



T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**PARSİYELHEPATEKTOMİ  
YAPILAN SIÇANLARDA  
KİMYASAL SEMPATEKTOMİNİN  
KARACİĞER REJENERASYONU ÜZERİNE  
ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Selim DEMİREZEN**

**Antalya, 2011**



T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**PARSİYELHEPATEKTOMİ  
YAPILAN SIÇANLARDA  
KİMYASAL SEMPATEKTOMİNİN  
KARACİĞER REJENERASYONU ÜZERİNE  
ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Selim DEMİREZEN**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güngör KARAGÜZEL**

**“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”**

**Antalya, 2011**

**Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2010.04.0103.016).**

## TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim süresinceengin bilgi ve tecrübelerini bizimle paylaşan, cerrahi becerilerimizin temellerini atarak gelişmesini sağlayanhocamSayınProf. Dr. Mustafa MELİKOĞLU'na, her konuda titizlikle çalışarak aynı titizliliği bize aktaran,farklı sorularla cerrahi bakış açımızı genişleten, tez çalışmalarımın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Güngör KARAGÜZEL'e, ilk cerrahi deneyimimde yanımda olan, hemen hemen her konuda bir abi şefkatiyle yaklaşarak bize destek olan, hocalarım Sayın Prof. Dr. Adnan ASLAN'a veSayın Yrd. Doç. Dr. Cem BONEVAL'een içten saygı ve sevgilerimle teşekkür ederim.

Tez çalışmamın deneysel aşamalarının gerçekleşmesinde katkılarından dolayı Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. M. Tekinalp GELEN'e, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Sayın Doç. Dr. S. Halide AKBAŐ'a minnet duygularımı arz ederim.

Bu uzun uzmanlık eğitimim süresince sorumluluğu ve pekçok bilgiyi paylaştığım değerli araştırma görevlisi arkadaşlarıma, çalışma ortamını dostlukları ile bir aile ortamına çeviren klinik, poliklinik ve ameliyathane hemşire, sekreter, teknisyenve personeline, hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen canımailem ve sevgili eşim Özlem'e şükranlarımı sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>Simgeler ve Kısaltmalar Dizini</b>	<b>v</b>
<b>Şekiller Dizini</b>	<b>vii</b>
<b>Çizelgeler Dizini</b>	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>4</b>
2.1. Parsiyel Hepatektomi .....	7
2.2. Karaciğer Rejenerasyonu.....	10
2.2.1. Karaciğer Rejenerasyonunda Moleküler Mekanizma.....	17
2.2.2. Karaciğer Rejenerasyonunu Aktive Eden Faktörler.....	22
2.2.3. Karaciğer Rejenerasyonunu İnhibe Eden Faktörler.....	27
2.3. Kimyasal Sempatektomi.....	28
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>29</b>
3.1. Deneysel Model .....	29
3.1.1. Deney Grupları.....	30
3.1.2. Cerrahi İşlem .....	31
3.2. Parametreler.....	34
3.2.1. Morfolojik Parametreler .....	34
3.2.2. Biyokimyasal Parametreler .....	34
3.2.3. Histopatolojik Parametreler.....	35
3.3. İstatistiksel Analiz.....	37
<b>4.BULGULAR.....</b>	<b>38</b>
4.1. Morfolojik Bulgular .....	38
4.2. Biyokimyasal Bulgular.....	42
4.2.1. Serum HGF Bulguları.....	42
4.2.2. Serum TNF- $\alpha$ Bulguları.....	46
4.2.3. Serum IL-6 Bulguları.....	51

4.3. Histopatolojik Bulgular .....	54
4.3.1. Mitotik İndeks Bulguları.....	54
4.3.2. PCNA Bulguları.....	59
4.3.3.Ki-67 Bulguları.....	63
4.3.4. Apoptotik İndeks Bulguları.....	67
4.4. Korelasyon Testi Bulguları.....	71
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>72</b>
<b>6. SONUÇLAR.....</b>	<b>79</b>
<b>7. ÖZET.....</b>	<b>82</b>
<b>8. ABSTRACT .....</b>	<b>85</b>
<b>9. KAYNAKLAR .....</b>	<b>88</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AP-1</b>	Activating protein-1 (Aktivatör protein-1)
<b>BrdU</b>	5-bromo 2-deoxy-uridine
<b>Cat</b>	Catalog (Katalog)
<b>C/EBP</b>	CCAAT enhancer binding protein (Bağlanmayı artırıcı protein)
<b>cm</b>	Centimeter (Santimetre)
<b>CRP</b>	C-reactive protein (C-reaktif protein)
<b>DAB</b>	Diaminobenzidine
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid (Deoksiribonükleik asit)
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid (Etilendiamin tetraasetik asit)
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor (Epidermal büyüme faktörü)
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor (Fibroblast büyüme faktörü)
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Granülosit makrofaj koloni stimulan faktör )
<b>H&amp;E</b>	Hematoxylin-eosin (Hemotoksilen-Eosin)
<b>HGF</b>	Hepatocyte growth factor (Hepatosit büyüme faktörü)
<b>HSS</b>	Hepatocyte stimulating factor (Hepatosit uyarıcı faktör)
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hydrogen peroxide (Hidrojen peroksit)
<b>IL-1</b>	Interleukin-1 (İnterlökin-1)
<b>IL-4</b>	Interleukin-4 (İnterlökin-4)
<b>IL-6</b>	Interleukin-6 (İnterlökin-6)
<b>IL-8</b>	Interleukin-8 (İnterlökin-8)
<b>IL-10</b>	Interleukin-10 (İnterlökin-10)
<b>IL-13</b>	Interleukin-13 (İnterlökin-13)
<b>IEGS</b>	The immediate early genes (acil erken faz genleri)
<b>IB</b>	Inhibitor Kappa B
<b>kD</b>	Kilodalton
<b>kg</b>	Kilogram
<b>Lig</b>	Ligamentum (Ligament)

<b>mg</b>	Miligram
<b>mL</b>	Mililitre
<b>iNOS</b>	Inductible nitric oxide synthase (İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz)
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor kappa B
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline (Fosfat ile tamponlanmış salin)
<b>PCNA</b>	Proliferating cell nuclear antigen (Prolifere hücre nükleer antijeni)
<b>pg</b>	Pikogram
<b>PH</b>	Partial hepatectomy (Parsiyel hepatektomi)
<b>RES</b>	Reticuloendothelial system (Retiküloendotelyal sistem)
<b>rpm</b>	Revolition per minute (devir/dakika)
<b>SOR</b>	Serbest oksijen radikalleri
<b>STAT3</b>	Signal transducer and activator of transcription 3 (Transkripsiyon aktivatörleri ve transdüksiyon belirteci)
<b>TBS-Tween</b>	Tris-buffered saline (Tris ile tamponlanmış salin)
<b>TACE</b>	TNF- $\alpha$ Converting Enzyme (TNF-alfa dönüştürücü enzim)
<b>TGF</b>	Transforming growth factor (Transforming büyüme faktörü)
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor (Tümör nekroze edici faktör)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor alpha (Tümör nekroze edici faktör alfa)
<b>TNFR</b>	Tumor necrosis factor receptor (Tümör nekroze edici faktör reseptörü)
<b>TUNEL</b>	Tdt-dUTP nick-end labeling
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor (Vasküler endotel büyüme faktörü)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1. Karaciğerin lobüler yapısı	4
2.2. Karaciğer anatomisi	5
2.3. Karaciğerin segmenter anatomisi	6
2.4. Sıçan karaciğer anatomisi	8
2.5. PH oranına göre sıçan karaciğer anatomisi	9
2.6. Rejenerasyon süresince çıkarılan karaciğer yüzdesi ile rejenere olan karaciğer dokusunun toplam ağırlığı arasındaki ilişki	11
2.7. Normal sıçan karaciğeri, PH ve PH sonrası haftalarca devam eden rejenerasyonu	14
2.8. Karaciğer rejenerasyonu sürecinde farklı hepatik hücre tipleri arasındaki etkileşim	16
2.9. PH sonrası karaciğer rejenerasyonu sürecinde farklı hepatik hücre tiplerinin DNA sentez hızları	17
2.10. Karaciğerin rejenerasyonu sürecinde priming ve progresyon fazları	18
2.11. Transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna ve DNA sentezinin başlamasına yol açan olaylar	19
2.12. PH sonrası karaciğer rejenerasyonunda gen aktivitesi zinciri	21
2.13. PH sonrası karaciğer rejenerasyonunda erken dönemde gelişen olayların kronolojik sıralaması	22
2.14. Karaciğer rejenerasyonunda etkili faktörler	22
3.1. Denek hayvanının karın bölgesinin hazırlanması ve laparotomi uygulaması	32
3.2. Falsiform ligamanın kesilerek karaciğerin serbestleştirilmesi	32
3.3. Sıçan karaciğerinin median (a) ve sol lateral (b) loblarının bağlanarak çıkarılması. Çıkarılan loblar (c)	33
3.4. Cerrahi sırasında eksanguinasyon yöntemi (a) ve eş zamanlı hepatektomi yapılarak alınan rejenere karaciğer dokusu (b)	33
4.1a. 2A ve 2B gruplarının R değerlerinde (ortalama±standart hata) anlamlı farklılık olduğunu gösteren grafik	39
4.1b. A alt gruplarına ait R değerlerini (ortalama±standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik	39

