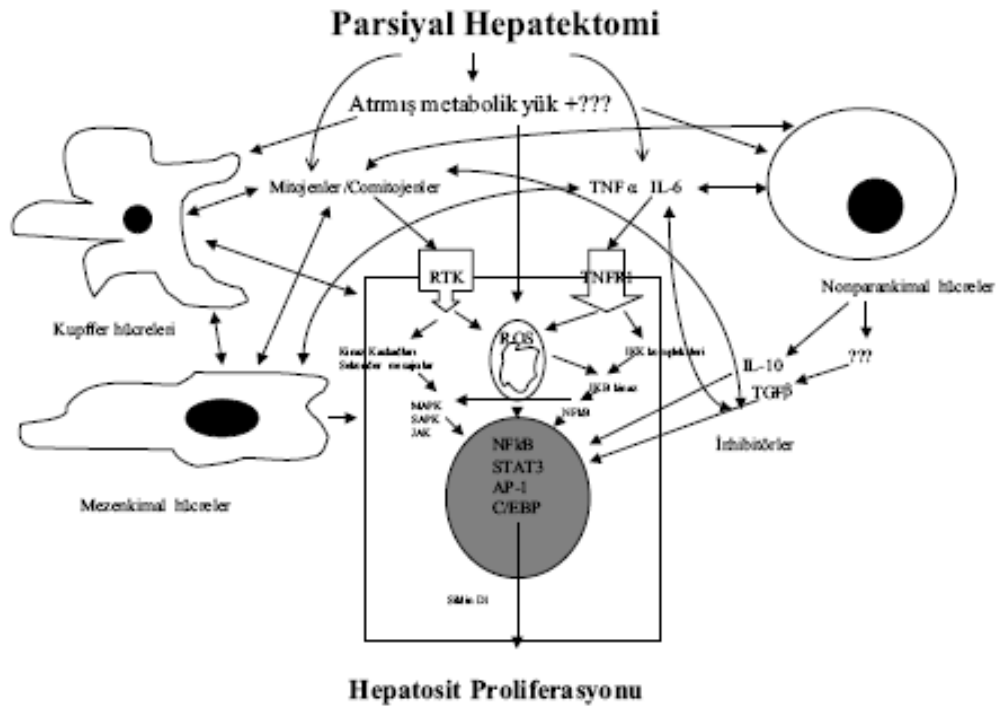
Normal şartlar altında hepatositler hücre döngüsünün  $G_0$  fazındadırlar. Herhangi bir nedenden ötürü karaciğer dokusunun kaybı  $G_0$  fazındaki hücrelerin döngüye girerek bölünmesine yol açan olayları başlatır. DNA sentezi için gereken proteinlerin yapım dönemi pre-replikatif  $G_1$  fazında tamamlanır. Daha sonra hücre DNA replikasyonunu gerçekleştirir (S fazı). Bu fazı BrdU, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ve Ki-67 gibi artan S fazı proteinlerinin ekspresyonlarını göstererek tanımlamak mümkündür(54, 55). Replikasyon sonrası hücre bölünmesi için gereken moleküllerin sentezi  $G_2$  fazında tamamlanır. Daha sonra mitoz gerçekleşerek yeni hücreler ortaya çıkar(56). PH sonrası hücrelerin  $G_0$  fazından  $G_1$

fazına geçmesine sebep olan olaylar "priming" daha sonra hücre döngüsünün tamamlanması ise "progresyon" olarak adlandırılmaktadır. "Priming" ve "progresyon" fazlarındaki olaylar ve birbirleriyle olan ilişkileri, transkripsiyon faktörleri, gen yanıtları, büyüme faktörleri, sitokin etkileri, kinaz kaskadları sadeleştirilmiş haliyle Şekil- 9 ve Şekil- 10'da gösterilmiştir. Nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B), sinyal transdüsörü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT<sub>3</sub>), aktivatör protein- 1 (AP-1) ve CCAAT/enhancer-bağlayıcı proteinler (C/EBP) transkripsiyon faktörleridir. Bu transkripsiyon faktörleri inflamasyon, hücre adezyonu, proliferasyon ve apoptozda (rejenerasyon sırasında meydana gelen olaylar) rol alan 70'den fazla genin aktivasyonuna yol açmaktadır(56). Bu transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu için PH sonrasında artan metabolik yük ve henüz ayrıntıları tam olarak bilinmeyen yollarla karaciğerde dakikalar içinde tespit edilebilen değişiklikler ortaya çıkmaktadır(49, 50). Bu olaylar sonuçta reaktif oksijenlerin üretimi, proinflamatuvar sitokinler, tümör nekrozis faktör alfa (TNF $_{\alpha}$ ) ve interlökin 6'nın (IL- 6) artışı, mitojen, co-mitojen ve inhibitörlerin artışına ve birbirleriyle karmaşık ilişkilerinin devamına yol açmaktadır. Bu süreçteki karmaşık ilişki yumağının herhangi bir adımının etkilenmesi potansiyel olarak karaciğer rejenerasyon sürecini etkileyebilir.



**Şekil- 9:** Karaciğer rejenerasyon sürecinde priming ve progresyon fazları (Güncel Gastroenteroloji dergisi, Aralık- 2004)

Karaciğer rejenerasyon uyarısı gelmeden önce hepatositlerin hemen hemen hepsi  $G_0$  fazında bulunurlar(58-60). Hücre döngüsünün, uyarının gelmesinden sonra ilerleme fazından çok, başlama fazının büyüme faktörlerine gereksinimi vardır(61). Transkripsiyon faktörü olan Nuclear Factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B), STAT<sub>3</sub>, Nuclear adaptör protein complex-1 (AP-1) ve sitokin düzenleyici olabileceği düşünülen enhancer binding protein (C/EBP) karaciğer rejenerasyonunun başlamasında önemli rol oynarlar(60-62). Bu moleküller başlangıçta TNF $_{\alpha}$  tarafından uyarılırlar(63, 64). Bu nedenle deneysel olarak TNF $_{\alpha}$  ve bu sitokinin uyardığı IL-6 miktarının biyokimyasal yöntemler ile belirlenmesi, parsiyal hepatektomi sonrasında rejenerasyon durumu ile ilgili bilgi verir(64, 65).



**Şekil- 10:** Transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna ve DNA sentezinin başlamasına yol açan olaylar (Güncel Gastroenteroloji dergisi, Aralık- 2004)

Parsiyal hepatektomi ya da kimyasal maddeler ile oluşturulan karaciğer hasarından sonra kupffer ve endotel hücreleri tarafından TNF $_{\alpha}$  ve IL- 6 üretimi başlatılır. IL- 6 üretimi TNF $_{\alpha}$  tarafından uyarılmaktadır. IL- 6 ve özellikle TNF $_{\alpha}$  ile birlikte karaciğerden (HGF) ve çevre organlardan gelen büyüme faktörlerinin (pankreas > HGF; duodenum > EGF; adrenal bez > norepinefrin) etkisiyle SOR üretimi sağlanır(3). Birçok hücre tipinde bulunduğu gibi hepatositlerde de bulunan ve p65- p50 protein alt ünitelerinden oluşmuş NF- $\kappa$ B molekülü normalde inaktiftir. Bu durum molekülün p65 ünitesine bağlı I $\kappa$ B inhibitöründen

kaynaklanmaktadır. SOR aracılığıyla IKK enzim kompleksi tetiklenerek İB molekülünü katalizlemesi ve NF-κB'den kopması sağlanır. Böylece, hepatosit sitoplazmasında fosforilasyondan sonra aktivite kazanan NF-κB hücre çekirdeğine göç eder. Molekülün çekirdeğe geçişi engellendiğinde karaciğerde apoptozis başlar(3). Parsiyal hepatektomiden sonra öncelikle transkripsiyon faktörlerinden NF-κB, AP-1, C/EBP ve bunların hemen arkasından da STAT<sub>3</sub>'ün DNA'ya bağlanmalarında artış olur. NF-κB operasyondan 10–15 dakika sonra ölçülebilir ve bir, iki saat içinde de normal seviyeye düşer. STAT<sub>3</sub> ise operasyondan sonraki bir, iki saat içinde belirlenebilir ve aktivasyonunu dört, altı saat kadar sürdürebilir(3, 61).

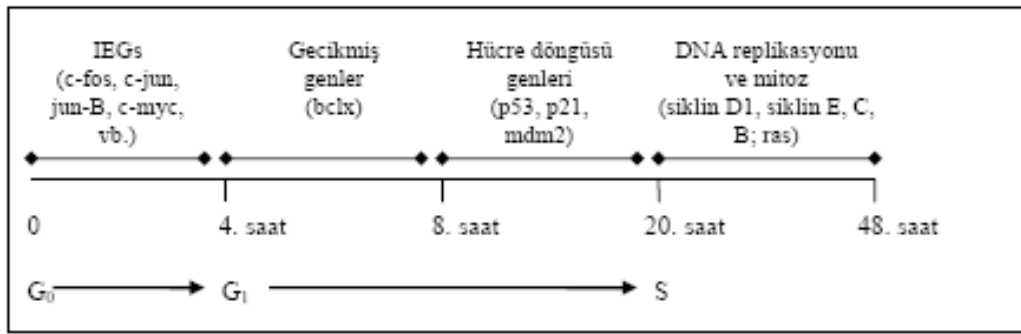
### **1.4.3. Karaciğer Rejenerasyonunda Moleküler Mekanizma**

IL-6 sitokini ve diğer büyüme faktörleri varlığında sitoplazmada aktivite kazanmış STAT<sub>3</sub>, NF-κB gibi hücre çekirdeğine göç eder. DNA molekülüne bağlanmasından sonra hepatosit proliferasyonunda gerçekleşen iki aşamalı gen ekspresyonunun ilk fazı “*The immediate early genes (IEGs)*” olarak bilinen c-myc, jun-B, c-jun, c-fos gibi protoonkogenlerin ekspresyonu başlatılır(3, 66, 67). IEGs lösün ailesinin üyelerinden proteinleri kodlar ve bunlar hücre onarımıyla ilişkilidir. Bu genlerin aktive olduğu dönem “*acil erken faz*” olarak adlandırılır(68). Transkripsiyon faktörleri, tirozin fosfataz ve hücre zar proteinleri IEGs tarafından meydana getirilir(3). “*Delayed early genes*” gecikmiş erken genler olarak da ifade edilen ve apoptozise engel olan Bcl-XL geninin örnek gösterildiği gen ekspresyonunun ikinci fazıdır. Ayrıca, Bcl-XL geni hepatosit proliferasyonu sırasında mitokondrilerde meydana gelmiş olan SOR'ne karşı antioksidan özellik gösterir(3, 59). Deney hayvanına TNF<sub>α</sub>'nın enjekte edilmesi, AP-1'in bağlanmasını artırıcı yönde bir özellik kazandırır. AP-1'in bağlanması ise parsiyal hepatektomiden çok kısa bir süre sonra c-jun ve c-jun nükleer kinazın aktivitesiyle paralel değerlendirilmektedir.

Transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ve primer genlerin ekspresyonu sonucunda hepatositler, hücre döngüsünün G<sub>1</sub> fazına doğru itilirler. Bu olay parsiyal hepatektomiden sonraki dördüncü saate isabet eder(3). Hücre döngüsünde görev alan p53, p21, mdm genleri ile siklinler ve siklin bağımlı kinazlar olarak bilinen hücre içi enzimler parsiyal hepatektomi uyarısıyla aktivite kazanırlar. Siklin D1'in kinaz ile oluşturduğu kompleks, hücre döngüsündeki bazı faktörleri fosforilleyerek, rejenerasyonun 20. saatinde, döngünün G<sub>1</sub> fazından S fazına geçmesini ve replikasyonun gerçekleşmesini sağlar(3, 58). Bu

süreçte siklin D, E, C ve B'nin ekspresyonlarına da gereksinim duyulur ve sonuç olarak DNA molekülü replikasyona uğrar(3, 61) (Tablo-I).

Hepatosit hücre döngüsünde, siklin D1'den siklin E'ye geçiş önemli bir sınır noktadır. İn vivo ve in vitro koşullarda, bu iki siklini eksprese edebilen adenovirus vektörleri, hepatosit DNA replikasyonunu uyarabilir ve bu aşamadan itibaren, büyüme faktörleri olmaksızın replikasyon ilerleyebilir(62). Siklin bağımlı kinazlar ve bunların yapılarına katılarak aktivasyonlarını yönlendiren siklin proteinleri sadece hepatosit hücre döngüsünde değil aynı biçimde tüm ökaryotik hücrelerin döngülerinde de düzenleyici rol oynar(69).



**Tablo - I:** Parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunda gen aktivitesi zinciri (Fausto N, 2000).

DNA molekülündeki ve gen ekspresyonlarındaki artışın tespit edilmesi, rejenerasyon sürecinin yönü ve ilerleyişinin yorumlanması açısından önemlidir. Parsiyel hepatektomi sonrası erken dönem karaciğer rejenerasyonunda gelişen olayların kronolojik sıralaması (Tablo- II).

**Tablo - II:** Rejenerasyon sürecindeki kronolojik sıralama (George K.Michalopoulos–2007).

Multiple signaling pathways involving both growth factors, cytokines, paracrine signals, and neuroendocrine factors occur simultaneously within the first 60 min after PHx. These include:

- Increase in urokinase activity (first 5 min)
- Translocation of N(otch) ICD to the nucleus (15 min)
- Translocation of beta-catenin to the nucleus (5–10 min to 6 h)
- Decrease in HGF biomatrix stores (30 min to 3 h)
- Activation of the HGF receptor (within 30–60 min)
- Activation of the EGF receptor (within 30–60 min)
- Increase of HGF, Norepinephrine, IL6, TNFa, TGFb I and hyaluronic acid in the plasma (1–2 h)
- Activation of API, NFkB, and STAT3 (30–60 min)
- Extensive gene expression reprogramming of hepatocytes within 30 min after PHx

Sitokinler ve büyüme faktörleri hepatik rejenerasyon ile ilişkili olan biyolojik maddeler olup, hepatik rejenerasyonu uyarıp tetikleyenler ve durduranlar olarak gruplandırılırlar (Tablo-III) (59).

**Tablo - III:** Hepatik rejenerasyon sırasında büyümeyi etkileyen faktörler (Micholopoulos GK, 1997).

<u>Mitojenler</u>	<u>Yardımcı mitojenler</u>
Hepatosit growth faktör	İnsülin
Transforming growth faktör- $\alpha$	Glukagon
Epidermal growth faktör	Anjiotensin
İnsülin-like growth faktör	Norepinefrin
TNF	Vazopressin
Asidik fibroblast growth faktör	Parathormon
	Tiroid hormonları
	Adrenal kortikal hormonlar

#### İnhibitör faktörler

Transforming growth faktör- $\beta$

IL-1

Aktivin

İnhibin

Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6), Hepatocyte Growth Factor (HGF) ve Transforming Growth Factor-N (TGF-N)'nin hepatik rejenerasyonu tetiklerken, Interleukin-1 (IL-1), Transforming Growth Factor-  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ve aktivin ise başlamış olan rejenerasyonu bloke ederler(59, 61, 65, 70). Bunların yanında dolaylı olarak insülin, nörepinefrin, gastrin, prostoglandin E<sub>2</sub>, kalsiyum ve D vitamini gibi komitojen maddelerin de temel mitojenler varlığında karaciğer rejenerasyonu üzerine önemli etkileri vardır(9, 59, 70). Hepatositlerin in vitro olarak HGF, Epidermal Growth Factor (EGF) ve TGF-N büyüme faktörlerine tam cevap verebilmesi için ortamda ilk olarak TNF $\alpha$  ve IL-6 sitokinleri ile sitotoksitite engelleyici diğer ajanlara gerek vardır(3).

#### 1.4.4. Karaciğer Rejenerasyonunu Aktive Eden Faktörler

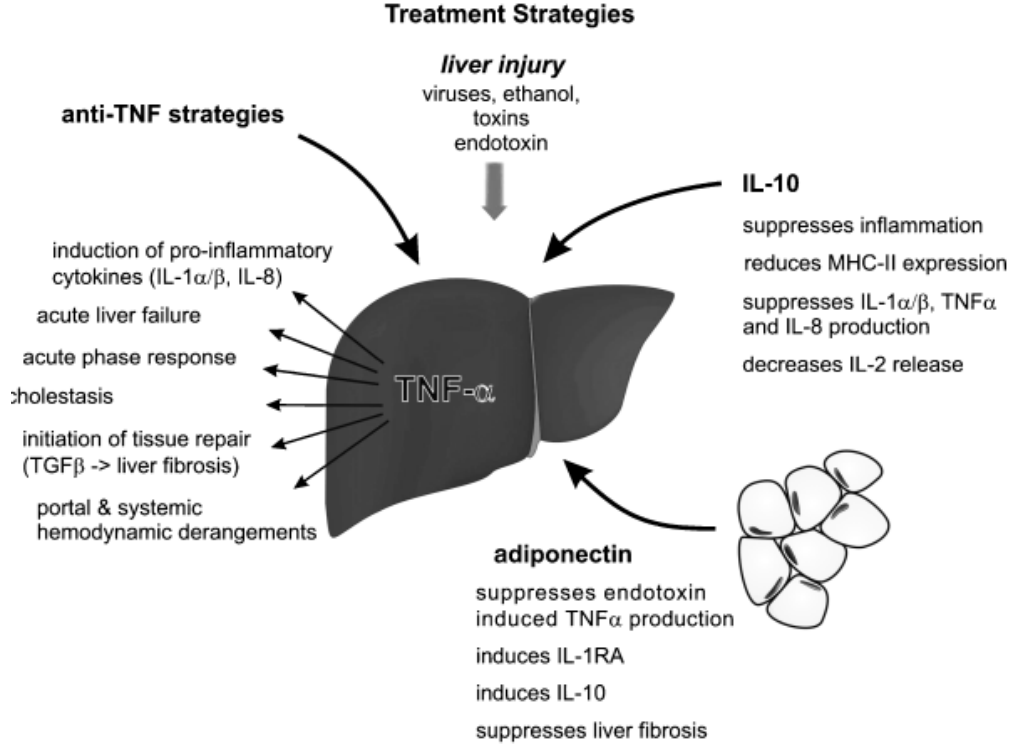
**Hepatosit büyüme faktörü (HGF):** HGF karaciğer rejenerasyonunun kontrol ve düzenlenmesinde yüksek düzeyde mitojenik etki ile önemli rol oynar(71). En çok karaciğer ito ve kupffer hücrelerinde olmak üzere akciğer, dalak, plasenta, beyin gibi birçok dokuda ve plazmada bulunan protein yapısında bir büyüme faktörüdür(72). Ayrıca sistemik olarak enjekte edilen HGF'nin karaciğer tarafından diğer organlara göre daha fazla tutulduğu görülmüş(73). Bu molekül hem in vitro hem de in vivo şartlarda büyüme faktörü olma özelliğini devam ettirir(74). Rekombinant HGF, primer kültürde sıçan ve insan hepatositleri için potansiyel bir mitojendir. HGF, parsiyal hepatektomi yapılan, kimyasal hasarlı ve akut hepatitli sıçanlarda daha fazla hasarın oluşmasına engel olmak için karaciğer rejenerasyonunu uyarır(75). %30 parsiyal hepatektomi yapılmış hayvanlarda, karaciğere infüzyon ile çok az miktarlarda HGF ve  $TGF_{\alpha}$  verildiğinde DNA sentezinde büyük artışlar olmaktadır. Fakat aynı uygulama hiç hasara uğratılmamış karaciğerde bu sonuca neden olmaz(61, 62). Hepatektomiyi takiben beş dakika içinde ürokinaz aktive olur ve plazminojenin plazmine dönüşümünde rol alır. Plazmin matriks yıkıcı metalloproteinazları uyarır. Matriks yıkımı sonucu HGF salgılanır(9). Ratlarda hepatektomi sonrası bir saat içinde plazma HGF konsantrasyonu 20 katına çıkar(76). İnsanlarda karaciğer rezeksiyonunu takiben 1. ve 3. günler arasında plazma HGF seviyesi maksimuma ulaşır(77). Portal veni bağlanmamış sıçanlarda hepatektomi sonrası verilen HGF'nin hem hepatosit kitlesini hemde DNA sentezini arttırdığı, portal veni bağlanmış kontrol grubunda hipertrofi olmaksızın DNA sentezinin arttığı belirlenmiştir(78). HGF gibi bazı büyüme faktörlerinin en önemli kaynağı pankreasın ekzokrin kısmı olduğu için, HGF parakrin mekanizmayla hepatositler üzerine etkilidir. Pankreatektomi ile birlikte parsiyal hepatektomi uygulanmış deneklerin karaciğerlerinin rejenerasyonu ve iyileşmesinde gerileme olmaktadır(5). HGF'nin mitojen etkisi sadece hepatositler ile sınırlı olmayıp farklı hücre tipleri üzerine de benzer etkiler yapar(59).