<b>4.1c.</b>	B alt gruplarına ait R değerlerini (ortalama±standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik	<b>40</b>
<b>4.1d.</b>	Grup 1A'nın R değerlerinin HGF düzeyleri ile olan korelasyon grafiği	<b>40</b>
<b>4.1e.</b>	Grup 2B'nin R değerlerinin Ki-67 değerleri ile olan korelasyon grafiği	<b>41</b>
<b>4.1f.</b>	Grup 3B'nin R değerlerinin mitotik indeks ile olan korelasyon grafiği	<b>41</b>
<b>4.2.1a.</b>	4A ve 4B gruplarının HGF düzeylerinde (ortalama±standart hata) anlamlı farklılık olduğunu gösteren grafik	<b>42</b>
<b>4.2.1b.</b>	A alt gruplarının HGF düzeylerini (ortalama±standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik	<b>43</b>
<b>4.2.1c.</b>	B alt gruplarının HGF düzeylerini (ortalama±standart hata) ve B alt grupları arasında anlamlı farklılığın olmadığını gösteren grafik	<b>43</b>
<b>4.2.1d.</b>	Grup 1A'nın HGF düzeylerinin mitotik indeks ile olan korelasyon grafiği	<b>44</b>
<b>4.2.1e.</b>	Grup 2A'nın HGF düzeylerinin mitotik indeks ile olan korelasyon grafiği	<b>44</b>
<b>4.2.1f.</b>	Grup 4A'nın HGF düzeylerinin PCNA değerleri ile olan korelasyon grafiği	<b>45</b>
<b>4.2.1g.</b>	Grup 1B'nin HGF düzeylerinin TNF- $\alpha$ düzeyleri ile olan korelasyon grafiği	<b>45</b>
<b>4.2.1h.</b>	Grup 3B'nin HGF düzeylerinin apoptotik indeks ile olan korelasyon grafiği	<b>45</b>
<b>4.2.2a.</b>	4A ve 4B gruplarının TNF- $\alpha$ düzeylerinde (ortalama±standart hata) anlamlı farklılık olduğunu gösteren grafik	<b>46</b>
<b>4.2.2b.</b>	A alt gruplarının TNF- $\alpha$ düzeylerini (ortalama±standart hata) ve A alt grupları arasında anlamlı farklılığın olmadığını gösteren grafik	<b>47</b>
<b>4.2.2c.</b>	B alt gruplarının TNF- $\alpha$ düzeylerini (ortalama±standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik	<b>47</b>
<b>4.2.2d.</b>	Grup 1A'nın TNF- $\alpha$ düzeylerinin Ki-67 değerleri ile olan korelasyon grafiği	<b>48</b>
<b>4.2.2e.</b>	Grup 4A'nın TNF- $\alpha$ düzeylerinin IL-6 düzeyleri ile olan korelasyon grafiği	<b>48</b>
<b>4.2.2f.</b>	Grup 1B'nin TNF- $\alpha$ düzeylerinin mitotik indeks ile olan korelasyon grafiği	<b>49</b>

4.2.2g.	Grup 2B'nin TNF- $\alpha$ düzeylerinin IL-6 düzeyleri ile olan korelasyon grafiği	49
4.2.2h.	Grup 3B'nin TNF- $\alpha$ düzeylerinin Ki-67 değerleri ile olan korelasyon grafiği	49
4.2.2i.	Grup 4B'nin TNF- $\alpha$ düzeylerinin PCNA değerleri ile olan korelasyon grafiği	50
4.2.3a.	3A ve 3B gruplarının IL-6 düzeylerini (ortalama $\pm$ standart hata) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik	51
4.2.3b.	4A ve 4B gruplarının IL-6 düzeylerini (ortalama $\pm$ standart hata) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik	52
4.2.3c.	A alt gruplarının IL-6 düzeylerini (ortalama $\pm$ standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik	52
4.2.3d.	B alt gruplarının IL-6 düzeylerini (ortalama $\pm$ standart hata) ve B alt grupları arasında anlamlı farklılığın olmadığını gösteren grafik	53
4.2.3e.	Grup 3B'nin IL-6 düzeylerinin apoptotik indeks ile olan korelasyon grafiği	53
4.3.1a.	2A ve 2B gruplarının mitotik indekslerini (ortalama $\pm$ standart hata) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik	54
4.3.1b.	3A ve 3B gruplarının mitotik indekslerini (ortalama $\pm$ standart hata) ve aralarında anlamlı farklılık olduğunu gösteren grafik	55
4.3.1c.	4A ve 4B gruplarının mitotik indekslerini (ortalama $\pm$ standart hata) ve aralarında anlamlı farklılık olduğunu gösteren grafik	55
4.3.1d.	A alt gruplarının mitotik indekslerini (ortalama $\pm$ standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik	56
4.3.1e.	B alt gruplarının mitotik indekslerini (ortalama $\pm$ standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik	56
4.3.1f.	Grup 2A'nın mitotik indekslerinin Ki-67 değerleri ile olan korelasyon grafiği	56
4.3.1g.	Grup 1B'nin mitotik indekslerinin PCNA değerleri ile olan korelasyon grafiği	57
4.3.1h.	Mitotik aktivite gösteren hepatositlere ait ışık mikroskobu fotoğrafları (x100)	58
4.3.2a.	2A ve 2B gruplarının PCNA değerlerini (ortalama $\pm$ standart) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik	59
4.3.2b.	A alt gruplarının PCNA değerlerini (ortalama $\pm$ standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik	60
4.3.2c.	B alt gruplarının PCNA değerlerini (ortalama $\pm$ standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik	60

4.3.2d.	Grup 4A'nın PCNA değerlerinin apoptotik indeks ile olan korelasyon grafiği	61
4.3.2e.	Grup 4B'nin PCNA değerlerinin Ki-67 değerleri ile olan korelasyon grafiği	61
4.3.2f.	PCNA antikoru ile boyanan hepatositlere ait ışık mikroskopi fotoğrafları (x100)	62
4.3.3a.	1A ve 1B gruplarının Ki-67 değerlerini (ortalama±standart hata) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik	63
4.3.3b.	A alt gruplarının Ki-67 değerlerini (ortalama±standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik	64
4.3.3c.	B alt gruplarının Ki-67 değerlerini (ortalama±standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik	64
4.3.3d.	Grup 4A'nın Ki-67 değerlerinin apoptotik indeks ile olan korelasyon grafiği	65
4.3.3e.	Ki-67 antikoru ile boyanan hepatositlere ait ışık mikroskopi fotoğrafları (x100)	66
4.3.4a.	2A ve 2B gruplarının apoptotik indekslerini (ortalama±standart hata) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik	67
4.3.4b.	3A ve 3B gruplarının apoptotik indekslerini (ortalama±standart hata) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik	68
4.3.4c.	4A ve 4B gruplarının apoptotik indekslerini (ortalama±standart hata) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik	68
4.3.4d.	A alt gruplarının apoptotik indekslerini (ortalama±standart hata) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik	69
4.3.4e.	B alt gruplarının apoptotik indekslerini (ortalama±standart hata) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik	69
4.3.4f.	Apoptotik hepatositlere ait ışık mikroskopi fotoğrafları (x100)	70

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. Grupların R değerleri (ortalama±standart hata)	38
4.2.1. Grupların HGF düzeyleri (ortalama±standart hata)	42
4.2.2. Grupların TNF- $\alpha$ düzeyleri (ortalama±standart hata)	46
4.2.3. Grupların IL-6düzeyleri (ortalama±standart hata)	51
4.3.1. Grupların mitotik indeksleri (ortalama±standart hata)	54
4.3.2. Grupların PCNA değerleri (ortalama±standart hata)	59
4.3.3. Grupların Ki-67 değerleri (ortalama±standart hata)	63
4.4. Her bir gruba ait alt gruplarda araştırılan parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı olan korelasyonları (pozitif/negatif) gösteren çizelge	71

## 1. GİRİŞ

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 (PH)sonrası karaciğer fonksiyonlarının devamı için rejenerasyon süresince gerçekleşen bir dizi karmaşık olayın kontrol altında tutulması günümüzde giderek önem kazanmaktadır(2).

Karaciğer iyi bir rejenerasyon yeteneğine sahip olduğu için vücuttaki diğer organlardan daha avantajlıdır. Değişik nedenlerle zarar gördüğünde, fonksiyonel kütlelerini tamamlama yönünde proliferasyona ve replikasyona başlayabilir (3).Karaciğerin bir bölümünün çıkarılması, karaciğerin iyicil ve kötücül hastalıklarının tedavisinde önemli bir yöntemdir. Karaciğerin parsiyel rezeksiyonu için endikasyonlar arasında primer ve sekonder kötücül tümörler, iyicil tümörler, travmatik rüptürler, canlıdan karaciğer nakli, kistler ve abseler yer alır(4).