**TNF:**  $TNF_{\alpha}$  ve  $TNF_{\beta}$  olmak üzere iki formu vardır.  $TNF_{\alpha}$  başlıca makrofajlardan salınan klasik formdur ve kaşektin olarak bilinir.  $TNF_{\beta}$  ise lenfosit kaynaklıdır. Lenfotoksin- $\alpha$  olarak anılır. Reseptörleri ( $TNFR_I$  ve  $TNFR_{II}$ ) ve etki mekanizmaları aynıdır. Birçok doku ve hücre üzerinde farklı etkilerinin olduğu bilinen bir proteindir. TNF, doğal ve kazanılmış bağışıklık, hücre regülasyonu, farklılaşma ve apoptoz süreçlerinde önemli rollere sahip, polipeptid yapıda bir sitokindir. Başta makrofaj ve lenfositler olmak üzere çeşitli immun ve somatik hücrelerde sentezlenir. TNF'nin ilk tarifi 1975'te Carswell tarafından yapılmıştır. Prohormon

şeklinde membrana entegre halde bulunur. Uyarılara yanıt olarak membranöz TNF (m-TNF), TNF dönüştürücü enzim (TACE) tarafından yıkılır ve matür ve solubl form (s-TNF) oluşur. Oluşan bu moleküllerin üçü bir araya gelerek aktif olan homotrimer yapıyı oluşturur. TNF ekspresyonu uyarı sonucu yarım saat içinde başlar, 90–120 dk arasında pik yapar. Daha sonra salınan IL–1 ve IL–6 TNF ekspresyonunu inhibe eder. Dört saat içinde TNF düzeyi sıfıra düşer. TNF koşullara bağlı olarak NF-κB (nuclear factor kappa binding ) tarafından aktivasyonları düzenlenen hücreler üzerinde promitojenik etkiye sahiptir(79). Genetik olarak TNF<sub>1</sub> reseptör defektli sıçanların parsiyel hepatektomiye yanıtlarının yavaş ve eksik olduğu görülmüş(80). TNF aynı zamanda iNOS'un regülasyonunda rol oynar, iNOS defekti bulunan sıçanların karaciğer rejenerasyonlarında defektlidir(81). TNF hepatositler için direkt mitojen değildir. HGF gibi direkt mitojenlerin mitojenik etkilerini artırır. Hepatektomi sonrası TNF plazma düzeyleri artar.

***TNF inhibitörleri:*** Karaciğerdeki farklı pro ve anti-inflamatuar sitokinlerin arttırdığı inflammatuar süreç ile karakterize birçok akut ve kronik karaciğer hastalığı fibrozis ve siroz gelişimi ile sonuçlanmaktadır. Birçok alkolik hepatit gelişimi TNF<sub>α</sub> ile ilişkilidir. Bu hastalıkların tedavisinde anti-TNF ilaçların (İnfliximab, Eternecept) kullanımının denenmesini akla getirmektedir. İnflamatuar sitokinler akut ve kronik karaciğer hastalıklarında önemli rol oynamaktadır. Bunların proinflammatuar ajanlar (TNF antagonisti) ve anti-inflamatuar sitokinlerle (IL–10, adiponektin) ile inhibisyonu bu gibi hastalıkların tedavisinde yeni bir gelişim olabilir(82) (Şekil- 11).

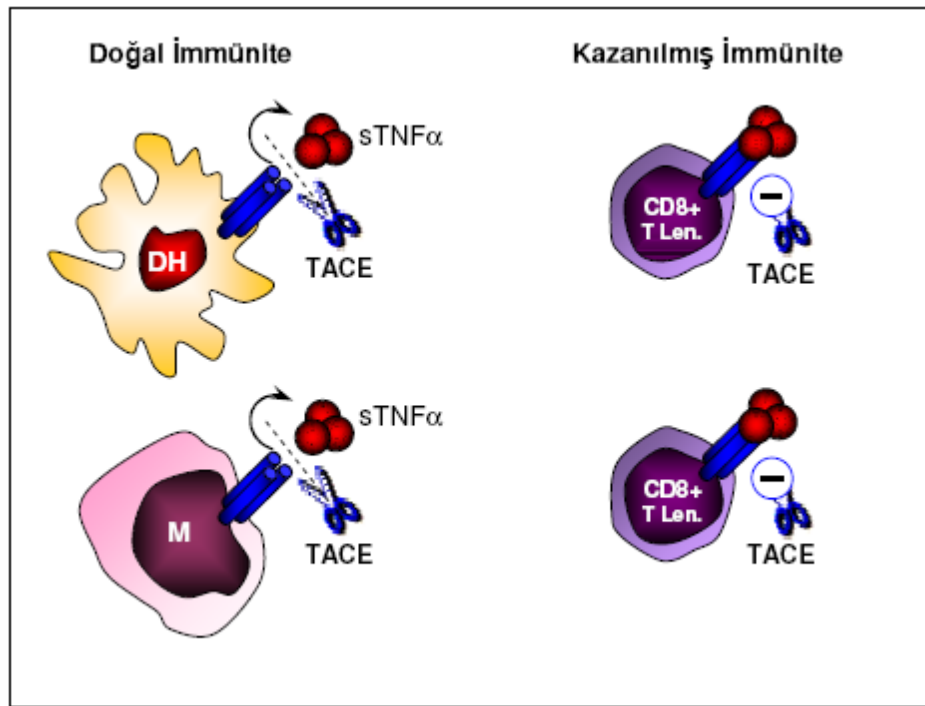




**Şekil- 11:** Karaciğer hasarında anti-TNF antikorunun etkinliği (Liver International -2006).

**Anti-TNF İlaçların Etki Mekanizmaları:** Anti-TNF monoklonal antikorlar (infliximab, adalimumab) ve solubl TNF reseptörleri (etanersept, onersept ve lenersept) hem solubl hem de membrana bağlı TNF'leri bağlamaları ve böylece onların fonksiyonlarını bloke etmelerine karşın etki mekanizmaları açısından aralarında önemli farklar olduğu gösterilmiştir. Örneğin, anti-TNF monoklonal antikorlar sadece TNF $\alpha$ 'yı bağladığı için TNF $\alpha$  ve ona bağlı sitokinlerin aktivitelerini baskırlarlar. Solubl reseptörler ise TNF $\alpha$ 'nın yanı sıra makrofajlar ve T hücrelerinden salgılanan lenfotoksin-  $\alpha$  (LT-  $\alpha$  ) veya eski adıyla TNF $\beta$ 'yı da bağlarlar. Diğer bir fark, anti-TNF monoklonal antikorlar TNF $\alpha$ 'nın hem TNFR $_I$  hem de TNFR $_{II}$  reseptörüne bağlanmasını önleyerek her iki reseptöründe fonksiyonunu bloke etmektedir. Solubl reseptörler ise sadece bir reseptörün özelliklerine sahip olacak şekilde üretilmektedir (etanersept TNF $_{II}$ , lenersept ise TNF $_I$  reseptörü gibi). Diğer önemli bir unsurda, bu ilaçların membrana bağlı TNF'lere bağlanmada ve buna bağlı gelişen reaksiyonlarda farklılıklar olmasıdır. İmmün yanıt ve sitokin biyolojisini anlamakta reversibl ve irreversibl etki kavramları önemlidir. Hücre dışı mesafede olan bir TNF $\alpha$ 'nın soluble reseptör veya monoklonal antikorlar ile bağlanması için affinitenin, IgG tipinin, soluble reseptörlerin TNF $_{II}$  veya TNF $_I$  olmasının önemi yoktur. Membrana bağlı TNF $\alpha$  ile bağlanma ise farklıdır.

Membrana bağılı  $TNF_{\alpha}$  tam olarak aktif formda bir sitokindir. Prokürsör  $TNF_{\alpha}$ , metalloproteaz “ $TNF_{\alpha}$  Converting Enzyme (TACE)” tarafından parçalanır ve  $TNF_{\alpha}$  olarak ortama salınır. TACE makrofaj ve dentritik hücrelerde eksprese olan bir enzimdir ve çok çeşitli mekanizmalarla aktive olmaktadır. T lenfositlerinde ise TACE aktivasyonu etkin değildir. Bu nedenle T hücrelerinde sentez edilen  $TNF_{\alpha}$ 'lar membrana bağılı olarak kalır. Makrofajlarda sentez edilenler ise TACE ile parçalanarak ortama salınırlar. Genel olarak  $CD4+$  ve  $CD8+$  T hücrelerinin membran  $TNF_{\alpha}$  eksprese ettikleri, makrofaj ve dentritik hücrelerin ise  $TNF_{\alpha}$ 'yı sekrete ettikleri bilinmektedir (Şekil- 12).



**Şekil- 12.** İmmün sistemdeki farklı hücrelerde TACE aktivitesine bağılı olarak  $TNF_{\alpha}$  ekspresyonu.

$TNF_{\alpha}$ 'nın aktif hale gelmesi için trimerik yapı oluşturması gerekir. Yapılan çalışmalarda, membran  $TNF_{\alpha}$ 'larında trimerik yapı oluşturduğu ve bu nedenle membrana bağılı  $TNF_{\alpha}$ 'larda aktif formda oldukları gösterilmiştir. Membran  $TNF_{\alpha}$  hücre-hücre iletişimde önemlidir. Sitokinlere bağılı otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların patogenezinde hücre dışı boşlukta yer alan soluble sitokinden daha çok hücre-hücre arası iletişim ile aktivasyona sebep olan membran sitokinlerinin daha önemli olduğu düşünülmektedir. Bu

nedenle bir hastalığın anti-TNF ilaçlar ile etkin tedavisi için membran  $TNF_{\alpha}$  aktivitesinde baskılanması gereklidir. Solubl ve membran  $TNF_{\alpha}$ 'larının  $TNFR_{II}$  reseptörüne ve dimerik yapıdaki solubl TNF reseptörü etanersepte bağlanması hızlı ve reversibldir. Monoklonal antikör olan infliksimab ise membran  $TNF_{\alpha}$ 'ları ile daha stabil bir kompleks oluşturmaktadır. Ayrıca daha yüksek afinite ile daha çok sayıda infliksimab molekülü membran  $TNF_{\alpha}$ 'larını bağlamaktadır. Bu nedenle membran  $TNF_{\alpha}$ 'larının etanersept ile bağlanması infliksimab'a göre daha düşük afiniteli, reversibl ve buna bağlı olarak biyolojik aktivite inhibisyonu daha azdır. Yapılan in vitro çalışmalarda membran  $TNF_{\alpha}$  eksprese eden hücreler infliksimab ile bağlanması sonucu komplemana bağlı hücre lizisi veya antikora bağlı sitotoksiste ile ölüme gittikleri gösterilmiştir(83).

**Etanersept:** Rekombinant  $TNF_{\alpha}$  reseptör füzyon proteinidir.  $TNF_{\alpha}$  ve  $TNF_{\beta}$ 'ya bağlanarak reseptörlerine ulaşmalarını engeller. 1998 yılında romatoid artrit hastalarında kullanılmak üzere FDA onayı almıştır. Juvenil romatoid artrit, ankilozan spondilit, psöriatik artrit, kalp yetmezliği, inflamatuvar barsak hastalıkları kullanıldığı bazı durumlardır.

**İnfliximab:** Anti- $TNF_{\alpha}$  monoklonal antikördür.  $TNF_{\alpha}$  molekülünün hem çözünebilen hem de transmembranöz formlarına yüksek afinite ile bağlanır ve  $IL-1$ ,  $IL-2$  ve lökosit aktivasyonunda önemli olan adezyon moleküllerinin üretimini azaltır. Çok sayıda in vitro incelemede infliximab'ın  $TNF_{\alpha}$ 'nın fonksiyonel aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. %25 fındık faresi + %75 insan antiköründen oluşturulmuştur (*kimerik*). 1998'de Crohn hastalarında kullanılmak üzere FDA onayı almıştır. Crohn hastalığı, ülseratif kolit, steroide dirençli akut karaciğer hasarı, GVHD, romatoid artrit, ankilozan spondilit ve spondiloartropati, enterokutan ve rektovajinal fistül tedavisinde kullanılır(84, 85).

Deneysel çalışmalar:  $CCl_4$  tarafından indüklenen karaciğer fibrozisinin tedavisi(86).

**Adalimumab:** Rekombinant insan anti-TNF monoklonal antikörüdür. Solubl  $TNF_{\alpha}$ 'ya bağlanarak yüzeydeki  $TNF_I$  ve  $TNF_{II}$  reseptörlerine bağlanmasını engeller. Romatoid artrit tedavisinde kullanılır.

**Lenersept:** Rekombinant  $TNF_{\alpha}$  reseptörüdür.

**Talidomid:** Sentetik glutamik asit derivativesidir.  $TNF_{\alpha}$ 'nın RNA'sının parçalanmasını artırır. 1998'de eritema nodozum leprozum tedavisinde kullanılmak üzere FDA onayı almıştır. Crohn hastalığı, romatoid artrit, kalp yetmezliği, aftöz ülserler, still hastalığı, diskoid lupus, Behçet hastalığı, piyoderma gangrenozum, histiyositoz, sarkoidoz, multipl myeloma, kaposi

sarkomu, AIDS'li hastalarda ortaya çıkan enfeksiyonlar ve solid tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır.

**Anti-TNF İlaçların Yan Etkileri:** Anti-TNF ilaçların kullanımı esnasında çeşitli yan etkiler saptanmıştır. Genel ve fırsatçı enfeksiyonlar yan etkiler içinde ilk sırayı almaktadır. Demiyelinizan hastalık, lupus benzeri klinik tablo, konjestif kalp yetmezliği ve özellikle lenfoma olmak üzere maligniteler ise enfeksiyon dışı yan etkileri oluşturmaktadır.

**IL-6:** Kaynağı T ve B hücreleri, makrofajlar, endotelial hücreler, fibroblastlar, hepatositlerdir. Akut travma ve stres sırasında kan düzeyi yükseldiğinden dolayı genellikle sistemik inflamatuvar yanıt veya postoperatif morbidite indikatörü olarak kullanılır. Salgılanmasında major etkiyi IL-1 ve TNF $\alpha$  sağlar, IL-4, IL-10 ve IL-13 tarafından baskılanır(87). Travmadan sonra 60 dakika içinde dolaşımdaki düzeyi ölçülebilir, dört ile altı saatte pik yapar ve dolaşımda kalma süresi 10 güne kadar uzayabilir. Ulaştığı kan düzeyi direkt doku hasarı ile bağlantılıdır. IL-1 ve IL-6, travma sırasındaki hepatik akut faz protein yanıtının önemli mediatörleridir ve C-reaktif protein (CRP), fibrinojen, haptoglobulin,  $\alpha_1$ -antitripsin ve kompleman yapımını da artırır. Sağlıklı bireylerde serum IL-6 düzeyleri saptanmazken inflamatuvar olaylarda serum seviyeleri artar. IL-6 sıçanlarda parsiyal hepatektomiden sonra karaciğer rejenerasyonunu uyaran önemli bir mitojen ve anti-apoptik faktördür(3, 17). Rejenerasyon uyarısına cevap verirken, TNF $\alpha$  aktivasyonu ile etkinlik kazanan IL-6, farklı hedef hücre tipleri üzerine çok yönlü biyolojik aktiviteler gösteren pleiotropik bir sitokindir(88). Bu sitokin, hemapoietik sistem düzenlenmesinde, lenfosit fonksiyonlarında ve hücre farklılaşmasında görev alan önemli bir mediatördür. Sıçanlarda parsiyal hepatektomiden sonraki 24-48. saatler arasında IL-6'nın serum konsantrasyon seviyesi artar(59, 63, 89). IL-6'nın fizyolojik miktarı rejenerasyon için gereklidir ancak fazla IL-6 büyüme durdurucu onkogenleri uyatarak rejenerasyonun bozulmasına neden olabilir(90). İnflamatör sitokinlerin önemli kaynağı kupffer hücreleri(59) ve sinusoidlerdeki endoteldir(91). Ayrıca, TNF $\alpha$ , IL-6 ve HGF ile heparine bağlı EGF'nin temel kaynağı, karaciğerdeki parankimal olmayan hücreler de olabilmektedir(62). IL-6 sitokininin hepatosit büyümesi üzerine etkisi otokrin mekanizma ile olabilir. Ayrıca IL-6'nın karaciğeri toksik hasarlardan korumada da önemli rolü vardır(66).

**Epidermal büyüme faktörü (EGF):** Hepatositlerde DNA sentezini uyardığı belirlenen ilk faktördür(92). Hepatosit kültürlerinde mitojen etkisi kanıtlanmıştır(9). Hepatektomi sonrası

artan noradrenalin uyarısıyla submandibular bezlerden ve Brunner bezlerinden salınımı artmaktadır(93). Amfiredülin epidermal growth faktör ailesinin bir üyesi olup hepatektomi yapılan ratlarda karaciğer rejenerasyonunun erken fazına etkili bir erken-yanıt büyüme faktörü olduğu görülmüştür(94).

**STAT<sub>3</sub>**: Hücre döngüsünde yer alan ve potansiyel transkripsiyon faktörlerinden olan Signal Transducers Activators of Transcription (STAT<sub>3</sub>)'ün aktivasyonu IL-6 sitokininin serbest kalmasına ve EGF'nin uyarısına bağlıdır(3, 59, 66, 67). Bu açıdan hücre döngüsünün ilerlemesinde IL-6 varlığı oldukça önemlidir(91). Sıçanlarda parsiyal hepatektomiden sonraki 30 dakika ve üçüncü saatler arasında STAT<sub>3</sub>'ün seviyesi yüksektir. STAT<sub>3</sub>'ün hücre büyümesi, farklılaşması ve pek çok sistemde hücrelerin G<sub>1</sub>'den S fazına geçişlerinde önemlidir. Hepatositlerin G<sub>1</sub>'den S fazına geçişinde, HGF ve TGF-N büyüme faktörlerinin de varlığında STAT<sub>3</sub> aktivasyonu gereklidir(59).