Majör karaciğer rezeksiyonlarından sonra kalan karaciğer dokusunun fonksiyonel ve rejeneratif kapasitesi ameliyat sonrası mortalite ve morbiditeyi önemli ölçüde etkiler. 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 (5, 6).İnsan karaciğerinin %80-85'e varan rezeksiyonları bile tolere edebildiği bildirilmektedir(7). Rezeksiyon %10'dan az bile olsa rejenerasyon gerçekleşmektedir(8).

Hepatektomi sonrasında hepatosit replikasyonu artmaktadır. 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 (9).

İnsan ve hayvanlarda deneysel olarak hepatektomiden sonra rejenerasyonun ve karaciğerin yeniden yapılanması için endokrin, parakrin ve otokrin etkileşimler gereklidir (10).Rejenerasyonda birçok büyüme faktörü ve sitokinler rol alır.Hepatositlerin içerisinde yer alan organellerden kaynaklanan değişik büyüme faktörlerinin etkilerinin araştırılması ve rejenerasyonun farklı evrelerinde gen ekspresyonunun monitörize edilmesi,karaciğer rejenerasyonunu anlamamızda önemli ilerlemelere sebep olmuştur (3, 8, 11-15). PH sonrası geride kalan karaciğer dokusunda rejenerasyonun ilk günden itibaren başladığı ve DNA sentezinin, hepatektomi sonrasında ilk 24-48 saatte maksimuma ulaştığı gösterilmiştir(16). Normalde hepatositlerde mitoz çok nadirdir. Fakat PH'den 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 4-5 haftada tamamlanır. Eksize edilen loblar aynen eski şekillerini almazlar.Rejenerasyon daha çok yeni lobüllerin oluşması ve rezidü lobüllerin büyümesi şeklinde olur (17, 18).

Karaciğer rejenerasyonunun gösterilmesi ve rejeneratif yanıtın çalışılması için in vivomodel olarak PH tercih edilmektedir. PH sonrası rejenerasyona yönelik çalışmalarda en yaygın olarak kullanılan iki model organizma fare ve sıçanlardır. Bunun nedeniboylarının küçük olması, çiftleştirilmişçapraz soyların elde edilebilmesi, maliyetlerinin vebakımlarının ucuz olmasıdır(19).

Deneysel hayvan modellerinde yaklaşık %70'lik karaciğer dokusunun rezeke edildiği PH'ler, karaciğer yetmezliğinin gelişmediği kritik sınır olması nedeniyle çalışmalarda en sık uygulanan modeldir (7, 8, 20). %70 PH'den sonra kalan karaciğerin orijinal hacmi sıçanlarda 10-14 gün içinde geri kazanılmaktadır (21-23). Sıçanlarda PH'den sonra, gen ekspresyonu başlar ve hepatik rejenerasyonu düzenleyici, biyolojik olarak aktif maddeler serbest bırakılır. Bu maddelerin birbirleriyle olan ilişki ve bağlantıları son derece hassas ve karmaşık bir denge oluşturur. Karaciğerin rejenerasyonu sürecinde bu denge kendiliğinden korunur (10).

Bugüne kadar karaciğer rejenerasyonu üzerine etkili olduğu düşünülen birçok faktör araştırılmıştır (yaş, portal dolaşım, hormonlar, vitaminler, enfeksiyon, ilaçlar, otokoidler, vb.). Bunların dışında karaciğer rejenerasyonuna

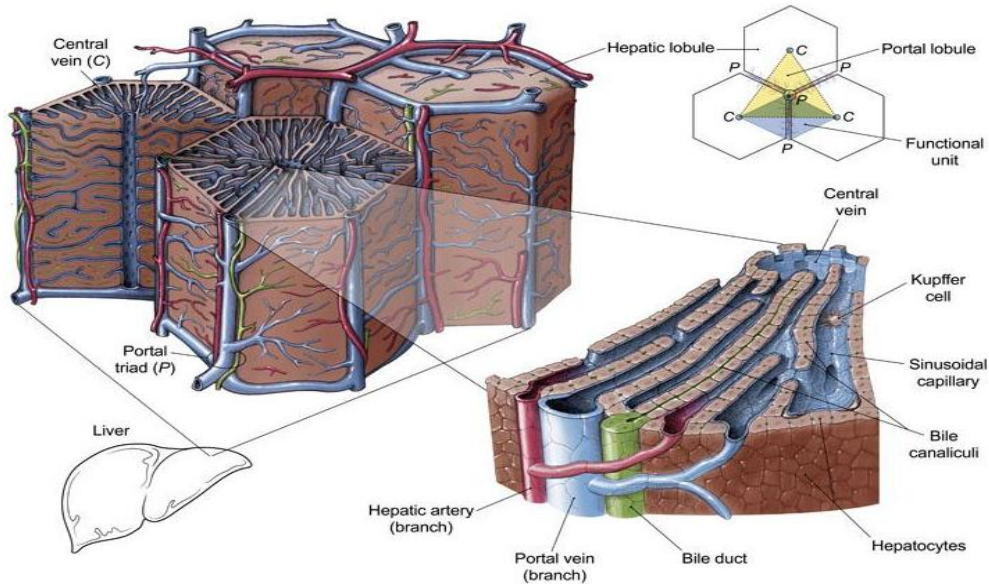
etki ettiği düşünölen diğer bir faktör ise otonom sinir sistemidir. Otonom sinir sistemi (sempatik ve parasempatik sistem) vücudun birçok işlevini etkiler. Bunlara kardiyovasküler sistem, böbrekler, karaciğer, pankreas, gastrointestinal sistem ve bezlerin işlevleri de dahildir (24).Deneysel hayvan çalışmalarında hepatik sinirlerin cerrahi ya da kimyasal denervasyonu bu sinirlerin işlevinin araştırılması için genellikle standart bir yöntem olarak kullanılmaktadır (25-32).Kimyasal denervasyon için en sık kullanılan ajan6-Hidroksidopamin(6-OH-DA)'dir. 6-OH-DA kemirgen dokularında norepinefrini önemli ölçüde azaltarak kimyasal sempatektomi oluşturmaktadır (33-35). Daha önceden yapılmış çalışmalar otonom sinir sisteminin karaciğer rejenerasyonunu da düzenlediği yönündedir(25-32, 36).

Fakat kimyasal sempatektominin, PH yapılan sıçanlarda karaciğer rejenerasyonu üzerine etkilerinin ne olduğu açık değildir. Biz çalışmamızda parsiyel hepatektomi yapılan sıçanlarda kimyasal sempatektominin karaciğer rejenerasyonu üzerine etkilerinin deneysel olarak araştırılmasını amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

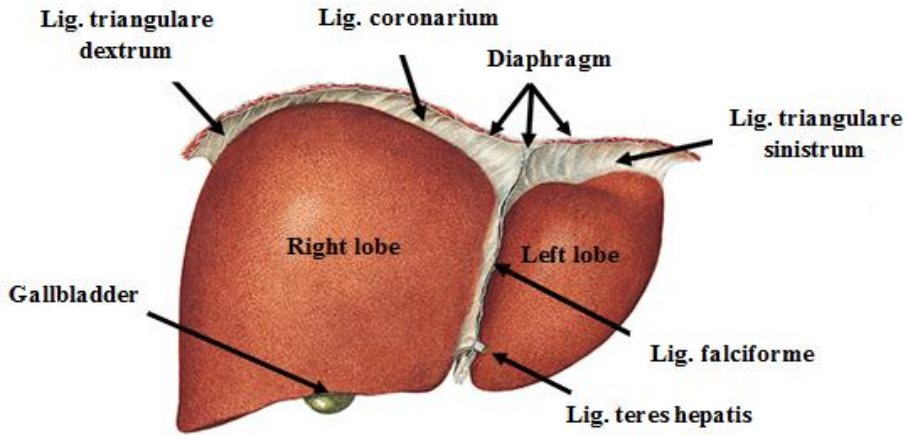
Bu ana başlık altında karaciğer hakkında genel bilgi verildikten sonra; PH, karaciğer rejenerasyonu ve kimyasal sempatektomi konuları ayrıntılı olarak irdelenecektir.

Karaciğer insan vücudunun deriden sonra en büyük organı olup, 1400-1600 gram kadardır. Yenidoğanda total vücut ağırlığının yaklaşık 1/20'si iken, yetişkinlerde bu oran 1/50'dir (37). Karaciğerin temel fonksiyonları; bağırsaklardan dönen kanın depolanması ve filtrasyonu (vasküler fonksiyon), vücudun metabolik sisteminin büyük kısmının koordinasyonu ve regülasyonu (metabolik fonksiyon), safranin yapıp safra kanallarıyla gastrointestinal sisteme ulaştırılması (sekretuar ve ekskretuar fonksiyon) olarak özetlenebilir(38). Karaciğer hücrelerinin çoğunluğu ağırlığının yaklaşık 2/3'ünü oluşturan hepatositlerdir. Diğer hücre tipleri retikuloendotelial sisteme üye olan Kupffer hücreleri, stellat hücreler (Ito veya yağ depolayan hücreler), endotelial hücreler ve kan damarları, biliyer duktüler hücreler ve bağ dokusudur. Işık mikroskobu ile incelendiğinde; karaciğerin her birinin merkezinde santral venin, periferinde portal alanların olduğu lobüllerden oluştuğu görülür (39) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Karaciğerin lobüler yapısı (39).