**Transforme edici büyüme faktörü alfa (TGF<sub>α</sub>)**: Karaciğer rejenerasyonunun başlangıç safhasından sonra rol oynadığı düşünülmektedir. EGF ile aynı reseptör üzerine etki eder. Hepatosit kültürlerinde DNA sentezini arttırmaktadır(92, 95).

**Norepinefrin**: α<sub>1</sub>-adrenerejik reseptörler yoluyla direkt EGF'yi arttırarak indirekt yoldan karaciğer rejenerasyonunu arttırır. Sempatik denervasyon ve α<sub>1</sub> reseptör blokajı DNA sentezini azaltmaktadır(9).

**İnsülin**: Porto sistemik şant sonucu gelişen karaciğer atrofisi insülin verilmesiyle engellenebilmektedir(96). Primer mitojen olmamasına karşın hücre kültürlerinde diğer büyüme faktörlerinin etkisini arttırmaktadır(9).

**Hepatosit uyarıcı madde (HSS)**: 53 kilodalton ağırlığında bir proteindir. İnvitro ve invivo olarak hepatotrofik etkisi vardır(97).

**Seks hormonları**: Hepatektomi sonrası hepatositlerde östrojen reseptörleri artarken androjen reseptörleri azalmaktadır. Östrojenin hücre kültürlerinde hepatosit bölünmesini arttırıcı etkisi vardır. Anti östrojen bir ajan olan tamoksifenin invitro ve invivo karaciğer rejenerasyonunu azalttığı gösterilmiştir(92, 98). Buna karşın antiandrojenlerin belirgin bir etkisi gösterilememiştir(99).

**GM-CSF**: Granülosit makrofaj koloni stimulan faktör'ün (GM-CSF), deneysel çalışmalarda hepatic rejenerasyonu arttırdığı, kupffer hücrelerinin diferansiyasyon ve proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir(100).

**Leflunomid:** Leflunomid(L) yeni bir anti-inflamatuar ajan olup güçlü immünomodülatör ve anti-oksidan etkinliklere sahiptir. PH'de rejenerasyon, oksidatif stres ürünlerince baskılanmaktadır. Leflunomid güçlü anti-oksidan ve selektif immünomodülatör özelliği ile yapılan deneysel çalışmada ratlarda PH sonrası karaciğerin rejenerasyon kapasitesini arttırdığı saptanmıştır(101).

**Diğerleri:** Fibroblast büyüme faktörü (FGF), vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), triiyodotironin ( $T_3$ ), retinoik asit, bazı ilaçlar (barbütatlar, diazepam, hipolipidemik ajanlar, anti epileptik ajanlar), büyüme hormonu,  $PGE_2$ , siklosporin, FK506, vazopressin gibi faktörlerin karaciğer rejenerasyonuna olumlu katkıları olduğu bildirilmektedir(9, 97, 102, 103, 104).

#### **1.4.5. Karaciğer Rejenerasyonunu İnhibe Eden Faktörler**

**TGF- $\beta$ 1:** Bilinen en önemli rejenerasyon inhibitörüdür. İto hücreleri tarafından hepatektomi sonrası erken dönemde salgılanır. Rejenerasyon devam ettiği sürece  $\alpha_2$  makroglobuline bağlı inaktif formundadır. Zamanı geldiğinde aktive olarak rejenerasyonu sonlandırır(9). Bu zamanlamayı etkileyen faktörler bilinmemektedir.

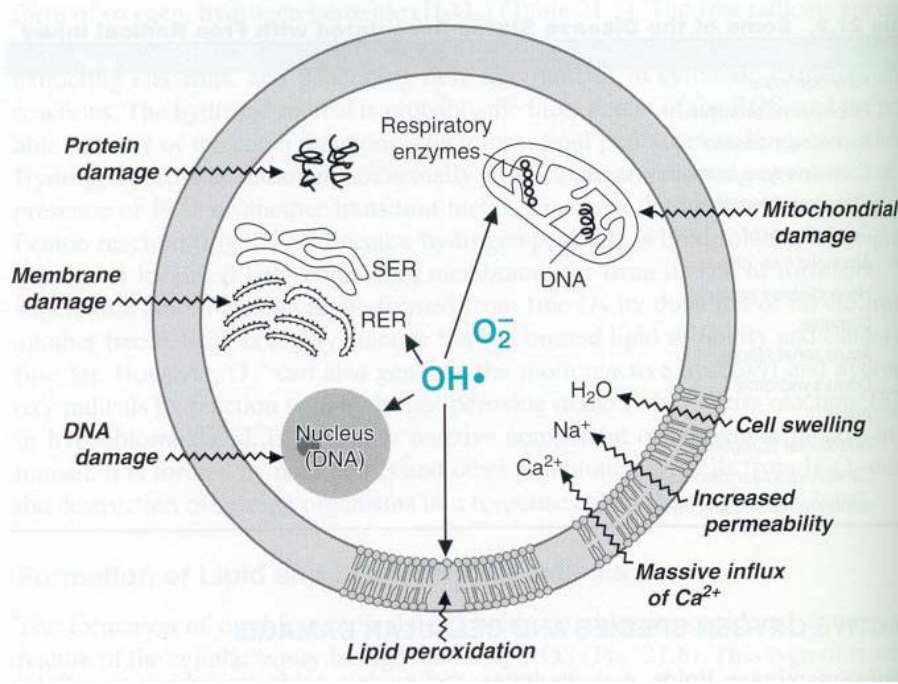
**IL-1:** Sentezinin kaynağı makrofajlar, B ve T hücreleri, NK hücreleri, endotelial hücreler, epitelial hücreler, fibroblastlar, osteoblastlar ve dendritik hücrelerdir.  $TNF_\alpha$  biyosentezini ve salınımını indükler. Bilinen iki proinflamatuvar türü vardır; IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ . IL-1 $\alpha$  asıl olarak hücre zarı ile ilgilidir ve etkisini hücrelerarası temas aracılığıyla gösterir. Dolaşımda bulunan IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ 'ya göre daha fazla miktarlarda sentezlenir ve travmayı takiben oluşan karakteristik değişiklikleri indükler. IL-1'in etkileri  $TNF_\alpha$ 'ya yakındır ve benzer fizyolojik ve metabolik değişikliklere neden olur.  $TNF_\alpha$  ve IL-1'in proinflamatuvar etkileri sinerjistikdir. IL-1'in yarı ömrü altı dakika kadardır, bu nedenle akut travma veya hastalıkta kanda tespit edilebilme olasılığı  $TNF_\alpha$ 'ya oranla daha düşüktür. Ayrıca IL-6 yapımında artışa neden olarak akut faz reaktanlarının yapımını artırır. IL-1 reseptör antagonistleri (IL-1ra) olarak bilinen non-agonist IL-1 türevleri de travma sırasında salınır. Bu molekül, reseptörlere bağlanmak için IL-1 ile kompetisyona girer, reseptöre bağlandığında ise belirgin bir etki görülmez. İnflamasyon ve travma sırasında tespit edilebilen IL-1ra'nın görevi IL-1 aktivitesinin regülasyonudur(105).

### 1.5. Hepatosellüler Zedelenmenin Değerlendirilmesi

Hepatosellüler zedelenmeyle ilişkili testler serum transaminazları veya aminotransferazları olarak adlandırılan, aspartat aminotransferaz (AST, serum glutamik-oksaloasetatik asit transferaz [SGOT]), alanin aminotransferaz (ALT, serum glutamik-piruvik transaminaz [SGPT]) enzimleridir. AST karaciğer dışında, iskelet ve kalp kaslarında, böbrekler, beyin, pankreas, akciğerler, lökositler ve eritrositlerde bulunurken ALT esas olarak karaciğerde bulunur. ALT sitozolde, AST ise hem sitozolde hem de mitokondride yer alır. Transaminazlar normal hücre döngüsünü yansıtacak şekilde dolaşımda az miktarda bulunur, transaminazlardan zengin dokularda zedelenme durumunda serum düzeyleri yükselir. Serum transaminazlarının hepatosit hasarını göstermede duyarlılığı çok yüksektir, etiyolojik faktörden bağımsız olarak karaciğer zedelenmesinin sürdüğü tüm durumlarda serum seviyeleri yükselir. Sadece fulminan seyirli hepatitlerde artık nekroze olacak yeterli miktarda hepatosit kalmadığında düzeyleri normal hatta düşük olabilir ki; bu kötü prognoz belirtisidir(106).

### 1.6. Serbest oksijen radikalleri ve Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı ( $pO_2$ ), ozon ( $O_3$ ) ve azot dioksit ( $NO_2^*$ ), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar. Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^*$ ) sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran permeabilitesi artar. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer aminoasit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur. Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olur(Şekil- 13). Hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir.



Şekil- 13: Serbest oksijen radikallerinin etkileri sonucunda gelişen hücre hasarı

### 1.6.1. Serbest radikallerin lipidlere etkileri

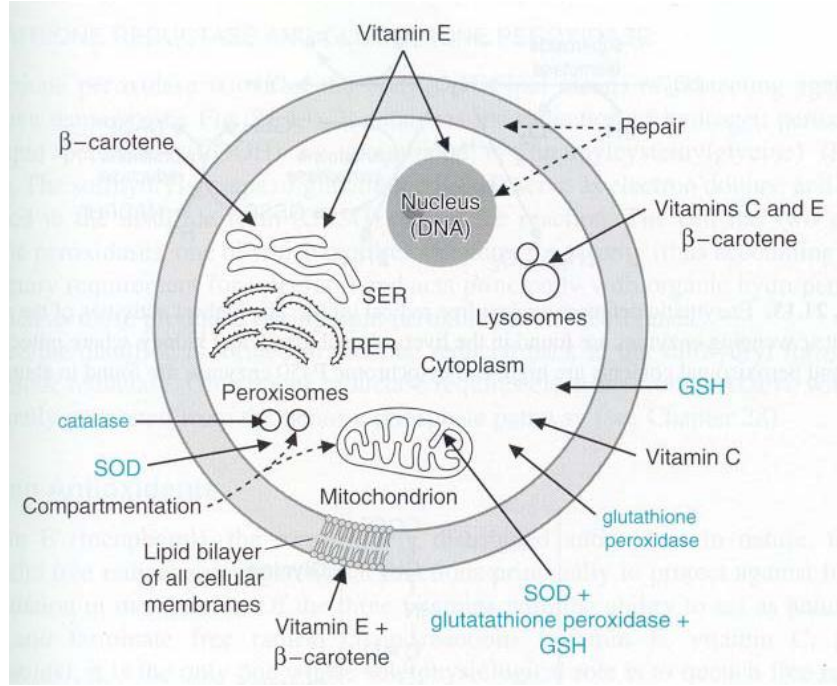
Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri (L<sup>•</sup>) ve lipid peroksit radikallerinin (LOO<sup>•</sup>) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir.

**Malondialdehid (MDA):** Serbest radikal oluşumunun en önemli patolojik sonuçlarından biri, lipid peroksidasyonudur. Serbest oksijen radikalleri (süperoksit, hidroksi, peroksit, alkoksil radikalleri) membran fosfolipidlerinin yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin metilen grubundan bir hidrojen atomunu kopararak lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Peroksit radikali, lipid molekülü ile lipid hidroperokside dönüşüp komşu yağ asidi zincirlerinden bir hidrojen atomu çıkartarak reaksiyonun devamını sağlar. Bu aşamada; MDA, alkoller, etan, pentan gibi ürünler oluşur(107). MDA, lipid peroksidasyonunun bir göstergesidir, proteinlerin aminoasit gruplarıyla, fosfolipidlerle ve nükleik asitlerle arasında çapraz bağlar oluşturarak etkisini gösterir. Membran iyon transportunu, akışkanlığını, enzim aktivasyonunu ve deformasyon kabiliyetini bozar, böylece sitotoksisiteye, mutajen oluşumuna, membran yıkımına yol açar(108).



### 1.6.2. Serbest radikallere karşı hücresel savunma(antioksidanlar)

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için gelişmiş mekanizmalar "*antioksidan savunma sistemleri*" veya kısaca "*antioksidanlar*" olarak bilinirler(Şekil- 14). Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler.



Şekil- 14: Antioksidan savunma sistemleri

#### 1.6.2.1. Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

**Enzim olan endojen antioksidanlar şunlardır:** 1) Süperoksit dismutaz (SOD), 2) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), 3) Glutasyon S-Transferazlar (GST), 4) Katalaz (CAT), 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, 6) Hidroperoksidaz.

**Enzim olmayan endojen antioksidanlar şunlardır:** 1) Melatonin, 2) Seruloplazmin, 3) Transferin, 4) Miyoglobin, 5) Hemoglobin, 6) Ferritin, 7) Bilirubin, 8) Glutasyon, 9) Sistein, 10) Metiyonin, 11) Ürat, 12) Laktoferrin, 13) Albümin.

### 1.6.2.2. Eksojen antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler.

**Glutasyon peroksidaz (GSH-Px):** Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) sitozolde bulunur, 4 selenyum atomu içerir, tetramerik yapıdadır. Glutasyon peroksidaz (glutasyon:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidoredüktaz, EC 1.11.1.9), hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px) adı verilen bir enzim monomerik yapıdadır ve esas olarak membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger. Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px) membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğunda membranı peroksidasyona karşı korur. GSH-Px'ın fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önler. GSH-Px eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Eritrosit GSH-Px aktivitesi yaşlılarda ve Down sendromlu hastalarda yüksek, prematürelde düşük bulunmuştur. Lökosit GSH-Px aktivitesi yaşlılarda ve hipertansiyonlu hastalarda yüksek bulunmuştur.

**Katalaz (CAT):** Katalaz (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidoredüktaz, EC 1.11.1.6) yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Katalaz esas olarak peroksizomlarda daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. Katalaz hidrojen peroksidi (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) suya ve oksijene parçalar. Granülomatöz hücrelerde katalaz, hücreyi kendi solunumsal patlamasına karşı koruma işlevini de görür. Hücrede oluşan hidrojen peroksidi (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) hidroksil serbest radikali (OH<sup>•</sup>) oluşumunu önlemek için ortadan kaldırır.

**Nitrik oksit (NO) :** Nitrik oksit (NO) hem fizyolojik hem patofizyolojik süreçlerde önemli bir role sahip serbest radikaldir. (NO) sentezi bazı hücrelerde bir reseptöre bir stimülatörün bağlanmasına veya nöronlarda bir sinir uyarısına yanıt olarak meydana gelir. Nitrik oksit (NO) muskarinik veya histamin reseptörleri gibi çeşitli reseptörlerin aktivasyonu sonucu L- arjinin ve oksijenden, nitrik oksit sentaz (NOS, EC 1.14.13.39) etkisiyle sentezlenir. Nitrik oksit (NO) sentezinin insanda vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli rol oynadığı, kan basıncı ve böbrek fonksiyonunun kontrolünde kesin bir role sahip olduğu bilinmektedir. Nitrik oksit (NO) vasküler endotelial hücrelerde oluşturulan önemli bir vazodilatatördür. Nitrik oksit sentaz (NOS) sinir dokuda, vasküler endotelde, trombositlerde ve diğer dokularda

bulunur. Nitrik oksit sentazın (NOS), nöronal NOS (tip I, nNOS), endotelial NOS (tip III, eNOS) ve indüklenbilir NOS (tip II, iNOS) olmak üzere farklı lokalizasyon ve düzenlenmeye sahip üç izoenzimi vardır. İndüklenbilir NOS (tip II, iNOS) normal şartlar altında bulunmaz. İnflamasyon veya enfeksiyon durumlarında sitokinler veya endotoksinler tarafından indüklenir ve uzun dönemde bol miktarda üretilir. iNOS hepatositler, makrofajlar, nötrofiller, düz kas hücreleri, kondrositler gibi birçok hücre tipinde indüklenbilir. iNOS vasıtasıyla oluşturulan (NO<sup>•</sup>), antimikrobiyal aktiviteye sahiptir ve bu nedenle nonspesifik konak savunma sisteminin önemli bir parçasıdır.

Nitrik oksid ürünlerinin ve lipid peroksidasyonunun karaciğer hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde rol aldıkları bilinmektedir, fakat bu yüksek nitrik oksid ürünleri, lipid peroksidasyonu ve karaciğer rejenerasyonu arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamıştır. Daha önceki çalışmalarımızda da görüldüğü gibi NOS inhibitörü olan L-NAME kullanılarak nitrik oksid inhibisyonu sağlanan parsiyel hepatektomili rat grubunda karaciğer rejenerasyon oranları kontrol grubuna göre daha düşüktür(109).

**Nitrik oksidin (NO<sup>•</sup>) oksidatif etkileri:** Nitrik oksid (NO<sup>•</sup>) Fe-S proteinlerinden demiri çıkararak yerine kendisi bağlanır, böylece Fenton reaksiyonunu stimüle eder ve bu mekanizma ile karsinogeneziste rol oynar. Nitrik oksidin süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle yarışmaya girmesi ve süperoksit radikaliyle (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) etkileşmesi sonucu peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) oluşur. Böylece nitrik oksidin fizyolojik etkisi inhibe edilir, oksidatif etkisi ortaya çıkar. Peroksinitrit, nitrik oksit toksisitesinin başlıca sorumlusudur (110, 111,112,113).

# GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma; Adnan Menderes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda 2008 Ocak -Şubat tarihleri arasında Üniversite Yerel Hayvan Etik Kurulu onayı alınarak yapıldı (B.30,2.ADÜ.0.06.00.00/124-HEK/2007/0029). Çalışmanın tüm safhalarında yerel etik kurulun 03 Ekim 2007 tarihli yönergelerine uygun hareket edildi.

## 1. 1. Deneysel Model

Çalışmada Ege Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi deneysel cerrahi laboratuvarında üretilmiş, ağırlığı 174- 270 gr arasında değişen, 60 adet erkek Wistar-Albino tipi sıçan kullanıldı. Deney süresince sıçanlar 12/12 saat aydınlık ve karanlık ışıklandırması olan, ısı  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  ve nem oramı %45-50 arasında değişen otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatıldılar. Benzer deneylere başlangıç koşullarına uygunluk sağlanması amacıyla tüm hayvanlar deney öncesinde bir hafta süre ile ortam koşullarına adaptasyon sürecine bırakıldı(58, 61, 64). Adaptasyon sürecinde sıçanlar polikarbonat şeffaf kafeslerde standart sıçan yemi ve çeşme suyu ile beslendi. Ardından; denekler her biri 30 sıçandan oluşan kontrol ve çalışma gruplarına randomize edildi. Daha sonra gruplar eşit sayıda denek içerecek biçimde üç ayrı alt gruba ayrıldı. Çalışmada Anti-TNF $\alpha$  monoklonal antikoru (Infliximab ®, J&J) kullanımının karaciğer rejenerasyonuna erken dönemde etkisini incelemek amacıyla laparotomi ve parsiyel hepatektomi sonrası sıçanlara Infliximab 24. ve 48. saatte 10 mg/kg/gün intraperitoneal olarak verildi. Kontrol gruplarına ise aynı işlemlerden sonra intraperitoneal 3 cc %0.9 NaCl(SF) enjekte edildi(114).

### 1.1. 1.Çalışma Grupları

**Grup I (Laparotomi + SF - 48 saat):** Laparotomi yapılan sıçanlarda hepatik pedikül çevresi manipüle edildi ve operasyon sonrasında periton içine 3 cc SF enjeksiyonu yapıldı. Sıçanlar 48. saat sonunda sakrifiye edildi (n=10).

**Grup II (PH + SF - 24 saat):** Parsiyel hepatektomi sonrasında periton içine 3 cc SF enjeksiyonu yapıldı. Sıçanlar 24. saat sonunda sakrifiye edildi (n=10).

**Grup III (PH + SF + SF - 48 saat):** Parsiyel hepatektomi sonrasında ve operasyondan sonra 24. saat sonunda periton içine iki kez 3 cc SF enjeksiyonu yapıldı. Sıçanlar 48. saat sonunda sakrifiye edildi (n=10).

**Grup IV (Laparotomi + İnfliximab - 48 saat):** Laparotomi yapılan sıçanlarda hepatic pedikül çevresi manipüle edildi ve operasyon sonrasında periton içine Infliximab (10 mg/kg/gün) 3 cc SF ile dilüe edilerek enjekte edildi. Sıçanlar 48. saat sonunda sakrifiye edildi (n=10).

**Grup V (PH + infliximab - 24 saat):** Parsiyel hepatektomi yapılan sıçanlarda operasyondan sonra periton içine Infliximab (10 mg/kg/gün) 3 cc SF ile dilüe edilerek enjekte edildi. Sıçanlar 24. saat sonunda sakrifiye edildi (n=10).

**Grup VI (PH + infliximab + İnfliximab - 48 saat):** Parsiyel hepatektomi sonrasında ve operasyondan 24. saat sonunda periton içine iki kez Infliximab (10 mg/kg/gün) 3 cc SF ile dilüe edilerek enjekte edildi. Sıçanlar 48. saat sonunda sakrifiye edildi (n=10).

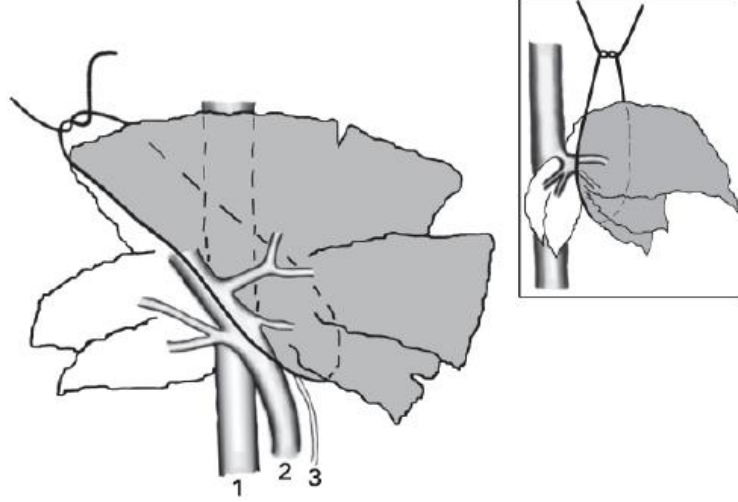
### 1.1.2. Cerrahi İşlem

**Anestezi:** 40 mg/kg ketamin hidroklorür (*Alfamin, Egevet Hayvancılık San. ve Tic. Ltd. Şti*) ve 8 mg/kg xylazin (*Alfazin, Egevet Hayvancılık San. ve Tic. Ltd. Şti*) karışımı intraperitoneal enjeksiyon yolu ile uygulandı. Anestezi uygulamasının ardından sıçanlar tartıldı.



**Resim-1:** Denek hayvanının karın bölgesinin hazırlanması ve laparotomi uygulanması.

Karın cildi traş sonrası povidone iodine ile temizlendi. Üst orta hat insizyonu ile yapılan laparotomi sonrasında (Resim- 1) sıçanlara Higgins ve arkadaşlarının tanımladıkları metoda uygun olarak % 70'lik karaciğer rezeksiyonu uygulandı (Şekil- 15) (37, 115, 116).



**Şekil- 15:** %70' lik karaciğer parankiminin rezeksiyon tekniği (Tannuri ACA, 2007)



**Resim- 2:** Rezeke edilen %70'lik karaciğer bölümü

% 70'lik rezeksiyon karaciğer yetmezliğinin gelişmediği kritik sınır olması nedeniyle tercih edildi(115, 116). Karaciğerin orta ve sol lateral lobları portal hilusun

disseksiyonunun ardından 5/0 ipek ile bağlanarak çıkarıldı. Hemostaz denetlendikten sonra karın katları 4/0 ipek (*Sterisilk®*) ile kapatıldı.

Çıkarılan karaciğer dokusu tartılarak kaydedildi. Post-operatif 24. saatten itibaren oral su ve diyet alımına izin verildi. 24 ve 48 saat süre ile yaşatılan ve yukarıda belirtilen tedaviler uygulanan sıçanlara bu sürelerin sonunda tekrar laparotomi yapıldı. Vena kava inferiordan ortalama 6 ml kan alındı. Geriye kalan karaciğer dokusu tümüyle çıkartıldı, serum fizyolojik ile hızlı bir şekilde yıkandı ve tartıldı. Doku örnekleri patolojik incelemeler için formol içinde ve biyokimyasal parametreler için Ependorf tüplerine konularak soğuk (-4C) saklama kabında hızla Biyokimya laboratuvarına ulaştırıldı (Resim- 3). Kan örneklerinden AST ve ALT parametreleri çalışıldı.



**Resim- 3:** Hazırlanmış kan ve doku örnekleri

## 1.2. Parametreler

### 1.2.1. Morfolojik Parametreler

Otopsideki karaciğer ağırlığından parsiyel hepatektomi sonrası kalan karaciğer ağırlığı çıkartıldı ve bu değer tüm karaciğer ağırlığına oranı hesaplandı. Elde edilen değer 100 ile çarpılarak karaciğer rejenerasyon oranı bulundu(5, 117, 118). Tüm karaciğer ağırlığı sıçan ağırlığının % 3,4'ü kabul edildi (119). Sonuçlar % şeklinde ifade edildi.

$$\text{Rejenerasyon Oranı (RO)} = \frac{\text{Otopsi sırasındaki karaciğer ağırlığı} - \text{Hepatektomiden sonra kalan Karaciğerin tahmini ağırlığı}}{\text{Hepatektomi sırasında alınan KC ağırlığı}} \times 100$$

### 1.2.2. Biyokimyasal Parametreler

**Karaciğer fonksiyon testleri:** Karaciğer hücre harabiyetinde özellikle serum ALT aktivitesi artar. Hücre harabiyeti mitokondrilere kadar ilerlediğinde serum AST aktivitesi de artar. Alınan kan örnekleri 1500 rpm'de 10 dakika santrifüje edilerek plazmaları ayrıldı. Elde edilen plazmalardan Abbott ARCHİTECT AEROSET/C8000 cihazı kullanılarak AST ve ALT parametreleri çalışıldı.

### 1.2.3. Karaciğer Doku Takibi, İmmunohistokimyasal Uygulamalar ve Patolojik Değerlendirme

Gönderilen tüm gruplara ait örneklerden kesit alınarak %10'luk nötral tamponlu formalin solüsyonunda fiksasyon işlemi uygulandı. Rutin doku işlemi sonrası hazırlanan parafin bloklardan poly-L-lysin kaplı lama 4 mikronluk kesitler alındı.

**İmmunhistokimyasal Boyama:** Poly-L-lysin kaplı lama alınan kesitler bir gece 37°C'lik etüvde bekletildi. 2 -30 dk 56°C'lik etüvde bulunan ksilolde, 15 dk oda sıcaklığındaki ksilolde deparafinize edildi. Azalan oranlarda alkol serilerinde rehidrate edildi. Kesitler önceden hazırlanmış olan pH: 7.2 olan phosphate-buffered-saline (PBS) solüsyonunda 5 dk bekletildi. Endojen preoksidaz aktivitesinin bloke edilmesi için, kesitlere %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatılarak 5 dk bekletildi. Kesitler 5 dk PBS solüsyonunda yıkandı. Sitrat Buffer (pH: 6.0) solüsyon dolu kaplara yerleştirilerek mikrodalga fırında 750 watt'da 5 dk, 500 watt'da 2x5 dk süre ile inkübasyon işlemi yapıldı. Böylece antijenin açığa çıkartılması



sağlandı. Kaynatmadan sonra kesitler oda ısısında soğumaya bırakıldı. Kesitler 5 dk PBS solüsyonunda yıkandı ve kurulandı. Her bir kesitin üzerine primer antikor solüsyonu (BrdU) dokuyu tamamen örtecek şekilde damlatıldı ve 1 saat bekletildi. Kesitler 5 dk PBS solüsyonunda yıkılarak bağlanmamış antikorlar uzaklaştırıldı. Biotine bağlayıcı sekonder antikor eklendi ve 10 dk bekletildi. Kesitler 5dk PBS solüsyonunda yıkandı ve kurulandı. Kesitlere Streptavidin Peroksidaz solüsyonu damlatılarak 10 dk beklendi. Kesitler 5 dk PBS solüsyonunda yıkandı. Renk verecek görüntüyü sağlamak amacı ile Diaminobenzidin tetraklorid (DAB) damlatıldı ve kahve renk gözlenene kadar beklendi. Çeşme suyunda 5 dk yıkandı. Zemin boyanması için kesitlere hematoksilin ile zıt boyanma yapıldı. Çeşme suyunda 5 dk yıkandı. Dehidratasyon için kesitler sırası ile yükselen oranlarda alkol serilerinden geçirildi ve ksilolde saydamlaştırma sonrası balsam ile kapatıldı. Boyanan kesitler ışık mikroskopunda(Olympus, BX51, Tokyo, Japan) değerlendirildi. Değerlendirmede en yoğun boyanma gösteren odaklar tespit edilerek, her bir örnek için 50 büyük büyütme alanındaki (50'lik büyütme) toplam boyanan hücre sayısı ve tüm örneklerde ortalama boyanma saptandı(120, 121,)

### 1.3. Yöntemler

#### 1.3.1. Dokuların homojenizasyonu

Dokular proteaz inhibitörü, PMSF(100 mikrog/ml), aprotinin(1 mikrog/ml), 0.001 EDTA, 0.01 M Tris-HCL, 0.1 M NaCl içeren lysis tamponu (PN 7.6) ile +4 derecede polytron homogenizer(B. BRAUN, Germany) kullanılarak homogenize edildi. MDA ve GSH hesaplamalarında tüm doku homojenatı kullanıldı. Daha sonra homojenat 14.000 rpm de +4 °C de 10 dk süreyle santrüfüje edildi. Elde edilen karışım CAT, GSH-Px, NO (nitrit+nitrat), IL-6 ve IL-4 ölçümlerinde kullanıldı.

**Katalaz (CAT) aktivite ölçümü:** Doku homojenatında katalaz aktivite ölçümünde Aebi yöntemi kullanıldı(122). Karışım 50 mM fosfat tamponu(Ph: 7.0), 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve eritrosit lysate ile hazırlandı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin indirgeme oranı oda ısısında spektrofotometrede 240 nm'de 30 saniyede saptandı. Katalaz aktivitesi U/g yaş doku başına hesaplandı.

**İnterlökin 6 tayini (IL- 6):** Doku homojenatında IL- 6 düzeylerinin ölçümlerinde rat ELİSA kiti (IBL Co. Ltd.Gunma, JAPAN) katalog ve kod numarası sırasıyla (17196 ve OC-615) kullanıldı. Test sonuçları bioelisa reader Elx800 standart eğrisi kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar pg/g yaş doku başına verildi.

**İnterlökin 4 tayini (IL- 4):** Doku homojenatında IL-4 düzeylerinin ölçümlerinde rat ELİSA kiti (Immunotech, Beckman Coulter Company, USA) katalog ve kod numarası sırasıyla (IM1981 ve 46B) kullanıldı. Test sonuçları bioelisa reader Elx800 standart eğrisi kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar pg/g yaş doku başına verildi.

**NO<sup>•</sup> (nitrit+nitrat) tayini:** NO<sup>•</sup> (nitrit+nitrat) Navarro-Gonzalves tarafından bahsedilen modifiye cadmium-indirgeme metodu kullanılarak analiz edildi(123). Nitrit üretimi sülfanilamidin diazotizasyonu ve naftiletlen daimine bağlanması ile olmaktadır. NO<sup>•</sup> (nitrit+nitrat) ölçümü için 400 mikrol örnek 80 mikrol 30% ZnSO<sub>4</sub> solüsyonu eklenerek denatüre edildi, daha sonra +4 °C 20 dk süreyle 10,000 x g santrifüje edildi. İlk önce glisin-NaOH tamponu içindeki CuSO<sub>4</sub> solüsyonu kullanarak Cd granüllerini aktive ettik. Daha sonra 100 mikrol deproteinize örnek ve standars eklendi. Bu reaksiyonla nitrat, nitrite indirgendi. Bu indirgenme katalitik enzim veya Cd kullanılarak gerçekleştirilebilir. Örnekler spektrofotometrik olarak microplate reader kullanılarak ve KNO<sub>3</sub> standart eğrisine karşı otomatik olarak ölçülerek tahlil edildi. Sonuçlar mikroM/L olarak verildi.

**MDA tayini:** Dokuda MDA yapımı ve dolayısıyla lipid peroksidasyonu tayini Ohkawa yöntemine göre yapıldı(124). MDA'nın TBA'da var olan renkli bileşik formları 532 nm da absorbans ölçümüyle saptanabilmekte. Absorbanslar Shimadzu UV- 160 spektrofotometre ile ölçüldü. Standart olarak 1,1',3,3'-Tetraethoxypropane kullanıldı ve sonuçlar nmol/g yaş doku başına verildi.

**Total glutatyon (GSH) aktivite tayini:** Doku örneklerindeki total glutatyon miktarı protein çökteltisi için metafosforik asit ve renkli oluşumlar için 5.5'dithiobis (2-nitrobenzoic acid) kullanılarak hesaplandı(125). GSH miktarının hesaplanması için standart eğri kullanıldı.

### 1.3.2. İstatistiksel analiz

Gruplar tek yönlü varyans analizi ile kıyaslandı. Gruplar arası tek tek kıyaslamalar için post-hoc testler kullanıldı, p değeri 0,05 altında ise aradaki fark anlamlı kabul edildi.

## SONUÇLAR

Çalışmaya alınan ratlarda mortalite ile karşılaşılmadı. Laparotomisi yenilenen ratların karın içi eksplorasyonlarında olağandışı postoperatif değişiklikler gözlenmedi. Çıkartılan karaciğer dokusunun incelenmesi sonucu elde edilen bulgular aşağıda belirtilmiştir:

### 1.1. Biyokimya İncelemeleri

**AST ve ALT:** Grup V'in (PH + infliximab - 24 saat) AST ve ALT değerleri diğer tüm grupların AST ve ALT değerlerinden daha yüksekti ( $p < 0,05$ ; Grafik 1A ve 1B).

**CAT:** Grup V'in (PH + infliximab - 24 saat) katalaz değeri diğer grupların katalaz değerlerine oranla en yüksekti. Ayrıca grup III'ün (PH + SF + SF - 48 saat) katalaz değeri diğer gruplar arasında en düşüktü. ( $p < 0,05$ ; Grafik 2A).

**GSH:** Grup V'in (PH + İnfliximab - 24 saat) ve grup VI'nın (PH + infliximab + infliximab - 48 saat) GSH düzeyleri tüm diğer grupların GSH değerlerinden düşüktü ( $p < 0,05$ ; Grafik 2B).

**MDA:** Grup III'ün (PH + SF + SF - 48 saat) MDA değeri tüm diğer grupların MDA değerlerinden yüksekti ( $p < 0,05$ ; Grafik 2C).

**NO :** Gruplar arasında fark yoktu ( $p > 0,05$ ; Grafik 2D).

**IL- 4:** Grup II'nin (PH + SF - 24 saat) IL- 4 değeri tüm diğer grupların IL- 4 değerlerinden yüksekti ( $p < 0,05$ ; Grafik 3A).

**IL- 6:** Grup III'ün (PH + SF + SF - 48 saat) IL- 6 değeri tüm diğer grupların IL- 6 değerlerine göre en düşüktü. Ayrıca grup V'in (PH + İnfliximab - 24 saat) IL- 6 değeri diğer tüm grupların IL- 6 değerlerinden yüksekti ( $p < 0,05$ ; Grafik 3B).

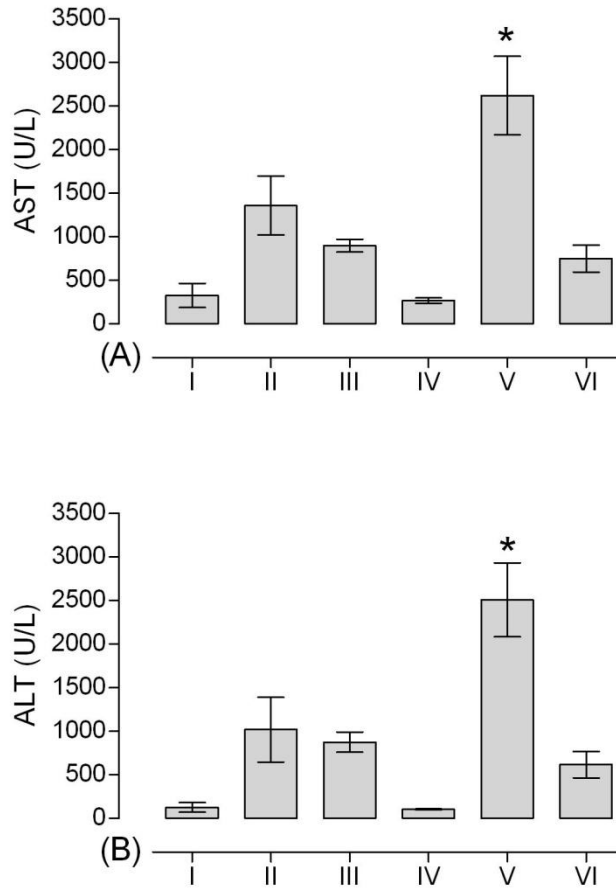
### 1.2. Histopatolojik Değerlendirme

BrdU ile izlenen rejenerasyon oranı; grup IV'ün (Laparotomi + infliximab - 48 saat), grup V'in (PH + infliximab - 24 saat), grup VI'nın (PH + infliximab + infliximab - 48 saat) değerleri SF verilen tüm kontrol gruplarına oranla belirgin olarak daha yüksekti. Ayrıca grup IV'ün (Laparotomi + infliximab - 48 saat) BrdU değeri tüm grupların BrdU değerlerinden yüksekti ( $p < 0,05$ ; Grafik 4).

### 1.3. Rejenerasyon Volümü (%)

Rezeksiyon yapılan gruplarda ağırlık hesaplamaları ile ortaya çıkarılan volümetrik rejenerasyon oranları arasında gruplar arasında fark saptanmadı ( $p>0,05$ ; Grafik 5).