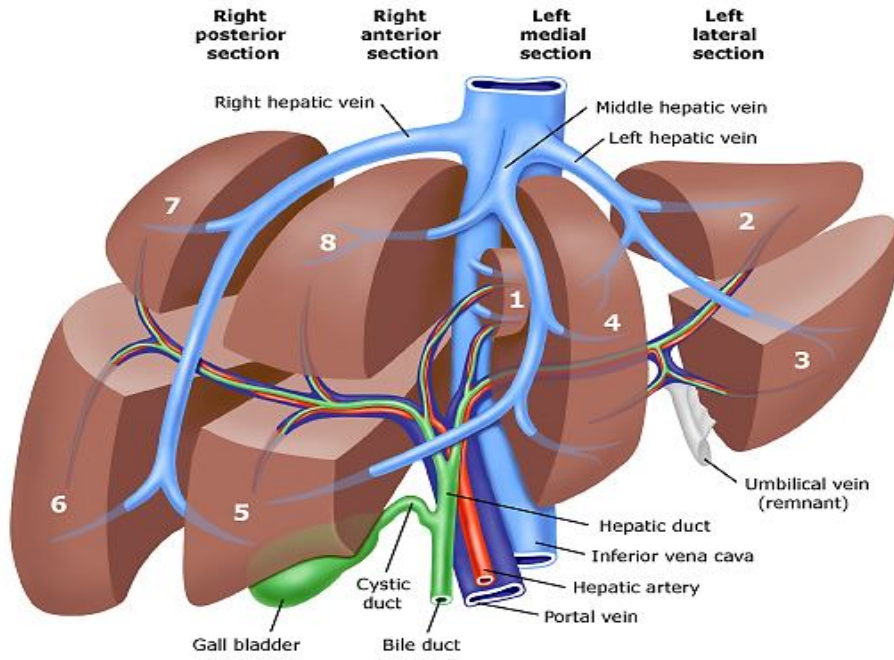
Karaciğer, *Glisson* kapsülü adı verilen peritoneal membranla sarılmıştır. *Glisson* kapsülü ayrıca hilus düzeyinde portal triad yapılarını da sarmaktadır. *Glisson* kapsülü iki yaprağa ayrılarak diyafragma yapışır. Bu iki yaprak anterior ve posterior koronar ligamentler adını alır. Bu ligamentler sağda ve solda triangüler ligamentleri oluşturur ve önde birleşerek falsiform ligamenti meydana getirirler. En alt kısmında oblitere sol umbilikal venin oluşturduğu *ligamentum teres hepatis* yer alır (37) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Karaciğer anatomisi (37).

Karaciğeri falsiform ligament, *lig. teres hepatis* ve koronar ligamentler ön karın duvarına ve diyafragma bağlar. Hepatoduodenal ligament içinde koledok, hepatik arter ve vena porta bulunur. *Lig. hepatogastricum* da karaciğeri yerinde tutan ligamentlerden biridir(37). 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 triad* tarafından çevrelenen dikdörtgen bölümdür. Kaudat lob ise solda falsiform ligamanın posterior uzantısı ile inferior vena kava'nın karaciğer üzerindeki impresyonu arasında yer alır(40).

Karaciğerin cerrahi anatomisi, portal pediküllerin dağılımı ve bunların hepatik venlerle olan ilişkisi, safra yolları ve arteryel anatomi göz önüne alınarak sekiz segmente ayrılmıştır(Şekil 2.3.).Segmenter anatomi kalan segmentlerin biliyer ve vasküler devamlılığını sağlamada, segmenter veya birkaç segmentin birlikte çıkarıldığı rezeksiyonlarda önem kazanır.Sağ lob 5-8. segmentlerden, sol lob 1-4. segmentlerden oluşur. *Lig. falciforme* ve *Lig. teres*4. segmenti 2. ve 3. segmentlerden ayırır(41).



Şekil 2.3. Karaciğerin segmenter anatomisi (41).

## **2.1.Parsiyel Hepatektomi**

Karaciğerin bir bölümünün çıkarılması, karaciğerin iyicil ve kötücül hastalıklarının tedavisinde ve canlı vericilerden organ nakli amacıyla sıklıkla uygulanan bir yöntemdir (42).Karaciğer rezeksiyonları anatomik ve non-anatomik olmak üzere ikiye ayrılır. Vasküler anatomiyi 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 bölümlerinkanlanmasını bozmamaktır.

Anatomik rezeksiyonlar sağ ve sol hepatektomiler, sektörektomiler, segmentektomiler ve subsegmentektomilerdir (43).

Parsiyel hepatektomi endikasyonları şunlardır(9);

### **I.Kötücül (malign) tümörler:**

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

### **II.İyicil (benign) hastalıklar:**

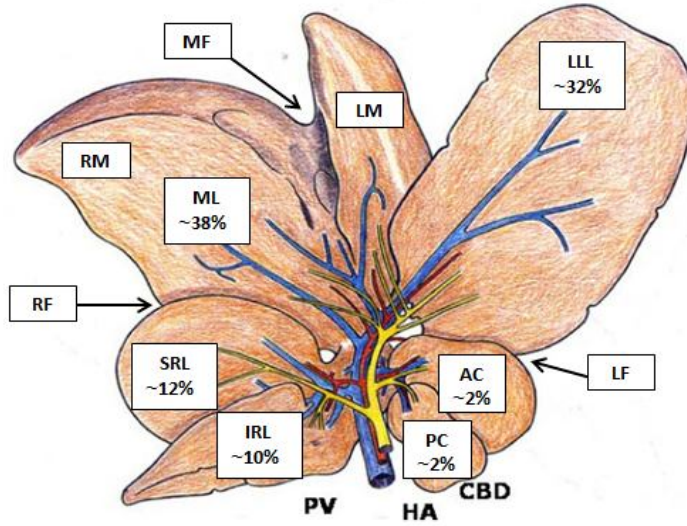
- a.** Alveolar veya hidatik kist
- b.** Adenom
- c.** Hemanjiom
- d.** Abse

### **III. Travma**

### **IV.Organ nakli**

Rezeksiyon sonrası karaciğer rejenerasyonunun gösterilmesi ve rejeneratif yanıtın çalışılması için in vivomodel olarak PH tercih edilmektedir. Fare ve sıçanlar, PH modellerinde rejenerasyona yönelikçalışmalarda en yaygın olarak kullanılan organizmalardır. Bunun nedeniboylarının küçük olması, çiftleştirilmişçapraz soyların elde edilebilmesi ve maliyetlerinin vebakımlarının ucuz olmasıdır (19). Sıçanlarda PH'nin daha iyi anlaşılabilmesi için önce sıçan karaciğeri anatomisi hakkında bilgi verilecektir.

Sıçan karaciğeri; sağ lateral, sol lateral, median ve kaudat lob olmak üzere toplam dört ana lobdan oluşan, koyu kırmızı renkte, sert parankimatöz bir organdır (Şekil 2.4.). Median lob, falciform ligamana ait olan median fissür ile sağ ve sol medial segmentlere ayrılır. Sağ medial segmentin hemen arkasında transvers bir fissürle süperior ve inferior olmak üzere iki küçük segmente ayrılan sağ lateral lob yer alır. Sol lateral lob sol medial segmentin hemen arkasında yer alır. En derin planda da anterior ve posterior segmentleri bulunan kaudat lob yer alır. Sıçanlarda safra kesesi bulunmaz. Çeşitli segment ve loblardan çıkan safra kanalcıkları, hilus civarında birleşerek ana safra kanalı olan *ductus choledocus*'u oluşturur (44-46).

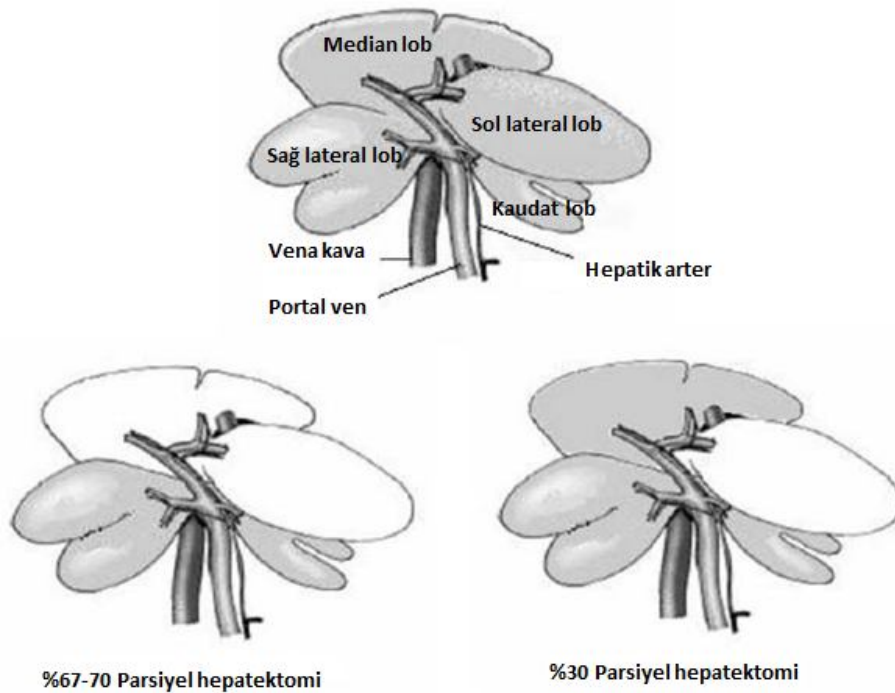


**Şekil 2.4.** Sıçan karaciğer anatomisi. ML: Median lob, RM: Right medial lob, LM: Left medial lob, LLL: Left lateral lob, SRL: Superior right lob, IRL: İnferior right lob, AC: Anterior caudat lob, PC: Posterior caudat lob, RF: Right fissure, LF: Left fissure, MF: Median fissure, PV: Portal vein, HA: Hepatic artery, CBD: Common bile duct (45).

PH, deneysel modellerde karaciğerin yaklaşık %65-70'inin çıkartılması şeklinde uygulanmaktadır (47). Sıçanlarda karaciğerin, kütleli olarak 2/3'lük parçasının alınmasının, rejeneratif uyarı anlamında optimum bir oran olduğu ve bu oranın alt ya da üst değerlerinde yapılacak bir PH'nin rejenerasyonu yavaşlatabildiği yayınlanmıştır (48).

Sıçan karaciğerinde yapılan çalışmalarda %30 PH içinsadece sol lateral lob çıkartılırken(49),%65-70PH için iseHiggins veAnderson'un tanımlamalarına göre sol lateral lob ve median lob çıkartılmaktadır (46, 48)(Sekil 2.5.).

Karaciğer cerrahisindeki ilerlemeler hepatektominin tekrarlanmasını mümkünhale getirmiştir. Cerrahi işlem olmaksızın uygulanan yöntemlerde önemli ilerlemekaydedilmesine karşın, hepatektominin tekrarlanması, yeniden ortaya çıkan ya dametastatik olan tümörlerin tedavisinde önemli bir rol oynar. İkinci bir hepatektomi,tekrarlanan karaciğer hücre karsinomlarında ve karsinomların kolon ya da rektumkaynaklı olup metastazla karaciğere ulaşması durumlarında gereklidir. İkinci PH'den sonraki mortalite ve sağkalım oranları, ilk hepatektomi ilebenzerdir. %70 PH'den iki hafta sonra, sıçanların rejenerasyon gösteren karaciğerlerine %30 PHşeklinde ikinci birPH yapılması sonucunda karaciğer,kütlesini ilk PH'ye göre daha yavaş bir büyüme ile geri kazanmaktadır.Sonuçta geçici bir karaciğer fonksiyon yetmezliği olmasına rağmen iyileşme gerçekleşmektedir(49).



**Şekil 2.5.**PH oranına göre sıçan karaciğer anatomisi. *Gri*: Kalan fonksiyonel karaciğer lobları. *Beyaz*: Fonksiyonel olmayan karaciğer lobları (48).

## 2.2. Karaciğer Rejenerasyonu

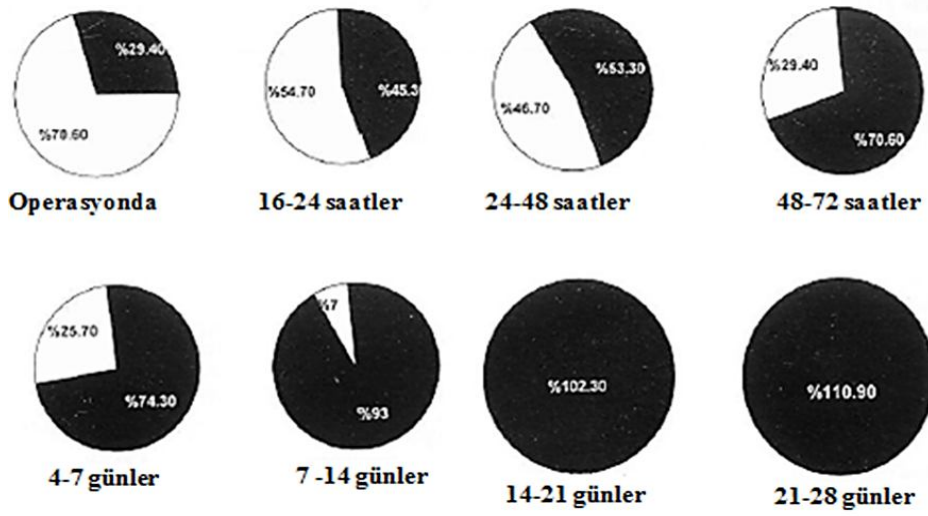
Karaciğer yüksek rejenerasyon kapasitesi ve komplike fonksiyonlarının varlığı ile farklı özellikleri olan bir organdır. Karaciğerin rejenerasyon yeteneği, rezeksiyon veya zedelenme sonrası karaciğer kitlesini korumaya yönelik eşsiz bir reaksiyondur. Rejenerasyon süreci bir takım sitokin ve büyüme faktörlerinin 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 rejenerasyonu olarak tanımlanır(3, 8, 29, 50, 51).

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. Fakat karaciğer her gece eski halini alır. Ancak gerçek anlamda karaciğer rejenerasyonu fikrini ilk kez 1833'te *Crueilhier* ortaya atmıştır(52). 1900'lü yıllarda Amerikalı *Higgins* ve *Anderson* adlı bilim adamları sıçanlarda eter anestezisi altında subtotal lobektomiyle (%70-80) median ve sol lobu çıkartmışlar ve karaciğer rejenerasyonunun değerlendirilebilmesi için yeni bir model oluşturmuşlardır (46, 53-55).

Sıçanlardaki deneysel rezeksiyon modelinde rejenerasyon cevabı karaciğerin 2/3'ü rezeke edildiğinde maksimumdur (46). Daha küçük miktarda parankim çıkartıldığı 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(56, 57).

Sıçanlarda PH ile alınan loblar tekraroluşup gelişemez ancak, kalan loblar hücrel hiperplazi ile büyüme göstererekfonksiyonel doku boyutuna gelir (46, 48, 58). Kütleli büyüklüğe erişmiş olan karaciğerin şeklinin,hepatektomi öncesi orijinal şekle benzememesi vücut için gerekli olan karaciğerfonksiyonları açısından önemli olmamaktadır (22, 48).

Araştırmalar sonucunda %70-80 PH'den sonra geride kalan karaciğerin orijinal hacmi sıçanlarda 10-14 gün içinde geri kazanılmaktadır (49). PH sonrası geriye kalan karaciğer ağırlığı, cerrahiden sonraki ilk 48-72 saat içinde iki katına yükselmektedir (59-61). Deneysel PH çalışmalarında karaciğer ağırlık ölçümlerinin yapılması, rejenerasyon oranının belirlenmesi açısından oldukça önemlidir (49, 62, 63). Rejenerasyon süresince çıkarılan karaciğer yüzdesi ile rejenerasyon olan karaciğer dokusunun toplam ağırlığı arasındaki ilişki Şekil 2.6'da gösterilmiştir (46, 53).



**Şekil 2.6.** Rejenerasyon süresince çıkarılan karaciğer yüzdesi ile rejenerasyon olan karaciğer dokusunun toplam ağırlığı arasındaki ilişki (46, 53).

Karaciğerin rejenerasyonu esas olarak kompanse edilebilir bir hiperplazidir. Çünkü organın morfolojisi PH sonrası orijinal şekline dönmez. Kısmi kayıp ve hepatosit nekrozu sonrası karaciğer büyümesini düzenleyen mekanizmaların bazıları değişebilir. Bu düzenleme işlemi anatomik olmaktan ziyade fonksiyoneldir. Karaciğer rejenerasyonu için kabul edilen genel görüş, bunun organizmadan çıkan sinyallerin düzenleyici etkisi ile karaciğerin optimum boyuta ulaşmasına kadar devam eden ve mükemmel bir şekilde organize edilen bir olaylar zinciri olduğudur. Buna göre, karaciğerin büyümesi vücudun fonksiyonel ihtiyacının üzerine çıkarsa, karaciğer kütlesinin vücut kütlesine oranına göre optimal düzeye gerilemesi söz konusudur (3, 64, 65).

PH'den sonra karaciğerin fonksiyonel kapasitesi kadar kendibüyükliğünün de önemli olması, rejenerasyonu başlatıcı ve durdurucu etkenler arasında çok iyi bir dengenin oluşmasına neden olmaktadır. Karaciğer rejenerasyonu sürecinde karaciğer kütlesi, vücudun fonksiyonel olarak istediğinden daha büyük miktara ulaşırsa vücut kendi ihtiyacına göre karaciğer kütlesini azaltmaktadır (3, 63, 66). Karaciğerdeki kütleli fazlalık apoptozis ile azaltılmaktadır (67).