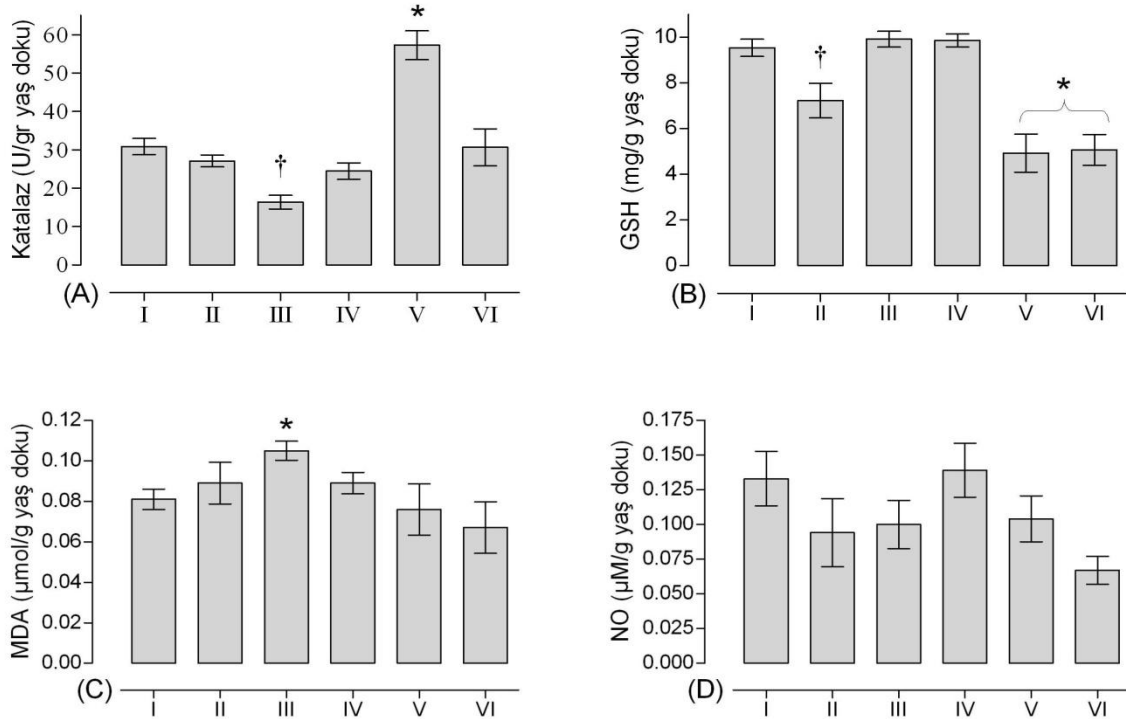
**Grafik- 1:** \* V. grubun AST (A) ve ALT (B) değerleri yüksekti ( $p<0,05$ ).



**Veri tablosu- 4:** Grupların AST, ALT (U/L) değerleri

	I	II	III	IV	V	VI
<b>AST</b>	326,90±139,5	1357,50±339,1	897,60±72,4	266,50±31,2	2620±449,4	748,80±154,4
<b>ALT</b>	124,50±54,4	1017,90±371,6	874,40±114,8	101,60±5,7	2507,70±424,3	616,20±149,6

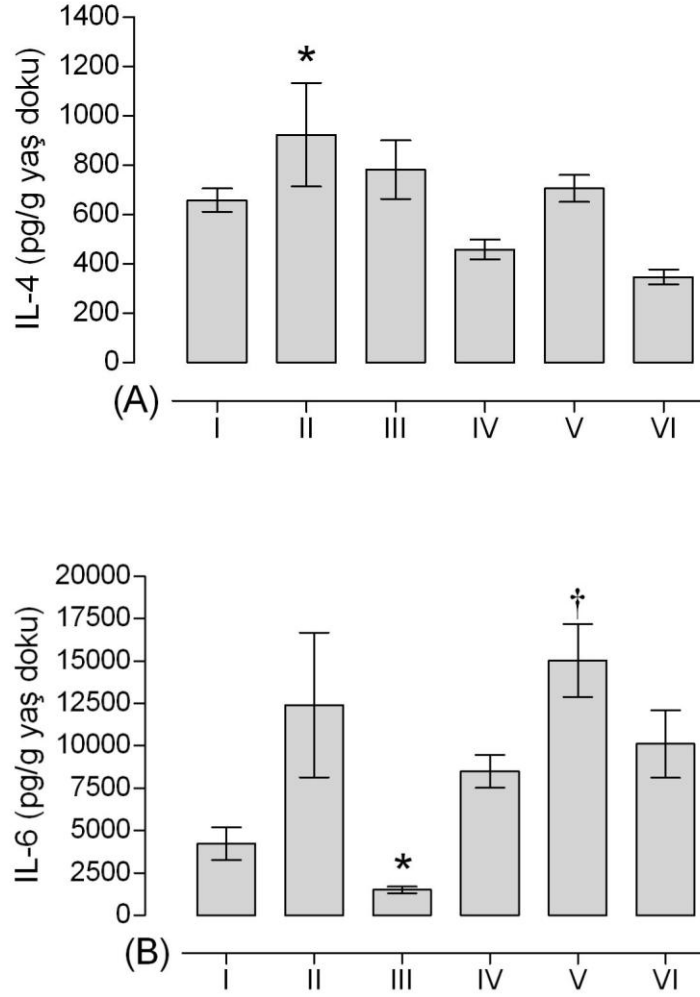
**Grafik- 2:** (A) \* V. grubun katalaz değeri diğer gruplara oranla yüksekti. † III. grubun katalaz değerleri I., V. ve VI. gruplardan düşüktü. (B) \* V. ve VI. grupların GSH değerleri I., III. ve IV. gruplardan düşüktü. † II. grubun GSH değerleri III. ve IV. gruptan azdı. (C) \* III. grubun MDA değeri VI. gruptan yüksekti. (D) NO<sup>•</sup> değerleri incelendiğinde gruplar arasında fark yoktu.



**Veri tablosu- 5:** Katalaz (U/gr yaş doku), GSH (mg/g yaş doku), MDA (nmol/g yaş doku), NO<sup>•</sup> (nmol/g yaş doku)

	I	II	III	IV	V	VI
<b>Katalaz</b>	30,83±2,1	27,12±1,5	16,35±1,7	24,46±2,1	57,25±3,7	30,64±4,8
<b>GSH</b>	9,53±0,3	7,22±0,7	9,91±0,3	9,85±0,2	4,92±0,8	5,06±0,6
<b>MDA</b>	0,08±0,0	0,08±0,0	0,10±0,0	0,08±0,0	0,07±0,0	0,06±0,0
<b>NO<sup>•</sup></b>	0,13±0,0	0,09±0,0	0,10±0,0	0,13±0,0	0,10±0,0	0,06±0,0

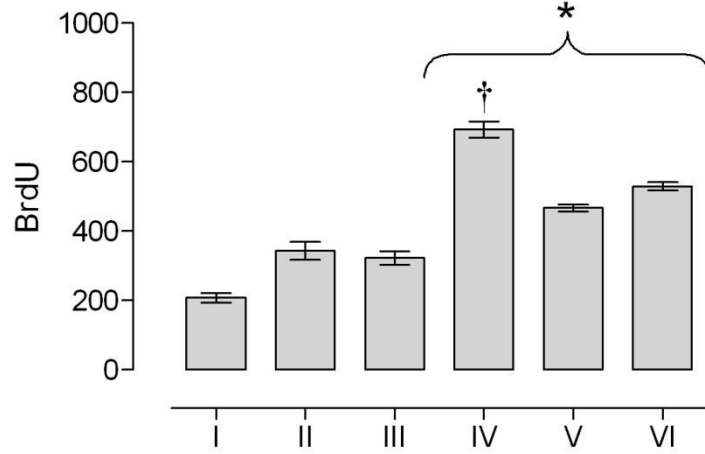
**Grafik- 3:** (A) \* II. grubun IL-4 sonuçları IV. ve VI.gruptan yüksekti. (B) \* III. grubun IL-6 değerleri II. ve V. grupların IL-6 değerlerinden düşük, † V. grubun IL-6 değeri I. gruptan yüksekti.



**Veri tablosu- 6:** IL-4, IL-6 (pg/g yaş doku)

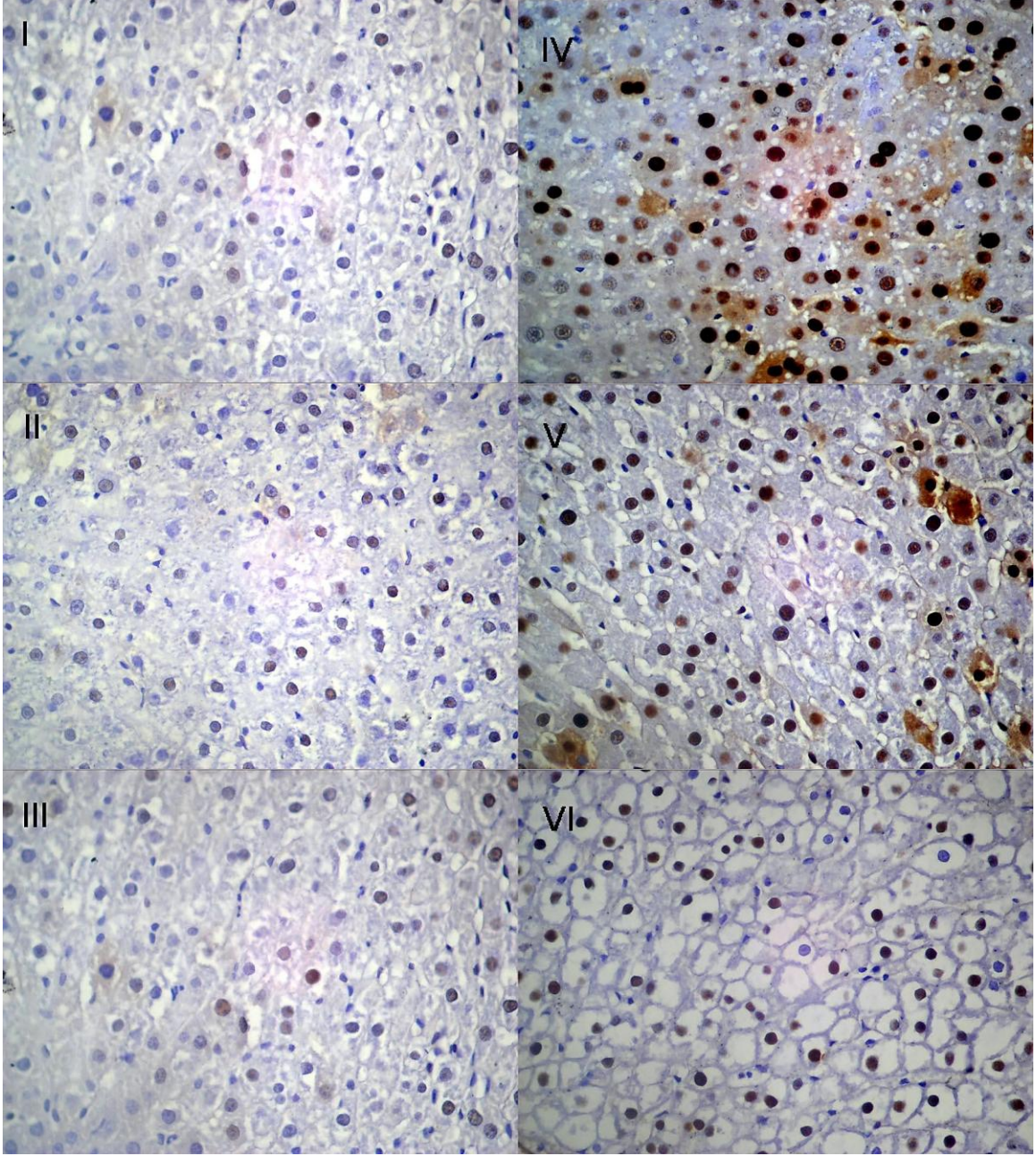
	I	II	III	IV	V	VI
<b>IL-4</b>	658,45±46,8	923,30±210,0	781,71±118,3	458,37±39,5	705,80±54,4	347,22±30,4
<b>IL-6</b>	4233,33±964,8	12406,66±4264,6	1500±191,6	8500±980,0	15033,33±2148,6	10113,33±1988,7

**Grafik- 4:** \* IV., V. ve VI. grubun BrdU değerleri diğer gruplardan yüksekti. † Ayrıca; IV. grubun BrdU değeri diğerlerine oranla daha fazlaydı.



**Veri tablosu- 7:** BrdU/50 HPF

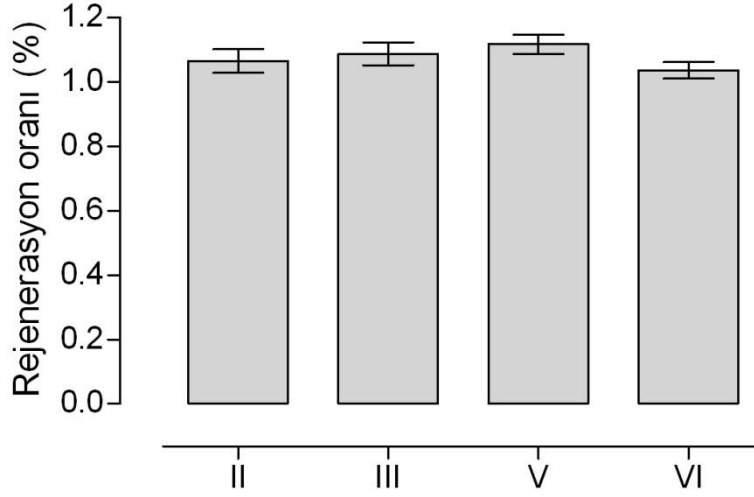
Denek no. / Grup	I	II	III	IV	V	VI
1	150	300	280	600	400	500
2	200	180	200	700	470	480
3	250	420	380	630	450	530
4	140	450	380	650	460	490
5	260	370	400	750	470	550
6	210	260	300	680	480	540
7	220	380	290	640	450	500
8	180	320	300	730	510	530
9	200	340	330	700	500	570
10	270	410	370	850	480	600
<b>Ortalama±SE</b>	208±13,8	343±25,7	323±19,3	693±22,8	467±9,6	529±11,9



**Resim- 4:** Tüm gruplarda, hepatositlerde BRDU ile nükleer pozitif boyanma gösteren hücrelere örnekler ( anti-BRDU), 1- I. grup (x200), 2- II.grup (x200), 3- III.grup (x200), 4- IV. grup (x200), 5- V. grup (x200), 6- VI. grup (x200)



**Grafik- 5:** Volümetrik rejenerasyon oranları açısından gruplar arasında fark yoktu.



**Veri tablosu- 8:** Rejenerasyon oranları (%)

Denek no. / Grup	II	III	V	VI
1	0,9756	1,0155	1,0155	1,0325
2	1,0912	1,0980	1,2088	0,8770
3	1,1420	1,1952	1,1746	1,0991
4	1,0470	1,1520	1,0991	1,1405
5	0,9790	1,0915	1,2088	0,9900
6	1,3360	1,2085	1,0750	1,0840
7	1,1116	0,9175	1,2305	0,9900
8	0,9382	0,9577	0,9730	1,0711
9	1,0300	0,9985	1,0130	1,1204
10	0,9875	1,2255	1,1671	0,9560
<b>Ortalama±SE</b>	<b>1,0638±0,03670</b>	<b>1,0856±0,03492</b>	<b>1,1165±0,02972</b>	<b>1,0361±0,02614</b>

## TARTIŞMA

Bir organın parçasının eksilmesi veya hasar görmesinden sonra doku kütlesini yeniden tamamlayabilme yeteneğinin varlığı rejenerasyon olarak tanımlanmıştır(3). Karaciğer, sahip olduğu rejenerasyon kapasitesi ile diğer organlardan ayrı bir özellik sergiler. Rejenerasyon, içerisinde proinflamatuvar sitokinlerin, hormonların, transkripsiyon faktörlerinin ve oksidatif stres ürünlerinin rol oynadığı komplike bir süreçtir(4).

Karaciğer rezeksiyonları günümüzde sık uygulanan cerrahi prosedürlerdendir. En sık uygulanım alanı gastrointestinal sisteme ait tümörlerin karaciğer metastazları, kist hidatik olup, travmada ve karaciğer nakillerinde kaçınılmaz hale gelen bir cerrahi tedavi seçeneğidir(4). Karaciğer rejenerasyonundaki düzenleyici mekanizmaları, meydana gelen mikro ve makro çevre değişiklikleri ve bunların birbirleriyle ilişkilerini tam olarak bilmemekteyiz. Kesin olarak bildiğimiz karaciğerin rejenerasyona ne zaman başlayacağını ve ne zaman duracağını bildiğidir(3). Karaciğer dokusunun kaybı rejenerasyonu başlatmaktadır(9). Büyümenin durmasını sağlayan hassas nokta ise vücut kütlesi ile karaciğer kütlesi arasındaki ilişkidir. Karaciğer, vücudun fonksiyonel ihtiyaçlarını karşılayacak, metabolizmayı gerçekleştirecek büyüklüğe erişince büyüme durmaktadır(33, 34, 35). İlginç olarak transplantasyon sonrası alıcıya göre büyük bir karaciğer dokusu nakli yapıldığında optimal karaciğer/vücut kütle oranı sağlanana dek karaciğer kütlesi azalmaktadır. Karaciğerin önemli doku kayıplarında hücreler arası etkileşim ve karmaşık bir medyatör ağı sayesinde kendisini onarabilme yeteneğine sahip olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur(37, 65). Karaciğer rejenerasyonu ile ilgili çalışmaların çoğunda deney hayvanlarında önceden var olan hasarlı karaciğer üzerinde çalışılmış ya da kimyasal maddeler kullanılarak veya parsiyel hepatektomi yapılarak karaciğerde hasar oluşturulmuştur. Sıçanlarda her bir karaciğer lobunun tüm karaciğer loblarının toplam kütlesine oranlarını belirterek parsiyel hepatektomi çalışmalarında kullanılan modeli açıklamışlardır(64). Toplam karaciğer kütlesine göre sağ lob %38, sol lob %30, kuyruk lobu %8 ve iki parçalı olan quadrat (dörtgen) lob ise %10 oranında bir kütleyi içermektedir. Sıçanlarda yapılan parsiyel hepatektomi araştırmalarına en uygun model olarak karaciğerin %68–70' lik bir kısmının rezeke edilmesi olduğu belirtilmiştir(58).

Karaciğerdeki farklı pro ve anti-inflamatuvar sitokinlerin arttırdığı inflamatuvar süreç sonucunda birçok akut ve kronik karaciğer hastalığı, fibrozis ve siroz gelişimi ile

sonuçlanmaktadır. Bu hastalıkların tedavisinde anti-TNF ilaçların (İnfliximab, Eternecept) kullanımının denenmesini akla getirmektedir. İnflamatuar sitokinler akut ve kronik karaciğer hastalıklarında önemli rol oynamaktadır. Bunların pro-inflamatuar ajanlar ( $TNF_{\alpha}$  antagonisti) ve anti-inflamatuar sitokinler (IL- 10, adiponektin) ile inhibisyonu bu gibi hastalıkların tedavisinde yeni bir gelişim olabilir(17). Günümüzde anti-TNF $_{\alpha}$  ilaçlarının kullanımında klinik endikasyonları genişletmeye yönelik çalışmalar hızla devam etmektedir.

Anti-TNF $_{\alpha}$  monoklonal antikolarları (infiximab, adalimumab) ve solubl TNF reseptörleri (etanersept, onersept ve lenersept) hem solubl hem de membrana bağlı TNF'leri bağlamaları ve böylece onların fonksiyonlarını bloke etmelerine karşın etki mekanizmaları açısından aralarında önemli farklar olduğu gösterilmiştir. Örneğin, anti-TNF $_{\alpha}$  monoklonal antikolar sadece TNF $_{\alpha}$ 'yı bağladığı için TNF $_{\alpha}$  ve ona bağlı sitokinlerin aktivitelerini baskırlar. Solubl reseptörler ise TNF $_{\alpha}$ 'nın yanı sıra makrofajlar ve T hücrelerinden salgılanan lenfotoksin  $\alpha$  (LT  $\alpha$ ) veya eski adıyla TNF $_{\beta}$ 'yı da bağlarlar. Diğer bir fark, anti-TNF monoklonal antikolar TNF $_{\alpha}$ 'nın hem TNFR $_1$  (55 kDa; p55) hem de TNFR $_2$  (75 kDa; p75) reseptörüne bağlanmasını önleyerek her iki reseptöründe fonksiyonunu bloke etmektedir. Solubl reseptörler ise sadece bir reseptörün özelliklerine sahip olacak şekilde üretilmektedir (etanersept TNF p75, lenersept ise TNF p55 reseptörü gibi). Olasılıkla bu iki reseptörün immün sistemdeki fonksiyonları farklıdır. Diğer önemli bir unsurda, bu ilaçların membrana bağlı TNF'lere bağlanmada ve buna bağlı gelişen reaksiyonlarda farklılıklar olmasıdır. Hücre dışı mesafede olan bir TNF $_{\alpha}$ 'nın soluble reseptör veya monoklonal antikolar ile bağlanması için affinitenin, IgG tipinin, soluble reseptörlerin p75 veya p55 olmasının önemi yoktur. Membrana bağlı TNF $_{\alpha}$  ile bağlanma ise farklıdır. Membrana bağlı TNF $_{\alpha}$  tam olarak aktif formda bir sitokindir. Prokürsör TNF $_{\alpha}$ , metalloproteaz "*TNF $_{\alpha}$  Converting Enzyme (TACE)*" tarafından parçalanır ve TNF $_{\alpha}$  olarak ortama salınır. TACE makrofaj ve dentritik hücrelerde eksprese olan bir enzimdir ve çok çeşitli mekanizmalarla aktive olmaktadır. T lenfositlerinde ise TACE aktivasyonu etkin değildir. Bu nedenle T hücrelerinde sentez edilen TNF $_{\alpha}$ ' lar membrana bağlı olarak kalır. Makrofajlarda sentez edilenler ise TACE ile parçalanarak ortama salınırlar. Genel olarak CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin membran TNF $_{\alpha}$  eksprese ettikleri, makrofaj ve dentritik hücrelerin ise TNF $_{\alpha}$ 'yı sekrete ettikleri bilinmektedir. TNF $_{\alpha}$ 'nın aktif hale gelmesi için trimerik yapı oluşturması gerekir. Yapılan çalışmalarda, membran TNF $_{\alpha}$ 'larında trimerik yapı oluşturduğu ve bu nedenle membrana bağlı TNF $_{\alpha}$ 'larda aktif formda oldukları gösterilmiştir(83). Membran TNF $_{\alpha}$  hücre-hücre iletişimde önemlidir.

Sitokinele bağılı otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde hücre dışı boşlukta yer alan soluble sitokinden daha çok hücre-hücre arası iletişim ile aktivasyona sebep olan membran sitokinlerinin daha önemli olduğu düşünölmektedir. Bu nedenle bir hastalığın anti-TNF $\alpha$  ilaçlar ile etkin tedavisi için membran TNF $\alpha$  aktivitesinde baskılanması gereklidir. Solubl ve membran TNF $\alpha$ 'larının TNFR $_2$  reseptörüne ve dimerik yapıdaki solubl TNF reseptörü etanersept'e bağlanması hızlı ve reversibldir. Monoklonal antikör olan infliksimab ise membran TNF $\alpha$ 'ları ile daha stabil bir kompleks oluşturmaktadır(84). Ayrıca daha yüksek afinite ile daha çok sayıda infliksimab molekölü membran TNF $\alpha$ 'larını bağlamaktadır. Bu nedenle membran TNF $\alpha$ 'larının etanersept ile bağlanması infliksimab'a göre daha düşük afiniteli, reversibl ve buna bağılı olarak biyolojik aktivite inhibisyonu daha azdır(85).

Parsiyel hepatektomi sonrası geride kalan karaciğer dokusunda rejenerasyonun ilk günden itibaren başladığı gösterilmiştir(11). Karaciğerin 2/3'nin kaybından sonra iki hafta içinde fonksiyonel karaciğer iyileşmesi tamamlanmaktadır(12). 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 dört ile beş haftada tamamlanır. Eksize edilen loblar aynen eski şekillerini almazlar. Rejenerasyon daha çok yeni lobüller oluşması ve artık lobüllerin genişlemesi şeklinde olur(37, 38). 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. Araştırmalarda hücre zarının geçirgenliğindeki değışimlerin, hücrelerin sentezleme faaliyetlerinin ve hücrelerde meydana gelebilecek nekroz gibi çoğu hasarın göstergesi olarak karaciğerdeki aspartat transaminaz (AST), alanin transaminaz (ALT) gibi enzimlerin plazmadaki miktarlarının önemi bildirilmiştir(126). Oksidatif stres çalışmalarında antioksidan olarak glutatyon (GSH), katalaz (CAT) , lipid peroksidasyonunun derecesinin belirlenmesinde malondialdehit (MDA), nonspesifik konak savunma sisteminin önemli bir parçası olan NO değerlerinin belirlenmesi, bununla birlikte karaciğer rejenerasyonunda önemli rol oynayan IL-4 ve IL-6 sitokinleri(127) ile hepatositlerin bölünerek çoğalmalarına ilişkin indekslerin çıkarılması karaciğerde rejenerasyonun durumu hakkında bilgi verebilmektedir(60).

Çalışmamızda sıçanlar üzerinde oluşturduğumuz %70'lik hepatik rezeksiyon modelinde Anti-TNF $\alpha$  monoklonal antikoru olan infliximab'ın hepatik rejenerasyon süreci üzerine etkilerini inceledik. Rejenerasyon sırasında hepatosit fonksiyonlarının

değerlendirilmesi amacıyla bazı karaciğer enzimlerinin serum seviyeleri ölçülmüştür. Tüm gruplarda yapılan %70 hepatektomi ALT ve AST düzeylerinin yüksek olmasında etken olmuştur. Grup II (PH + SF – 24 saat) ile grup V'in (PH + infliximab – 24 saat) AST ve ALT değerleri diğer grupların AST ve ALT değerlerinden yüksekti, aynı zamanda grup III (PH + SF + SF – 48 saat) ile grup VI'nın (PH + İnfliximab + infliximab – 48 saat) AST ve ALT değerlerinde azalma hepatektomi ile başlayan karaciğer hasarlanmasının zaman içerisinde düzelmesi olarak yorumlanabilir. Grup I (Laparotomi + SF – 48 saat) ile grup IV'ün (Laparotomi + İnfliximab – 48 saat) AST ve ALT değerleri en düşük düzeylerde kalmıştır. Hou, ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada %70'lik parsiyel hepatektomi sonrasında belirli aralıklarla sıçanların tüm karaciğeri alınıp karaciğerdeki ağırlık artışı tespit edilerek iyileşmeye bakılmıştır. Bunun yanında karaciğer enzimlerinin serum seviyelerine bakılarak hepatositlerin fonksiyonel durumları tespit edilmiştir. Sonuçta, parsiyel hepatektomi yapılmış olan kontrol gruplarında AST ve ALT serum seviyeleri başlangıçta yüksek iken 72. saatte normal değerlerine gelmiş ve karaciğerde iyileşme olduğu görülmüştür(65). %70 parsiyel hepatektomiden 14 gün sonra %30 oranında karaciğer rezeksiyonu ile ikinci bir parsiyel hepatektominin yapıldığı bir çalışmada da serum AST ve ALT seviyelerinin 72 saat sonra normal düzeye geldiği bildirilmiştir (91). Sıçanlarda %70 parsiyel hepatektomi yanında %50 pankreatektomi yapan Furuta, ve ark. ise araştırmalarında AST ve ALT serum seviyelerinin 72. saatte normal değere düştüğünü göstermişlerdir(128). Li, ve ark. parsiyel hepatektomiden sonraki 72. saatte serum ALT seviyesinin kontrol hayvanları ile aynı olduğunu saptamışlardır(129). Hepatositlerde oluşabilecek fonksiyon bozukluğunun genel olarak AST ve ALT enzimlerinin serumda artmasına göre değerlendirilebileceği de bildirilmiştir(91). Bu bilgiler ve araştırmalar doğrultusunda yaptığımız çalışmada enzim seviyelerinde görmüş olduğumuz düzelleme sonucunda hepatositlerde fonksiyonel olarak bir iyileşmenin olduğunu düşünmekteyiz.

Karaciğer doku örneklerinde ise lipid peroksidasyon (MDA) ve antioksidan (CAT, GSH) aktiviteleri incelenmiştir. GSH ve MDA düzeylerine bakıldığında infliximab verilen hepatektomili gruplarda anlamlı bir düşüklük olduğu izlenmiştir. Buna ek olarak; antioksidan aktivitede (CAT) yine anlamlı ve belirgin bir artış tespit edildi. Parsiyel hepatektomiden kısa bir süre önce verilen antioksidan maddelerin SOR'ni toplayarak karaciğerde lipid peroksidasyonunu engellediği ve karaciğer rejenerasyonunu iyi yönde etkilediği bildirilmiştir(130). Bu bilgiler ışığında, infliximab uygulamasının teorik olarak karaciğerdeki

lipid peroksidasyon sürecini etkilemenin yanında serbest oksijen radikallerine yönelik fizyolojik yanıtı da regüle ettiğini fark etmekteyiz. Spekülasyonumuzun temel dayanağı infliximab verilen parsiyel hepatektomili 24 saat grubunda ortaya çıkan belirgin katalaz yüksekliğidir. Ayrıca prognostik özelliği olduğu bilinen IL- 6'da bu grupta en yüksek noktaya ulaşmış ve daha sonra (48. saatte) dengelenmiştir. Bu yanıtı infliximab kullanımından çok rezeksiyonun tetiklediği sürece bağlamaktayız. Çünkü; rezeksiyon yapılmayan laparotomi gruplarında katalaz değerleri arasında fark yoktu. Benzer şekilde sitokin yanıtta (IL- 4 ve IL- 6) rezeksiyon yapılmayan gruplar arasında fark yoktu. İnfliximab kullanımını diğer bir bakış açısıyla, karaciğer hasarı yönünden incelediğimizde de kontrol grubuna ve hatta diğer SF verilen parsiyel hepatektomili 24 ve 48 saat gruplarına oranla daha belirgin bir hasar oluşmadığını gözlemekteyiz (AST, ALT düzeyleri değerlendirilerek). Ancak; grup V'in (PH + infliximab – 24 saat) karaciğer doku hasarının ilk 24 saatte üst noktaya ulaştığı ve bu sürecin 48. saatte dengelendiği gözlenmektedir. Bu durum karaciğer rejenerasyonu sırasında ortaya çıkan sitokin yanıtı, lipid peroksidasyonu ve hepatosit proliferasyonu arasındaki karmaşık etkileşimin infliximab tarafından etkilendiğinin kanıtıdır.

NO<sup>•</sup> için ise süreci daha farklı inceleme zorunluluğu vardır. Hepatosit proliferasyonunda paradoksik etkileri olduğu bilinen ve çelişkili etkileri tartışılan NO<sup>•</sup>, zararlı etkilerinin yanında rejenerasyon sürecinin en önemli basamaklarını da regüle etmektedir. Shoen ve ark. yaptıkları çalışmada remnant karaciğerdeki artmış vasküler akımın NO<sup>•</sup> aracılığıyla hepatosit proliferasyonunu tetiklediği anlaşılmıştır(131). Bununla birlikte NO<sup>•</sup> bilinen en güçlü serbest radikallerden biri olup hücre membran hasarına da yol açtığı tartışmaya açık olmayan bir şekilde bilinmektedir(132). Daha önce yaptığımız bir çalışmada da NO<sup>•</sup>' in inhibisyonu ile rejenerasyona olumlu ve olumsuz birçok faktörün eklendiğini izledik(123). Bu nedenle çalışmamızdaki grupların NO<sup>•</sup> düzeyleri arasında fark olmaması NO<sup>•</sup>' in suprafizyolojik etkilerinden ve inhibisyondan kaynaklanabilecek çelişkili durumlardan uzakta olduğumuzu göstermektedir. Yine de; çalışmamızda serbest NO<sup>•</sup> düzeyini değil, nitrat ve nitrit parametrelerini incelediğimizi hatırlayarak ölçülü çıkarımlar yapmak zorundayız.

Tüm aerobik canlılar metabolizmaları sırasında fizyolojik olarak oksidatif strese maruz kalırlar. Vücutta oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> gibi serbest radikaller daha toksik metabolitlere

dönüşerek özellikle DNA, lipidler ve proteinler gibi hedeflere saldırırlar ve metabolik olayları bozarlar(133). Ancak organizma bu reaktif ajanları nötralize edebilen birçok savunma mekanizmasına sahiptir. 'Antioksidan savunma sistemi' adı verilen bu sistemin en önemli komponenti glutatyondur. Glutasyon serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreyi oksidatif hasara karşı korumaktadır. Karaciğer İ/R hasarı boyunca hepatik GSH konsantrasyonunun hızla azaldığı gösterilmiştir. Bu durum GSH'un reaktif oksijen moleküllerinin nötralize edilmesi için kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Birçok çalışmada eksojen verilen GSH'un hücre içi GSH seviyelerini artırdığı ve oksidatif hasarı engellediği gösterilmiştir. Glutasyon oksidatif yaralanmalarda majör koruyucu etkilidir(134).

Yukarıda da anımsatıldığı gibi GSH eskiden beri bilinen antioksidan özellikli yanıt parametresi olmasına rağmen deneysel modellerde geçerliliğini hala sürdürmekte olan önemli bir göstergedir(135). İlginç biçimde; rezeksiyonsuz laparatomili SF ve infliximab verilen 48 saat kontrol gruplarında GSH düzeyleri anlamlı oranda yüksek bulunmuştur, ama bu yüksekliğin infliximab'dan kaynaklanmadığı görülmektedir. Bu gruplara yapılan sham operasyonunun genel olarak tetiklediği bir sürece bağlı GSH yanıtının ortaya çıktığı düşünülebilir. Rezeksiyon gruplarının GSH sonuçları ise diğer parametreler ile (CAT, MDA, NO) yorumlandığında daha anlamlı değerlendirmelere zemin hazırlamaktadır. Ayrıca kontrol gruplarında, AST ve ALT düzeyleriyle algılanabileceği gibi belirgin bir karaciğer hasarı yoktur. Bu nedenle GSH yüksekliğinin cerrahi prosedürle ilişkisi daha net biçimde yorumlanabilir. Bilindiği gibi GSH, strese ve zamana bağlı olarak düzeyi artan bir parametredir(135). Bu nedenle, grup II (PH + SF – 24 saat) ile grup III'ün (PH + SF + SF – 48 saat) GSH değerlerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı olmasa da dikkat çekicidir. MDA düzeyindeki artış da bu gruplarda GSH ile paralellik göstermektedir. Söz konusu sonuçlar oksidatif strese verilen yanıtın zamana göre biçimlendiğini düşündürmektedir. Rezeksiyon yapılan infliximab gruplarında ise ilgi çekici bir farklılık vardır. Grup V (PH + infliximab – 24 saat) ile grup VI'nın (PH + infliximab + İnfliximab – 48 saat) GSH düzeyleri düşük kalmış, MDA düzeyleri de infliximab verilen gruplara oranla yükselmemiştir. Hatta, infliximab kullanımı sonrası 48. saatte bile GSH değerleri seviyelerini korumuştur. Sonuçlarımız kabaca grup VI'da (PH + infliximab + infliximab – 48 saat) *oksidatif stresin artmadığı* şeklinde yorumlanabilir. Bu yorum genel bir bakış açısını yansıtsa da grup V'in (PH + infliximab – 24 saat) katalaz yüksekliği ile birlikte değerlendirildiğinde anlamlı bir etkiyi düşündürmektedir. Katalaz SOR için çok önemli bir süpürücüdür ve infliximab

kullanımı sonrası ilk 24 saatte çok yüksek değerlere ulaşmıştır. Elbette ki infliximab katalazı tek başına arttırma özelliğine sahip değildir. Ancak; oksidatif stres üzerindeki olumlu etkisi de açıkça görülmektedir.

Proinflamatuvar yanıtın karaciğer rejenerasyonundaki önemi bilinmektedir(136). Sitokin yanıtı rejenerasyonun her aşamasında etkili olmaktadır. Özellikle IL- 6 karaciğer rejenerasyonunda önemli rol oynamaktadır(88). Sıçanlarda parsiyal hepatektomiden 24 saat sonra IL- 6 sitokin seviyelerinde yükselme olduğu ve 48 saat sonra en yüksek seviyeye ulaştığı, 72. saatte ise kontrol grubu hayvanlarında belirlenmiş olan normal seviyeye düştüğü bildirilmiştir(88, 137). Bununla birlikte Scotte, ve ark. karaciğer rejenerasyonu devam ettiği sürece normal olarak IL- 6 üretimi olmadığını ve sadece başlangıçta IL- 6 üretildiğini ifade etmişlerdir(138). Aynı yazarın yapmış olduğu başka bir çalışmada da IL- 6 serum seviyesi parsiyal hepatektomiden sonraki ilk 24 saatte en yüksek değerde iken sonraki saatlerde düşerek normal seviyeye geldiği belirtilmiştir. Görüldüğü gibi aynı grupların çalışmaları arasında bile çelişkiler ortaya çıkabilmektedir. Yine de kupffer hücrelerini etkileyen faktörlerin IL- 6 salınımı ile ilişkisi net olarak bilinmemektedir. Bu konuda Kaya ve ark. yaptığı bir çalışmaya göre parsiyal hepatektomiden sonraki 24- 48 saatler arasında IL- 6 serum seviyesinin en yüksek düzeyine ulaşmaktadır. Aynı araştırmacılar karaciğer kupffer hücrelerindeki IL- 6 varlığını belirlemişler ve IL- 6'nın rejenerasyon için gerekli olduğunu, ancak; fazla miktarda IL- 6'nın büyüme durdurucu onkogenleri uyararak rejenerasyonun bozulmasına neden olabileceğini ifade etmişlerdir(90).