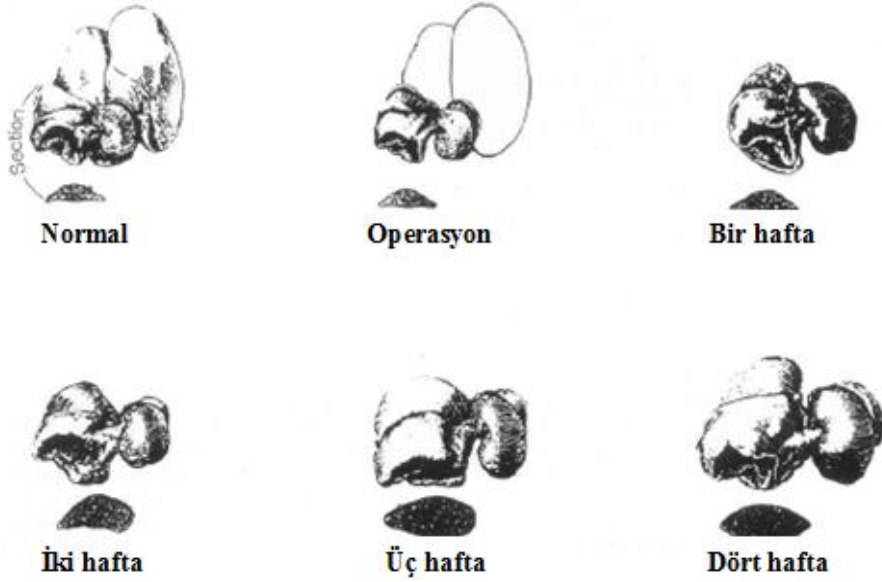
**Apoptozis:** Apoptozis, embriyo döneminden ölüme kadar pek çok fizyolojik veya patolojik olayda saptanan programlı bir hücre ölümü sürecidir. Her saniye yaklaşık bir milyon hücremiz apoptozisle vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Apoptozis terimi (*apoptosis*), ilk defa İskoçyalı araştırmacılar olan *Kerr, Wyllie* ve *Currie* tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (68). Hücre ölümü sürecinde, hücre yüzeyinde, yüzey organellerinde ve nükleusta çeşitli değişiklikler izlenir (68). Apoptozis, hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar. Karaciğer kendi büyümesini ve kütlesini düzenleyebilir. Apoptozis, karaciğer rejenerasyonunda yeniden şekil verme (remodeling) süreci ile embriyonik gelişim ve yara iyileşmesinde aşırı ya da istenmeyen hücrelerin yok edilmesine hizmet etmektedir (69). Karaciğer rejenerasyonu ve apoptozisi düzenleyen mekanizmalara dair detaylı çalışmalar kısmi hepatektomi ya da kimyasal harabiyete maruz kalmış olan hayvanlarda yapılmıştır (3). Otonom sinir sistemi hepatik parankimi doğrudan innerve ettiği ve metabolik kontrolde rol oynadığı için (70), karaciğer rejenerasyonu ve apoptozisin büyük olasılıkla hem humoral faktörler hem de otonom sinir sistemi tarafından ortak olarak düzenlendiği anlaşılmaktadır.

Otonom sinir sistemi vücudun birçok işlevini etkiler. Buna kardiyovasküler sistem, böbrekler, karaciğer, pankreas, gastrointestinal yol ve bezlerin işlevleri de dâhildir (24). Ayrıca, otonom sinir sisteminin anormallikleri ve nöropatinin yaşla artma eğiliminde olduğu iyi bilinmektedir (71). Otonom fonksiyon bozukluğunun yaygınlığı ve şiddeti karaciğer hastalığının şiddeti ile ilgili görünmektedir ve mortalitede artışla ilişkilendirilmektedir (72, 73). Karaciğer sirozlu hastaların parasempatik hipofonksiyon ve sempatik hiperfonksiyonunun olduğu da

bildirilmiştir(74, 75). Son yıllarda, karaciğer ve otonom sinir sistemi arasındaki ilişkilere yönelik artan bir ilgi vardır. Bununla birlikte yapılan çalışmalar otonom sinir sisteminin karaciğer rejenerasyonu ve apoptozisi düzenlediğini yönündedir. Merkezi sinir sistemi ise karaciğer rejenerasyonunu ve apoptozisi otonom sinir sistemi yoluyla ayarlar. Lateral hipotalamus (LH) alanı ve ventromedial hipotalamus (VMH) çekirdeği de nörohumoral bilginin entegrasyonu hakkındaki rolleri ile ilgili olarak incelenmiştir. LH parasempatik sistemin bir parçasıdır. Öte yandan, VMH ise sempatik sisteme aittir. LH lezyonlarının sempatik sinir faaliyetinde artışa neden olurken, VMH'de yer alan lezyonların ise vagus sinir faaliyetinin kolaylaştırılmasını sağladığı söylenmektedir. Ayrıca, VMH ya da LH lezyonları kısmi hepatektomiden sonra hepatik rejenerasyonu kolaylaştırır. Hipotalamus da otonom sinir sistemi aracılığıyla hepatik apoptozise ortam hazırlar (76). Viral ya da kimyasal hasarın tetiklediği hepatosit kaybı veya hepatik lobların cerrahi rezeksiyonu, hepatosit replikasyonunu tetiklerken, karaciğerin aşırı büyümesi ise apoptoz tarafından düzeltilir. Noradrenalin hepatik proliferasyonun stimülasyonunu belirgin şekilde artırır (77). Ancak, noradrenalinin  $\beta$ 2-adrenerjik reseptör aracılığıyla Fas-indüklenmiş hepatosit apoptozunu önlediği tespit edilmiştir (78). Bu bulgular otonom sinir sisteminin rejenerasyonunda karaciğerde apoptozu engelleyerek hücre büyümesinde bir stimülatör olarak rol oynayabileceği şeklinde yorum yapmamıza yol açar. Bu rolün açıkça tanımlanması için daha başka çalışmalara ihtiyaç olmasına rağmen, otonom sinir sistemi karaciğer rejenerasyonunu ve apoptozu düzenleyen en önemli faktörlerden biridir. Karaciğer rejenerasyonu ve apoptozis ile ilgili moleküler mekanizma sonraki bölümde anlatılmıştır.

Karaciğer rejenerasyonunda birçok aşama olmasına karşın kritik önemi olan ikibasamaktan bahsedilmektedir. Hepatositlerin hücre döngüsüne girişi ve döngünün G1 fazında ilerlemenin yanı sıra sınırlamanın da başlamasıdır. Bu aşamaların tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) ve interlekin 6 (IL-6) gibi sitokin ailesi tarafından başlatıldığı, hepatosit büyüme faktörü (HGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve transforme edici büyüme faktörü alfa (TGF- $\alpha$ ) gibi büyüme faktörlerince de kontrol altında tutulduğu düşünülmektedir (3, 11, 79, 80, 81).

PH'den sonra 24 saat içinde aktif hücre replikasyonu başlar ve organın ilk ağırlığına erişinceye kadar devam eder. İlk 10 gün içinde önemli ölçüde rejenerasyon oluşur ve bu olay 4-5 haftada tamamlanır (46, 53) (Şekil 2.7.).



**Şekil 2.7.**Normal sıçan karaciğeri, PH ve PH sonrası haftalarca devam eden rejenerasyonu (46, 53).

Eksize edilen loblar aynen eski şekillerini almazlar. Rejenerasyon daha çok yeni lobüller oluşması ve artık lobüllerin genişlemesi şeklinde olur (53). 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 (7, 20).

Karaciğer rejenerasyon kriterlerinin tanımlanması için DNA sentezi ve mitoz sayısı, karaciğer volümü, hücre proliferasyonu ve mitokondrial aktivite gibi birçok belirteç kullanılmıştır (82-85). Ayrıca rejenerasyon kriterlerinin tanımlanması ve tespitinde bazı maddeler de kullanılmıştır. Bunlar: DNA timidin içeriği, 5-bromo 2-deoksi-uridin, Ki-67, Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), plazma fibronektin seviyesi ve stimulator substans gibi maddelerdir (82-84, 86-89).

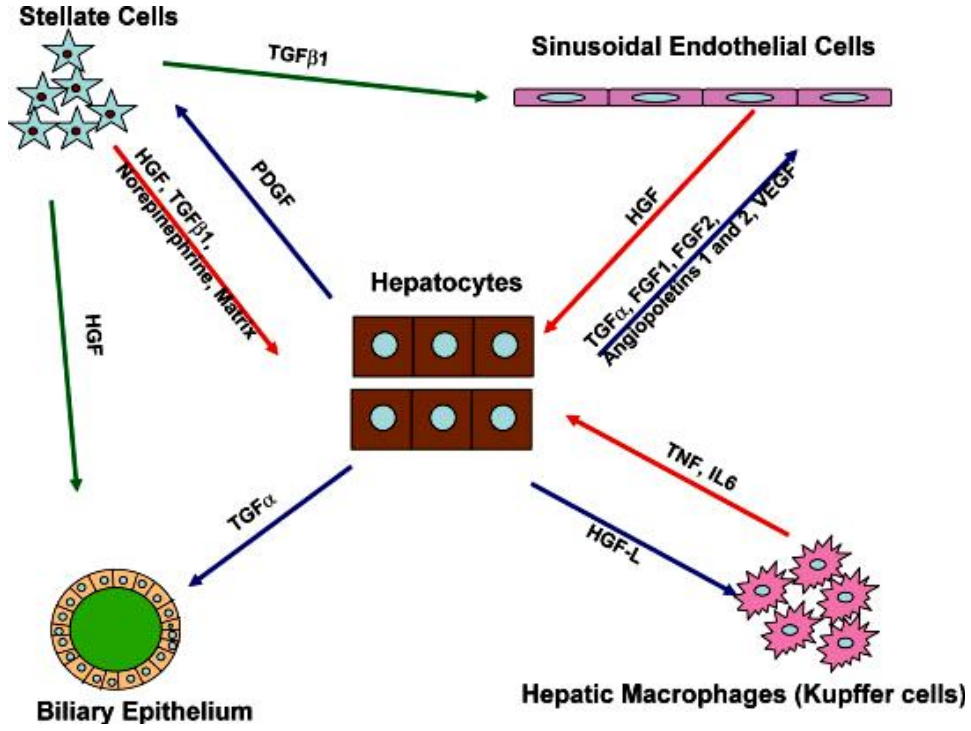
**Mitotik İndeks:** İnsan veya hayvanlarda normal şartlar altında hepatositler nadiren bölünür. İnsan karaciğerinde herhangi bir anda 1.000 hücreden birinde

mitoz görülür. Sıçanlarda %70 PH sonrası mitoz oranı 24-48. saatlerde pik yapar (90, 91). Histopatolojik olarak sahadaki mitotik hepatositlerin 1.000 hücreye oranı olarak ifade edilen mitotik indeks rejenerasyon parametresi olarak kullanılmaktadır (92).

**PCNA:** DNA polimeraz için gerekli bir protein olup hücre proliferasyonunun başlamasında son derece önemli rol oynamaktadır. Bu proteinin ekspresyonu, hücre siklusunda S fazını temsil etmekte ve immünohistokimyasal olarak bu proteinin saptanması dokudaki proliferasyon hücre fraksiyonunu göstermesi nedeniyle önemli bir proliferasyon belirteci olarak ortaya çıkmaktadır (93). PCNA molekülünün, DNA polimeraz için bir kofaktör olarak, S fazı ile DNA sentezinin bir işaretçisi olmasının avantajı vardır (94,95, 96). Bu antijen immünohistokimyasal yöntemler ile kolayca belirlenebilir ve PCNA indeks verilerinin değerlendirilmesiyle karaciğer büyümesi yorumlanabilir (97). Mitotik indeksin belirlenmesinde olduğu gibi, rastgele seçilmiş farklı kesit alanlarında 1000 adet parankimal karaciğer hücresinde belirlenen PCNA pozitif çekirdekli hücrelerin sayısının yüzde olarak ifadesiyle PCNA indeksi hesaplanabilir (10, 49, 63, 98). Normal karaciğerde PCNA antikoru ile immünohistokimyasal inceleme sonrası önemsenmeyecek kadar az sayıda hücrede boyanma saptanırken, rejenerasyon karaciğerde 24. ve 48. saatlerde son derece yüksek sayıda hücrede pozitif boyanma saptanmaktadır (92).

**Ki-67:** İlk kez 1983'de Gerdes ve ark. tarafından hücre çekirdeğinde Ki-67 antijeni ve buna karşı oluşan monoklonal antikoru tanımlanmıştır (99). Ki-67 proteini tüm hücre sikluslarında tanımlanmıştır (100). Hücre siklusu ilerledikçe antijen içeriği artar. G2-M evresinde en üst seviyeye erişir. Ki-67 antijenine karşı tanımlanan monoklonal antikoru ise hücre siklusunun G0 evresi hariç diğer tüm evrelerinde gösterilmiştir. Ki-67'nin diğer kullanılan yöntem ve maddelerden farkı sadece S evresinden ziyade hücredeki siklusun tüm büyüme evrelerinin sınıflandırılabilmesidir. Bu sınıflandırma, hücresel proliferasyon aktivitesinin bir göstergesi olarak kullanılabilir (87,101-103). Agresif tümörlerde bu oran yüksektir (104). Birçok sistem tümörlerinde (meme, akciğer, özofagus, böbrek ve prostat kanseri, malign melanom, nonhodgkin lenfoma, glial tümörler) yüksek Ki-67 oranı, kötü prognostik faktör olarak gösterilmiştir (105-109).

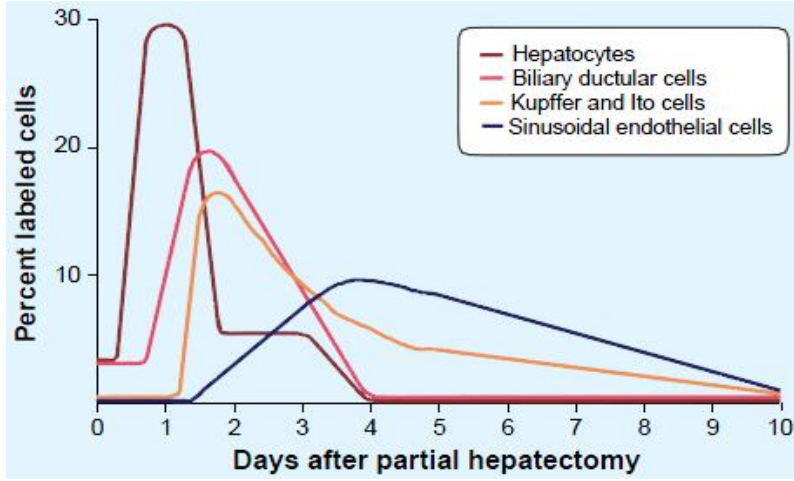
Karaciğer kütesinin %80'ini, hücre sayısı olarak %60'ını oluşturan hepatositler hücre siklusuna en hızlı başlayan hücrelerdir. Bu hücrelerdeki değişiklikler dakikalar içinde meydana gelmektedir(110, 111). Hepatositler diğer hücre tipleri için mitojenik ajanlar üretirler (Şekil 2.8.).



**Şekil 2.8.** Karaciğer rejenerasyonu sürecinde farklı hepatik hücre tipleri arasındaki etkileşim (112).

PHmodelindeki rejenerasyon sürecinde teorik olarak hücrelerin 1,66 proliferasyon yapması gereklidir. Rejenerasyon esnasında hepatositlerin büyük çoğunluğu bir veya iki sefer proliferasyon olmaktadır. Karaciğerde bulunan tüm hücreler bölünerek rejenerasyon sürecine katılmaktadırlar. Hepatosit proliferasyonu lobülün periportal alanından perisantral alanına doğru mitoz dalgası şeklinde yayılır(113, 114).

Hepatositlerdeki en üst DNA sentezi 24. saatte görülmektedir. Hepatositleri sırasıyla duktus epitel hücreleri, kupffer hücreleri, stellat hücreler ve sinüzoidal endotel hücreleri izlemektedir(113, 114) (Şekil 2.9.).



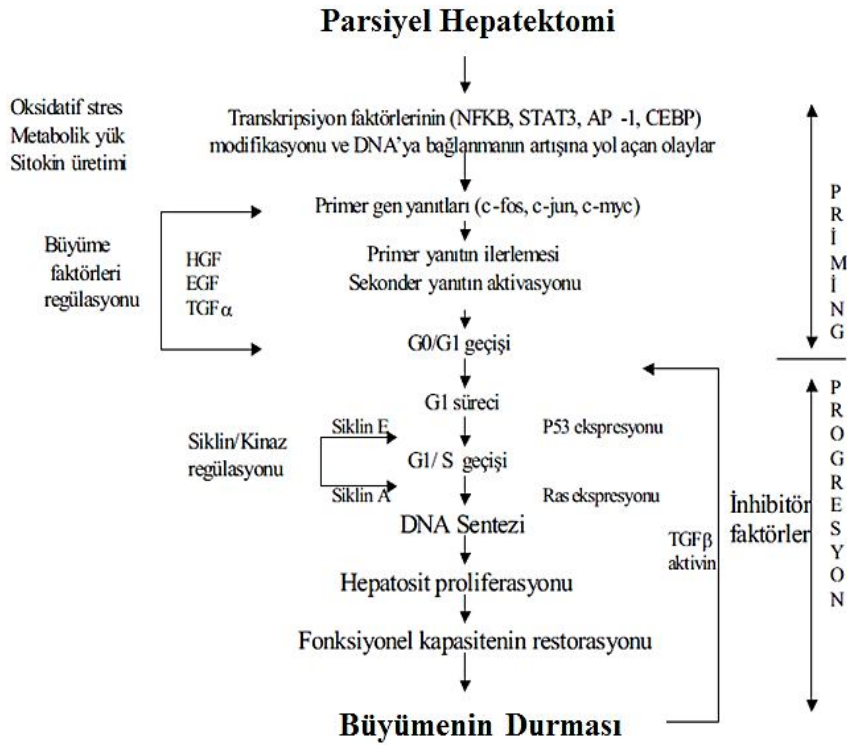
**Şekil 2.9.** PH sonrası karaciğer rejenerasyonu sürecinde farklı hepatik hücre tiplerinin DNA sentez hızları (112).