Araştırmacılar karaciğer rejenerasyonunun başlatılmasında IL- 6'nın üretimini uyararak düzenlenmesini sağlayan sitokinin  $TNF_{\alpha}$  olduğunu göstermiştir(3, 63, 89). Çalışmamızda grup V'te (PH + infliximab – 24 saat) IL- 6'nın karaciğer doku seviyesi diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olarak ölçüldü. Bu nedenle IL- 6 serum seviyesinin  $TNF_{\alpha}$  seviyesi ile yakından ilgili olduğunu ve karaciğer rejenerasyonu açısından  $TNF_{\alpha}$  ve IL- 6 sitokinlerinin birlikte değerlendirilebileceğini düşünmek mümkündür. Yukarıda da belirtildiği gibi; IL- 6'nın rejenerasyon sürecine belirgin katkısı vardır ancak hasarlanmanın kontrol altında olduğu (*geriye kalan karaciğer dokusunun kanlanmasının iyi olduğu*) durumlarda etkisini göstermektedir. Tiberio ve ark. tarafından yapılan çok yeni bir çalışmada, özellikle sirotik karaciğer üzerinde yapılan rezeksiyon sonrasında uygulanan IL- 6 tedavisinin rejenerasyonu olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir(139). Bu bakış açısı ile sonuçlarımızı incelediğimizde en yüksek IL- 6 düzeyinin



grup V'te (PH + infliximab – 24 saat), en düşük düzeyin ise grup III'te (PH + SF + SF – 48 saat) olduğunu görüyoruz. İnfliximab'ın olumlu etkisini sitokin yanıtı anlamında düşündürebilecek en etkili sonuçlar bu gruplardakilerdir. Ayrıca; grup VI'da (PH + infliximab+ infliximab – 48 saat) da yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Bunun aksine grup III'ün (PH + SF + SF – 48 saat) IL- 6 değerlerinin grup II'ye (PH + SF – 24 saat) oranla çok düşük olduğunu görmekteyiz. İnfliximab tedavisinin farklı mekanizmalarla IL- 6 düzeyini arttırdığını düşünmekteyiz.

Sağlıklı işleyen bir inflammatuar sürecin ayrılmaz parçası T hücrelerinin sağlıklı aktivasyonudur. Bu süreçte IL- 4'ün T hücreleri arasında bağlantı sağlayıcı rolü olduğu bilinmektedir. Karaciğer hasarlanması sonrası ortaya çıkan rejenerasyon sürecinde de bu durum çok farklı değildir. Ancak; IL- 4 aktivitesinin olumlu ve olumsuz süreçleri bir arada etkilediği de görülebilmektedir. Özellikle karaciğer transplantasyonu sonrasında rejenerasyonun durmasından ve apoptozisin başlamasından sorumlu olan bağımsız faktörlerden birinin de IL- 4 olduğu ortaya çıkmıştır (140). Benzer şekilde; kadavradan yapılan karaciğer transplantasyonundan sonraki akut allograft rejeksiyonu sürecinde de *–büyük olasılıkla T hücresi aktivasyonuna bağlı olarak –* IL- 4 ekspresyonunda artış olduğu bildirilmektedir(141).

Çalışmamızda IL- 4 düzeylerindeki farklılıkların, infliximab kullanımının en azından rejenerasyonun erken döneminde sitokin yanıtını dengelemesine bağlı olduğunu söyleyebiliriz. Bu yaklaşımımızın temel dayanağı infliximab verilen ve verilmeyen parsiyel hepatektomili 24 saat grupları arasındaki farktır. Grup V'in (PH + İnfliximab – 24 saat) IL- 4 değerleri hafif yükselmekle birlikte diğer gruplara oranla fark anlamlı değildir. Grup II'de (PH + SF – 24 saat) ise en yüksek değerler ile karşılaşmaktayız. Yine de; bu farkın karaciğer hasarını etkileyecek düzeyde olduğunu söylemek güçtür, çünkü bu grubun karaciğer fonksiyon testlerinde ve oksidatif stres parametrelerinde belirgin artış olmamıştır. IL- 4'ün oksidatif stresi dengeleyici rolü olduğu bilinmektedir ve bu da süreci etkilemiş olabilir(142).

Parsiyel hepatektomi ile oluşturulan hasarlarda alınan karaciğer kütlesi ile hepatektomiden belirli bir zaman sonra alınan tüm karaciğerin kütleleri değerlendirilerek karaciğer rejenerasyon oranları hesaplanabilmektedir(5, 117). Li, ve ark. sıçanlarda 2/3 parsiyel hepatektomiden 48 saat sonra kalan karaciğer ağırlıklarının iki katına çıktığını ve 7–10 gün içinde de tam ağırlığa ulaştığını bildirmişlerdir(129). Yapmış olduğumuz çalışmada parsiyel hepatektomiden 24. ve 48. saatte rejenerasyon olan karaciğer ağırlıkları arasında gruplar

arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Tang, ve ark. araştırmalarında %68 parsiyal hepatektomiden 24, 48, 72 saat ve 8 gün sonra rejenerasyon oranlarını tespit ederek bu oranın zamana göre yükseldiği sonucuna ulaşmışlardır(5). Çalışmamızda gruplar arası rejenerasyon oranlarında anlamlı bir artışın saptanamamasının, çalışma süresinin 48. saatte sonlandırılmasına bağlı olduğu görüşünderiz. Ancak; hücre proliferasyonu anlamında yaptığımız incelemede cesaret verici sonuçlar ortaya çıkmıştır. Dokuların histopatolojik incelemesinde kullanılan bromodeoksiuridin maddesi, mitotik hücrelerin deoksiribonükleikasit'ine katılarak bölünen ve daha sonra bölünmeye devam eden hücreleri işaretlemek için kullanılmaktadır. Bu nedenle, BrdU hepatosit proliferasyonunun ve dolayısıyla karaciğer rejenerasyonunun monitorizasyonu için en değerli parametrelerden biridir(143). Çalışmamızda; BrdU ile izlenen rejenerasyon oranları infliximab verildikten sonra hem sadece laparotomi yapılan hem de parsiyel hepatektomi uygulanan tüm gruplarda yüksekti. İlginç bir nokta da, sadece infliximab verilen grupta bile *-hasar olmaksızın-* proliferasyonun tetiklendiğinin gözlenmesidir. Bu grupta hücresel düzeyde hasarın ortaya çıktığını düşündüren bir parametre de yoktur(bkz. düşük AST ve ALT değerleri). Ancak, özellikle GSH değerleri rezeksiyon yapılan gruplarla paralel olarak yükselmiş ve karaciğerdeki bazı fizyolojik mekanizmaların tetiklendiğini göstermiştir. Bundan dolayı bu gruptaki BrdU yüksekliğini hasarsız ve iyi kanlanan bir karaciğerde ortaya çıktığı için doğal karşılıyor ve çalışmamızın temel hipotezinde yer almadığı için, rezeksiyon grupları ile birlikte değerlendirilmemesi gerektiğini düşünüyoruz.

Rezeksiyon gruplarında ise durum farklıdır. İnfliximab verilen parsiyel hepatektomili 24 ve 48 saat gruplarının BrdU değerleri verilmeyenlere oranla yüksektir. İnfliximab'ın en net etkisi bu iki grup üzerinde görülmektedir. Özellikle sitokin yanıtı (IL- 6 düzeyleri) ve oksidatif stres parametreleri ile birlikte değerlendirdiğimizde infliximab kullanımının karaciğer rejenerasyonunu ilk 48 saatte olumlu yönde etkilediğini görüyoruz. Bilindiği gibi deneysel modellerde rejenerasyonun volumetriye yansımaları için geçmesi gereken süre 8 güne kadar uzamaktadır(5). Bu nedenle; infliximab'ın süreci doğru yolda tutmak için yararlı bir tedavi olduğunu, en azından ilk 48 saat için, söyleyebilmekle birlikte ilerleyen safhalardaki etkisi için yorum yapmamızın doğru olmayacağı kanısını taşıyoruz. Çalışmamızdaki verileri genel olarak değerlendirdiğimizde, infliximab tedavisinin karaciğer rejenerasyonunda yeni ve umut verici bir kullanım alanı bulabileceğini düşünmekteyiz.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, deneysel karaciğer rezeksiyon modelinde elimizdeki; hücre hasarı, sitokin yanıtı, oksidatif stres ve histopatolojik değerlendirme parametrelerine baktığımızda infliximab tedavisinin erken dönemde rejenerasyona olumlu katkılarının olduğu görüşünderiz.

Bu görüşümüzü desteklemek amacıyla ve güncel tedavide kullanıma geçiş süreci için daha ayrıntılı deneysel ve klinik çalışmaların yapılmasına gereksinim vardır.

## ANTI-TNF $\alpha$ MONOKLONAL ANTİKOR TEDAVİSİNİN KARACİĞER REZEKSİYONU SONRASI REJENERASYON SÜRECİNE ETKİSİ

### ÖZET

**Amaç:** Ratlarda, Anti-TNF $\alpha$  monoklonal antikorunu (Infliximab) kullanımının hepatic rezeksiyon modelinde karaciğer rejenerasyonuna erken dönemde etkilerini araştırmak.

**Materyal ve Metot:** Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Deneysel Cerrahi Laboratuvarı'nda 2008 Ocak-Şubat tarihleri arasında Üniversite Yerel Hayvan Etik Kurulu onayı alınarak yapıldı. Çalışmada ağırlığı 174–270 gram arasında değişen, 60 adet erkek Wistar-Albino rat kullanıldı. Ratlar, kontrol (n= 30) ve infliximab (n= 30) grubu olmak üzere iki ana gruba eşit olarak ayrıldı. Daha sonra her biri kendi içerisinde; laparotomi grubu (n= 10), karaciğer rezeksiyonundan 24 saat sonra sakrifiye edilen grup (n= 10), karaciğer rezeksiyonundan 48 saat sonra sakrifiye edilen grup (n= 10) olmak üzere 3 alt gruba ayrıldı. Laparotomi ve %70'lik karaciğer rezeksiyonu sonrası 24 ve 48. saatte çalışma grubundakilere intraperitoneal infliximab, kontrol gruplarına ise intraperitoneal 3 cc % 0,9 NaCl enjeksiyonu yapıldı. Rezeke edilen yaş karaciğer ağırlıkları tartılarak kaydedildi. Ratlar 24 ve 48 saat sonunda vena kava inferiorundan kan örnekleri alındıktan sonra sakrifiye edilerek kalan karaciğer dokusu çıkartılarak tartıldı. Alınan kan örneklerinden aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz ölçümleri yapıldı. Alınan doku örneklerinden katalaz, interlökin 6, interlökin 4, nitrik oksit, malondialdehid, total glutatyon ölçümleri yapıldı. Morfolojik rejenerasyon parametresi olarak rölatif karaciğer ağırlığı kullanıldı. Histopatolojik değerlendirme ise bromodeoxyuridine işaretleme ile yapıldı.

**Bulgular:** 24. ve 48. saatler sonunda infliximab verilen ve kontrol grupları arasında rölatif karaciğer ağırlığı ve nitrik oksit değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı (p>0.05). Aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz, katalaz, malondialdehid, glutatyon, interlökin 4 ve interlökin 6 parametrelerinde gruplar arasında 24 ve 48. saatte istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (p<0.05). Ayrıca 24 ve 48. saatlerde bromodeoxyuridine ile işaretleme oranları tüm infliximab verilen gruplarda kontrol gruplarına göre yüksek olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05).

**Sonuç:** Anti-TNF $\alpha$  monoklonal antikorunu olan infliximab, karaciğer rezeksiyonu sonrasında gerek histolojik gerekse fonksiyonel olarak karaciğer rejenerasyonunu arttırmaktadır. Yapılacak ileri çalışmalarla infliximab'ın klinik uygulamada kullanımını düşünebilir.

**Anahtar kelimeler:** Anti-TNF $\alpha$  monoklonal antikorunu, infliximab, karaciğer rejenerasyonu.

## THE EFFECT OF ANTI-TNF $\alpha$ MONOCLONAL ANTIBODY THERAPY ON REGENERATION PROCESS AFTER LIVER RESECTION

### ABSTRACT

**Aim:** To assess the effect of infliximab, anti-TNF $\alpha$  monoclonal antibody, on the early period of liver regeneration in experimentally hepatectomized rats.

**Materials and Method:** This experimental study has been performed in Experimental Surgery Laboratory at Adnan Menderes University Faculty of Veterinary Medicine between January and February 2008. Sixty male Wistar-Albino rats, weighting between 174-270 g were used in the study. Rats were divided into two major groups; control (n= 30) and infliximab (n= 30) groups. Each group divided into three subgroups; laparotomy group (n= 10), hepatic resection and sacrifice after 24 hours group (n= 10), hepatic resection and sacrifice after 48 hours group (n= 10). After laparotomy and %70 liver resection, intraperitoneal infliximab enjection to the study groups and 3 cc 0.9 % NaCl enjection to the control groups has been done. After the liver resection the resected liver tissues were weighted. Rats were sacrificed after the blood samples were collected from vena cava inferior and remaining liver tissues were resected and weighted. Serum aspartate transaminase and alanine transaminase were measured. From the specimens of tissue catalase, interleukin 6, interleukin 4, nitric oxide, malonyldialdehyde, total glutathion were measured. Relative liver weight was used as a morphological parameter for liver regeneration. Histopathologic assessment has been performed to determine bromodeoxyuridine.

**Results:** There were statistically significant differences between infliximab and control groups in aspartate transaminase, alanine transaminase, catalase, malonyldialdehyde, total glutathion, interleukin 4 ve interleukin 6 at 24 and 48 hours (p<0.05). However, there were no statistically significant differences between infliximab and control groups in nitric oxide and relative liver weight parameters at 24 and 48 hours (p>0.05). Bromodeoxyuridine labeling index were significantly higher in infliximab group for each time period (p<0.05).

**Conclusion:** The anti-TNF $\alpha$  monoclonal antibody infliximab, improves both histological and functional liver regeneration after liver resection. With further studies, clinical implementation should be considered.

**Key words:** Anti-TNF $\alpha$  monoclonal antibody, Infliximab, liver regeneration.

## KAYNAKLAR

- 1- Andreoli TE. Liver. In: Fallon MB, McGuire BM, Abrams GA, Arguedas MR (Eds). Cecil Essentials of Medicine 5th Edition. WB Saunders Company 2001; pp 365-398
- 2- Skoyles J.R, Sherry M. Pharmacology, mechanisms of action and uses of selective phosphodiesterase inhibitors. Br J Anaesth 1992; 68: 293-302.
- 3- Fausto N: Liver regeneration. J Hepatol 32: 19-31, 2000
- 4- Bismuth H, Houssin D, Castaing D. Major and minor segmentectomies reglees in liver surgery. World J Surg 1982;6: 10-17
- 5- Tang, T.X. Hashimoto, T., Chao, L.Y., Itoh, K. and Manabe, T., 1997, Effects of partial pancreatectomy on liver regeneration in rats, Journal of Surgical Research 72, 8- 14, p
- 6- Hamanoue M, Kawaida K, Takao S et al. Rapid and marked induction of hepatocyte growth factor during liver regeneration after ischemic or chrush injury. Hepatology 1992; 16:1485-92
- 7- Perek S, Kapan S, Ed: Değerli Ü,Bozfakıoğlu Y. Cerrahi Gastroenteroloji. s.194-208. 5. Basım, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2000
- 8- Nagasue N, Yukaya H, Ogawa Y et al. Human liver regeneration after major hepatic resection. Ann Surg 1987;206:30-9
- 9- Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. Science 276: 60-6, 1997
- 10- LaBrecque DR, Steele G, Fogerty s et al. Purification and physical-chemical characterisation of hepatic stimulator substance. Hepatology 1987;7:100-6.
- 11- Linder RM, Cady B. Hepatic resection. Surg Clin North Am 1980;60: 349-360.
- 12- İwatsuki S, Shaw BW Jr, Starzi TE. Experience with 150 liver resections. Ann Surg 1983;197:247-252
- 13- Tunđer C, Ünal S. Karaciğerin normal ve patolojik fizyolojisi. Sodeman's Pathologic Physiology. Türkçe 1.Baskı. 1992:954-91.
- 14- Moreland LW, Scott SW, Schiff MH, Tindall EA, Fleischmann RM et al. 1997: Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human TNF receptor (p75)-Fc fusion protein. N. Engl. J. Med. 337,141-7.
- 15- Yeğin O, Coşkun M, Ertuğ H. 1997: Cytokines in acute rheumatic fever. Eur. J. Pediatr. 156, 25-9.

- 16-** Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJH, Mayer L, Present DH, et al. 1997: A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to TNF for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 337, 1029-35
- 17-** Galun, E. and Axelrod, J.H., 2002, The role of cytokines in liver failure and regeneration: potential new molecular therapies, *Biochimica et Biophysica Acta* 1592, 345-358, p.
- 18-** Kuran O. *Sistematik Anatomi. Filiz Kitabevi, İstanbul* 1983; ss 429-443.
- 19-** Couinaud C. Liver anatomy: portal (and suprahepatic) or biliary segmentation. *Digest Surg* 1999;16:459-67.
- 20-** Emre A, Kalaycı G. Karaciğerin Cerrahi Anatomisi. *Genel Cerrahi Cilt 2* 2002;1083-1090
- 21-** Townsend MC, Beauchamp RD, Evers BM. Liver. In: Meyers WC, Chan RS (Eds). *Sabiston Textbook of Surgery* 16<sup>th</sup>. WB Saunders Company, Philadelphia 2001; pp 997-1059.
- 22-** Norton JA, Bollinger RR, Chang AE, et al. Liver. In: Hemming A, Gallinger S (Eds). *Surgery, Basic Science and Clinical Evidence*. Springer, San Francisco 2000; pp.585-616.
- 23-** Skandalakis JE, Gray SW, Rowe JS. *Anatomical complications in general surgery*. McGraw-Hill Book Company, New York 1986; pp.103-24.
- 24-** Huguet C, Addario-Chieco P, Gavelli A, et al. Technique of hepatic vascular exclusion for extensive liver resection. *Am J Surg* 1992; 163:602-605.
- 25-** Bismuth H. Surgical anatomy of the liver. In Bengmark S, Blumgart LH (eds) *Liver surgery*. Churchill Livingstone, Edinburgh 1986; pp.1-7.
- 26-** Delattre JF, Avisse C, Flament JB. Anatomic basis of hepatic surgery. *Surg Clin N Am* 2000; 80: 345-362.
- 27-** Dominiononi L, Chiappa A, Cuffari S, Dionigi R. Vascular occlusions during resection of the liver. In: Dionigi R, Madariaga J (eds). *New technologies for liver resections*. Karger Landes Systems Basel 1997; pp. 68-94
- 28-** Jarnagin WR, Fong Y, Blumgart LH, Launois B. Hepatic resection. In: Schein M, Wise L(eds). *Crucial controversies in surgery*. Karger Landes Systems Basel 1997; pp. 201-216.
- 29-** Ratych RE, Smith GW. Anatomy and physiology of the liver. GD Zuidema.(Ed). *Shackelford's Surgery Of The Alimentary Tract*. Fourth ed. Philadelphia: Saunders, 1996: Vol.3;357-73
- 30-** Guyton AC. Liver. In: Guyton AC (Ed.). *Textbook of medical physiology* (7th ed.). WB Saunders, Philadelphia 1986; pp.1203-1208.

- 31-** Kraus-Friedman N. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Physiol. Rev.* 1984;64:170-171.
- 32-** Keppens S, Vandekerckhove A, Moshage H, Yap SH, Aerts R, Wulf HD. Regulation of glycogen phosphorylase activity in isolated human hepatocytes. *Hepatology* 1993; 17: 610-614.
- 33-** Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br. J. Surg* 89: 1089-1095, 2002
- 34-** Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ. Liver regeneration after hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 48:556-62, 2001
- 35-** Fausto N: Hepatic regeneration. Zakim D, Boyer TD (eds). *Hepatology* WB Saunders, Philadelphia 32-58, 1996
- 36-** Ethier C, Kestekian R, Christine B, Dube C et al. Vitamin D depletion retards the normal regeneration process after partial hepatectomy in the rat. *Endocrinology* 1990;126: 2947-2959
- 37-** Higgins G, Anderson R. *Experimental Pathology of The Liver. Experimental Surgery and Pathology* 1931;186-202
- 38-** Bucher RL. *Regeneration of Mammalian Liver. Cancer Commission of Harward University* 1995; 1081
- 39-** Anderson RW, Zieve L, Lindblad S. Ultrastructural Study of Hepatic Regeneration Following One-Lobe, Two-Lobe and Subtotal Hepatectomy in the Rat *Ex Pathol* 1990; 38:61-72
- 40-** Bartel H, Orkisz S, Kmiec B. Ultrastructural of Hepatocyte Regeneration Rat Liver. *Folia Morphol* 1972;XXXVI, 367-72
- 41-** Tuzek HV, and Rabes H. Loss of proliferation capacity of hepatocytes following subtotal hepatectomy. *Experientia* 1971 ;27: 26-530.
- 42-** Eguchi S, Kamlot A, Ljubimova J, et al. Fulminant hepatic failure in rats: Survival and effect on blood chemistry and liver regeneration. *Hepatology* 1996;24:1452-1459.
- 43-** Francavilla A, Zeng Q, Polimeno L. Small-for-size liver transplanted in to larger recipient: a model of hepatic regeneration. *Hepatology* 1994; 19: 210-16.
- 44-** Starzl TE, Porter KA, Francavilla JA, et al. A hundred years of the hepatotrophic controversy. *Ciba Found Symp* 1977;111-129.
- 45-** 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.



- 46-** Diehl AM, Rai R. Review: Regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11:466-470.
- 47-** Holt DR, Thiel DV, Edelstein S, Brems JJ. Hepatic resections. *Arch Surg* 2000;135:1353-1358.
- 48-** Wheatley J, Rosenfield NS, Berger L et al. Liver regeneration in children after major hepatectomy for malignancy. *J Surg Res* 1996;61:183-189.
- 49-** Mars WM, Kim TH, Stolz DB, et al. Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for the initiation of liver regeneration. *Hepatology* 21: 1695-1701, 1995.
- 50-** Laurent S, Otsuka M, De Saeger C, et al. Expression of presumed specific early and late factors associated with liver regeneration in different rat surgical models. *Lab Invest* 81: 1299-1307, 2001
- 51-** Tanaka Y, Mak KM, Lieber CS. Immunohistochemical detection of proliferating lipocytes in regenerating rat liver. *JPathol* 160: 129-134, 1990.
- 52-** Widmann JJ, Fahimi HD. Proliferation of mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells in regenerating rat liver. *Am J Pathol.* 80: 349-366, 1975
- 53-** Zeindl-Eberhart E, Jungblut PR, Otto A, Kerler R, Rabes HM. Further characterization of a rat hepatoma-derived aldose-reductase-like protein--organ distribution and modulation in vitro. *Eur J Biochem.* 1997 Aug 1;247(3):792-800
- 54-** Theocharis SE, Skepelitou AS, Margeli AP, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Dig Dis Sci* 39: 245-52, 1994.
- 55-** Mokry J, Nemecek S. Immunohistochemical detection of proliferative cells. *Sb Ved Pr Le7k Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove* 38: 107-13, 1995
- 56-** Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br. J. Surg* 89: 1089-1095, 2002
- 57-** Haber AH, Mohn KL, Diamond RH, Taub R. Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration. *J Clin Invest* 91:1319-26, 1993.
- 58-** Ebrencfried, J.A., Ko, T.C., Thompson, E.A. and Evers, B.M., 1997, Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration, *Surgery*, 122, 5, 927-935, p.

- 59-** Ankoma-Sey, V. 1999, Hepatic regeneration- revisiting the myth of prometheus. *News Physiol. Sci.*, 14, 149-155, p.
- 60-** Palmes, D. and Spiegel, H.U. 2004, Animal models of liver regeneration, *Biomaterials* 25, 1601-1611, p.
- 61-** Kay, M.A. and Fausto, N. 1997, Liver regeneration: prospects for therapy based on new technologies, *Molecular Medicine Today*, 108-115.
- 62-** Fausto, N. and Campbell, J. S. 2003, The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation, *Mechanisms of Development* 120, 117-130, p.
- 63-** Borowiak, M. Garratt, A.N., Wüstefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C. and Birchmeier, C., 2004, Met provides essential signals for liver regeneration, *PNAS* 101, 10608- 10613, p.
- 64-** Watanabe, M. Yamaguchi, K., Chijiwa, K. and Tanaka, M., 2001, FR167653 Improves survival and pulmonary injury after partial hepatectomy under ischemia/reperfusion in rats, *Journal of Surgical Research*, 101, 146-151, p.
- 65-** Hou, Z. Yanaga, K. Kamohara, Y. Eguchi, S. Tsutsumi, R. Furu, J. and Kanematsu, T. 2003, A new suppressive agent against interleukin-1b and tumor necrosis factor-a enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats, *Hepatology Research* 26, 40- 46, p.
- 66-** Debonera, F. Aldeguer, X. Shen, X. Gelman, A.E. Gao, F. Que, X. Greenbaum L.E. Furth E.E. Taub R. and Olthoff K.M. 2001, Activation of interleukin-6/STAT3 and liver regeneration following transplantation, *Journal of Surgical Research* 96, 289- 295, p.
- 67-** Vogten, J.M. 2004, Angiogenesis in the liver, *Drukkerij Onkenhout B.V. Hilversum*, Chapter 1, 10-20, p.
- 68-** Tsuchiya, T. Miyazawa, M., Abe, T. Saito, T. Kanno, H. Ishii, S. Suzuki, M. Kenjo, A. Yamada, F. Gunji, T. Kimura, T. and Gotoh, M. 2000, Hepatic regeneration and ischemia/reperfusion injury in fatty-liver rats, *Transplantation Proceedings* 32, 2324, p.
- 69-** Andreeff, M. Goodrich, D.W. and Pardee, A.B., 2000, Cell proliferation, differentiation and apoptosis, *Cancer Medicine*, 6th Edition, *Cancer Biology*, Section 1, Chapter 2, BC Decker Inc, 17-32, p.
- 70-** Andıran, F. Ayhan, A. Tanyel, F.C. Abbasoglu, O. and Sayek, R., 2000, Regenerative capacities of normal and cirrhotic liver following 70% hepatectomy in rats and the effect of N-Tocopherol on cirrhotic regeneration, *Journal of Surgical Research*, 89, 184-188, p.

- 71-** Panis, Y Lomri, N. and Emond, J.C., 1998, Early gene expression associated with regeneration is intact after massive hepatectomy in rats. *Journal of Surgical Research*, 79, 103-108, p.
- 72-** Nakamura, T. Ueno, T. Sakamoto, M. Sakata, R. Torimura, T. Hashimoto, O. Ueno, H. and Sata, M., 2004, Suppression of transforming growth factor- $\beta$  results in upregulation of transcription of regeneration factors after chronic liver injury, *Journal of Hepatology*, 41, 974-982, p.
- 73-** Michalopoulos GK. Appasamy R. Metabolism of HGF-SF and its role in liver regeneration. *EXS*. 1993; 65:275-83. Review
- 74-** Akino, K. Akita, S. Mizuguchi, T. Takumi, I. Yu, R. Wang, X. Rozga, J. Demetriou, A.A. Melmed, S. Ohtsuru, A. and Yamashita, S. 2005, A novel molecular marker of pituitary tumor transforming gene involves in a rat liver regeneration, *Journal of Surgical Research*,
- 75-** Kaibori, M. Sakakura, Y. Oda, M. Okumura, T. Kwon, A.H. and Kamiyama, Y. 2000, Role of hepatocyte growth factor in hepatic ischemia and reperfusion Injury, *Transplantation Proceedings* 32, 2285-2286, p.
- 76-** Lindroos PM, Zornegor R, Michalopoulos GK. Hepatocyte growth factor (Hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology* 1991;13:743-50.
- 77-** Nishizaki T, Takenaka K, Yoshizumi T et al. Alteration in levels of human hepatocyte growth factor following hepatectomy. *J Am Coll Surg* 1995;181:6-10.
- 78-** Yshii T, Sato M. Hepatocyte growth factor stimulates liver regeneration and elevates blood protein level in normal and partially hepatectomized rats. *Journal of Biochemistry* 1995; 117 (5): 1105-12.
- 79-** Kirillova I. Chaisson M. Fausto N. Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor  $\kappa$ B activation. *Cell Growth Differ*. 1999 Dec;10(12):819-28.
- 80-** Yamada, Y. and Fausto, N. 1998, Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor, *Am J. Pathol.*, 152, 1577-1589, p.
- 81-** Rai RM. Lee FY. Rosen A. Yang SQ. Lin HZ. Koteish A. Live FY. Zaragoza C. Lowenstein C. Diehl AM : Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10;95(23):13829-34

- 82-** Tilg H, Kaser A, Moschen AR. How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases. *Liver Int.* 2006 Nov;26(9):1029-39. Review
- 83-** S.PAY The use of anti-TNF drugs in rheumatic disorders. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2006, 26:430-440.
- 84-** Remicade (infliximab) [package insert]. Horsham (PA): Centocor Inc; 2006
- 85-** Remicade (infliximab) prescribing information. Horsham (PA): Centecor; 2006.
- 86-** Bahcecioglu İ, Koca S, Poyrazoglu O, Yalnız M, Ozercan İ H, Ustundag B, Sahin K, Dagli A F and Isik A. Hepatoprotective Effect of Infliximab, an Anti-TNF- $\alpha$  Agent, on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Fibrosis İnflammation. 2008 Apr. 22.
- 87-** Meissner M: Biomarkers of sepsis: clinically useful? *Current Opin Crit Care* 11: 473-480, 2005.
- 88-** Scotte, M. Daveau, M., Hiron, M., Tcnikre, P. and Lebreton, J.P. 1993, Absence of expression of interleukin-6 (IL-6) mRNA in regenerating rat liver, 315, 2, 159- 162, p.
- 89-** Salazar-Montes, A. Rincon, A.R., Panduro, A. and Armendariz-Borunda, J., 1999, Chemically induced liver regeneration is characterized by specific IL-6 gene expression, *Hepatology Research* 15, 10-21, p
- 90-** Kaya, Y. Coskun, T. ve Aral, E. 2002, Pringle manevrasının parsiyal karaciger rezeksiyonundan sonra karacigerin Interlökin-6 üretimine etkisi, *Çagdas Cerrahi Dergisi*, 16, 4, 202-207, s.
- 91-** Aoki, T. Murakami, M. Niiya, T., Murai, N., Shimizu, Y., Kato, H. and Kusano, M., 2001, Capacity of hepatic regeneration following a second partial hepatectomy in rats, *Hepatology Research* 21, 228-241, p.
- 92-** Michalopoulos GK. Liver regeneration: molecular mechanism of growth control. *FASEB J* 1990;4:176-87.
- 93-** Noguchi S, Ohba Y, Oka T. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Endocrinol* 1991;128:425-31
- 94-** Amfiregülin: Farelerde Karaciğer Rejenerasyonunun Erken Tetikleyicisi, *Gastroenterology türkçe baskı - Cilt 1 Sayı 1* 2005:43-51).
- 95-** 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.
- 96-** Strazl TE, Porter KA, Kashiwagi N et al. Portal hepatotrophic factors, diabetes mellitus and acute liver atrophy, hypertrophy and regeneration. *Surg Gynecol Obstet* 1975;141:843-58.

- 97-** Francavilla A, Polimeno L, Barone M et al. Hepatic regeneration and growth factors. *J Surg Oncol* 1993;13:1-7.
- 98-** Van Thiel DH, Stauber R, Gavaler JS et al. Hepatic regeneration. Effects of age, sex hormone status, prolactin and cyclosporine. *Dig Dis Sci* 1991;36:1309-12.
- 99-** Svonos GW, Eagon PK, Elm M et al. Effect of antiandrogen flutamide on measures of hepatic regeneration in rats. *Dig Dis Sci* 1989;34:1916-23.
- 100-** Hatiboğlu C, Alyanak A, Çetin B, Aslan S, Çetin A. The In Vivo Effect Of Granulocyte Macrophage-colony Stimulating Factor On Kupffer Cell Function After Partial Hepatectomy. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2006, 26:56-61
- 101-** A. Karaman, H.Kırımlıoğlu, E. Taş, N. Karadağ, C. Gülsul, E. Fadillioğlu, M. Demircan. Leflunomidin rat parsiyel hepatektomi modelinde karaciğer rejenerasyonu üzerine olan etkisi. *Türkiye Çocuk Cerrahisi Dergisi*. 2006.
- 102-** Ekberg S, Luther M, Nakamura T et al. 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.
- 103-** Goss JA, Mangino MJ, Callery MP et al. Prostaglandin E<sub>2</sub> down regulates kupffer cell production of IL-1 and IL-6 during hepatic regeneration. *Am J Physiol* 1993;601-8.
- 104-** Tsujii H, Okamoto Y, Kikuchi E et al. Prostaglandin E<sub>2</sub> and liver regeneration. *Gastroenterology* 1993;105:495-9
- 105-** Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC. Travmaya sistemik yanıt: Principles of Surgery, Türkçesi. Yedinci baskı. Geçim IE (ed) Ankara 1999, S: 3-55
- 106-** Batman F, Aydınlı M, Sayek İ. Karaciğer Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi. *Temel Cerrahi*. 2004;1295-1301.
- 107-** Gutteridge JMC: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* 41: 1819-1828, 1995
- 108-** Lykkesfeldt J: Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta* 380: 50–58, 2007.
- 109-** Tuncyurek P, Yenisey C, Doger FK, Soyder A, Bicakci T, Cevikel MH. Nitric oxide as an independent regulatory factor in regenerating rat liver. *Acta Chir Belg*. 2006 Sep-Oct;106(5):581-7
- 110-** Dawn BM, Allan DM, Colleen MS. Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland.(1996).

- 111-** Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları. Konya. (1995).
- 112-** Tietz NW. Clinical Guide to Laboratory Tests. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania. (1995).
- 113-** Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania. (1999).
- 114-** Pharmacokinetics of murine p75-Fc fusion protein and MP6-XT22 anti-murine TNF-alpha mAb in mice. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2007 May;12(1):52-6.
- 115-** Emond J, Capron-Leadereau M, Merrigi F, Bernuau J, Reynes M, Houssin D. Extend of hepatectomy in rats. *Eur Surg Res* 1989; 21: 251-259.
- 116-** Wang X, Anderson R, Soltesz V, et al. Effect of portal hypertension on bacterial translocation induce by major liver resection in rats. *Eur J Surg* 1993; 159: 343-350.
- 117-** Fan, Y., Praet, M., Huysse, J.V., Lelie, B. and Hemptinne, B., 2002, Effects of portal vein arterialization on liver regeneration after partial hepatectomy in the rat, *Liver Transplantation*, 8, 2, 146-152, p.
- 118-** Fishback FC. A morphologic study of regeneration of the liver after partial removal. *Arch Pathol* 1929; 7: 956-977.
- 119-** Kagure K, Zhang YQ, Shibata H, Kojima I. Immediate onset of DNA synthesis in remnant rat liver after %90 hepatectomy by an administration of follistatin. *J Hepatol* 1998; 28: 977-984
- 120-** Selzner N, Selzner M, Tian Y, Kadry Z, Clavien PA. Cold ischemia decreases liver regeneration after partial liver transplantation in the rat: A TNF-alpha/IL-6-dependent mechanism. *Hepatology.* 2002 Oct;36(4 Pt 1):812-8.
- 121-** Selzner M, Clavien PA. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology.* 2000 Jan;31(1):35-42
- 122-** Aebi H (1974) Catalase. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis.* Academic, New York, pp 673–677.
- 123-** Navarro-Gonzalves, J. A., C. Garcia-Benayas, and J. Arenas, 1998: Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin. Chem.* 44, 679-681.
- 124-** Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yagi, 1979: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358.

- 125-** Beutler E, Durgun O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 51:882-888
- 126-** El-Ashmawy IM, el-Nahas AF, Salama OM. Protective effect of volatile oil, lcoholic and aqueous extracts of *Origanum majorana* on lead acetate toxicity in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005 Oct;97(4):238-43.
- 127-** Scotte M, Masson S, Lyoumi S, Hiron M, Teniere P, Lebreton JP, Daveau M. Cytokine gene expression in liver following minor or major hepatectomy in rat. *Cytokine.* 1997 Nov;9(11):859-67.
- 128-** Furuta, K., Kakita, A., Takahashi, T., Tomiya, T. and Fujiwara, K., 2000, Experimental study on liver regeneration after simultaneous partial hepatectomy and pancreatectomy, *Hepatology Research*, 17, 223-236, p.
- 129-** Li, Y, Wang, H.Y. and Cho, C.H., 1999, Effects of heparin on hepatic regeneration and function after partial hepatectomy in rats, *World Journal of Gastroenterology*, 5,4, 305-307, p.
- 130-** Rikiyama T, Suzuki M, Unno M, Fukuhara K, Uchiyama T, Matsuno S. Kupffer cell-mediated inhibition of liver regeneration after combined hepatectomy and pancreatectomy. *J Gastrointest Surg.* 1999 Nov-Dec;3(6):654-61.
- 131-** Schoen JM, Wang HH, Minuk GY, Lauth WW. Shear stress-induced nitric oxide release triggers the liver regeneration cascade. *Nitric Oxide.* 2001; 5(5): 453-64
- 132-** Jaeschke H. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1995 Jun;209(2): 102-3.
- 133-** Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci* 1996; 1: 78-86.
- 134-** Konukoğlu D, Akçay T. Glutatyon metabolizması ve klinik önemi.1995 cilt:15 sayı:4. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi.*
- 135-** Lee SJ, Boyer TD. The effect of hepatic regeneration on the expression of the glutathione S-transferases. *Biochem J.* 1993 Jul 1;293 ( Pt 1):137-42.
- 136-** Ramadori G, Christ B. Cytokines and hepatic acute phase response. *Seminars in liver disease* 1999; 19 (2): 141.
- 137-** Scotte, M. Masson, S. Lyoumi, S. Hiron, M. Paul Teniere, P. Lebreton, J.P. Daveau, M. 1997, Cytokine gene expression in liver following minor or major hepatectomy in rat, *Cytokine*, 9, 11, 859-867, p.
- 138-** Scotte, M. Daveau, M. Hiron, M. Tcnikre, P. and Lebreton, J.P. 1993, Absence of

expression of interleukin-6 (IL-6) mRNA in regenerating rat liver, 315, 2, 159-162, p.

**139-** Tiberio GA, Tiberio L, Bene. 2008 Jun: IL-6 Promotes compensatory liver regeneration in cirrhotic rat after partial hepatectomy. *Cytokine*. 42(3):372-8.

**140-** Lynda Aoudjehane, Philippe Podevin, Olivier Scatton. *The FASEB Journal*. Interleukin-4 induces human hepatocyte apoptosis through a Fas-independent pathway 2007;21:1433-1444.)

**141-** Conti F, Calmus Y, Rouer E, Gaulard P, Louvel A, Houssin D, Zafrani E.S. Increased expression of interleukin-4 during liver allograft rejection *Journal of Hepatology*, Volume 30, Number 5, May 1999 , pp. 935-943

**142-** La Flamme AC, Patton EA, Bauman B, Pearce EJ. IL-4 plays a crucial role in regulating oxidative damage in the liver during schistosomiasis. *J Immunol*. 2001 Feb 1;166(3):1903-11.

**143-** Assy N, Minuk GY. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J Hepatol* 1997 Apr;26(4):945-52.