### 2.2.1. Karaciğer Rejenerasyonunda Moleküler Mekanizma

Normal şartlar altında hepatositler hücre döngüsünün G0 fazındadırlar. Herhangi bir nedenden ötürü karaciğer dokusunun kaybı G0 fazındaki hücrelerin döngüye girerek bölünmesine yol açan olayları başlatır. DNA sentezi için gereken proteinlerin yapım dönemi pre-replikatif G1 fazında tamamlanır. Daha sonra hücre DNA replikasyonunu gerçekleştirir (S fazı). Bu fazı BrdU, PCNA ve Ki-67 gibi artan S fazı proteinlerinin ekspresyonlarını göstererek tanımlamak mümkündür(115, 116). Replikasyon sonrası hücre bölünmesi için gereken moleküllerin sentezi G2 fazında tamamlanır. Daha sonra mitoz (M fazı) gerçekleşerek yeni hücreler ortaya çıkar(50). Karaciğer orijinal boyuta ulaştıktan sonra hepatositler non-replikatif ancak fonksiyonel duruma dönerler (3, 8, 64).

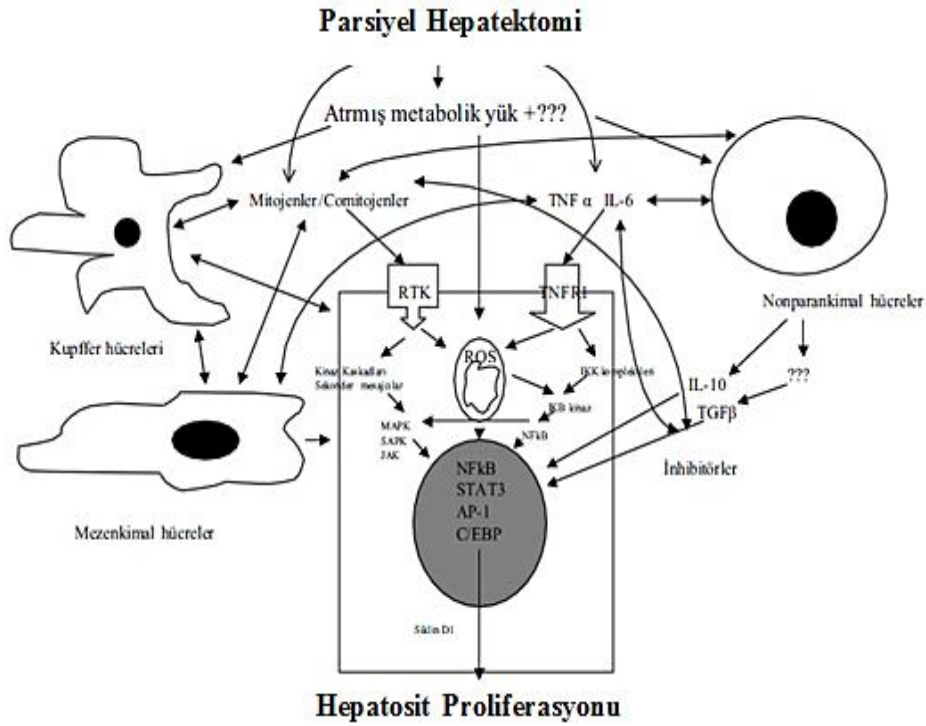
PH sonrası hücrelerin G0 fazından G1 fazına geçmesine sebep olan olaylar “*Priming=Başlama*” daha sonra hücre döngüsünün tamamlanması ise “*Progresyon=İlerleme*” olarak adlandırılmaktadır. “*Priming*” ve “*Progresyon*” fazlarındaki olaylar ve birbirleriyle olan ilişkileri, transkripsiyon faktörleri, gen yanıtları, büyüme faktörleri, sitokin etkileri, kinaz kaskadları arasındaki ilişki sadeleştirilmiş haliyle Şekil 2.10. ve Şekil 2.11’de gösterilmiştir (117). Nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B), transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3), aktivatör protein-1 (AP-1) ve CCAAT/enhancerbinding proteinler (C/EBP) sinyal

dönüştürücü transkripsiyon faktörleridir. Bu transkripsiyon faktörleri inflamasyon, hücre adezyonu, proliferasyon ve apoptozisde (rejenerasyon sırasında meydana gelen olaylar) rol alan 70'den fazla genin aktivasyonuna yol açmaktadır(50). 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(110, 111). Bu olaylar sonuçta reaktif oksijenlerin üretimi, proinflamatuvar sitokinler, TNF- $\alpha$  ve IL-6'nın artışı, mitojen, yardımcı mitojen (*co-mitogens*) ve inhibitörlerin artışı ve birbirleriyle karmaşık ilişkilerinin devamına yol açmaktadır. Bu süreçteki karmaşık ilişki yumağının herhangi bir adımının etkilenmesipotansiyel olarak karaciğer rejenerasyon sürecini etkileyebilir.



**Şekil 2.10.** Karaciğerin rejenerasyonu sürecinde priming ve progresyon fazları (117).

Karaciğere rejenerasyon uyarısı gelmeden önce hepatositlerin hemen hemen hepsi G0 fazında bulunurlar(48, 59, 64). Hücre döngüsünün, uyarının gelmesinden sonra ilerleme fazından çok, başlama fazının büyüme faktörlerine gereksinimi vardır(66). Transkripsiyon faktörü olan NF-κB, STAT3, AP-1 ve sitokin düzenleyici olabileceği düşünülen C/EBP karaciğer rejenerasyonunun başlamasında önemli rol oynarlar(22, 48, 66). Bu moleküller başlangıçta TNF-α tarafından uyarılırlar(47, 118). Bu nedenle deneysel olarak TNF-α ve bu sitokinin uyardığı IL-6 miktarının biyokimyasal yöntemler ile belirlenmesi, PH sonrasında rejenerasyon durumu ile ilgili bilgi verir(63, 118).

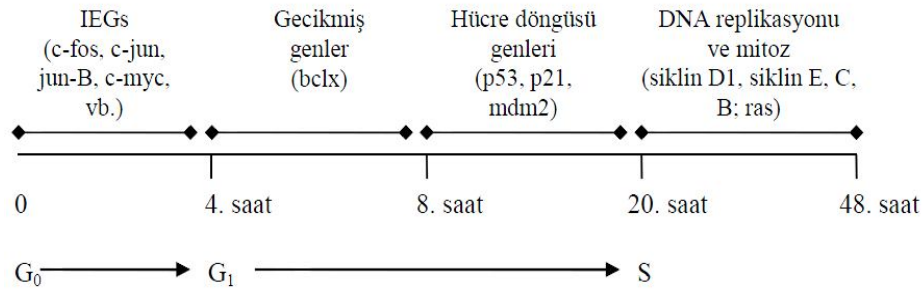


**Şekil 2.11.** Transkripsiyon faktörlerinin (NF-κB, STAT3, AP-1, C/EBP) aktivasyonuna ve DNA sentezinin başlamasına yol açan olaylar. RTK: Reseptör tirozin kinaz, TNFR: Tümör nekrozis faktör reseptörü, ROS: Reaktif oksijenler, TNF: Tümör nekrozis faktör, IL-6: İnterlökin 6, IL-10: İnterlökin 10, TGF: Tranforming büyüme faktörü, MAPK: Mitojen aktive protein kinaz, SAPK: Stres aktive protein kinaz, JAK: Janus kinazları, IKK: İnhibitör nükleer faktör B kinaz (117).

PH 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 ve çevre organlardan gelen büyüme faktörlerinin (pankreas>HGF; duodenum>EGF; adrenal bez>norepinefrin) etkisiyle serbest oksijen radikalleri(SOR) üretimi sağlanır(3). Birçok hücre tipinde bulunduğu gibi hepatositlerde de bulunan ve p65-p50 protein alt ünitelerinden oluşmuşNF- $\kappa$ B molekülü normalde inaktiftir. Bu durum molekülün p65 ünitesine bağlı I $\kappa$ B(Inhibitor Kappa B) inhibitöründen kaynaklanmaktadır. SOR aracılığıyla inhibitör nükleer faktör B kinaz enzim kompleksi tetiklenerek I $\kappa$ B molekülünü katalizlemesi ve NF- $\kappa$ B'den kopması sağlanır. Böylece, hepatosit sitoplazmasında fosforilasyondan sonra aktivite kazanan NF- $\kappa$ B hücre çekirdeğine göç eder. Molekülün çekirdeğe geçişi engellendiğinde karaciğerde apoptozis başlar(3). PH'den sonra öncelikle transkripsiyon faktörlerinden NF- $\kappa$ B, AP-1, C/EBP ve bunların hemenarkasından da STAT3'ün DNA'ya bağlanmalarında artış olur. NF- $\kappa$ B ameliyattan10-15 dakika sonra ölçülebilir ve 1-2 saat içinde de normal seviyeye düşer. STAT3 ise ameliyattan sonraki 1-2saat içinde belirlenebilir ve aktivasyonunu 4-6 saat kadar sürdürebilir(3,66).IL-6 sitokini ve diğer büyüme faktörleri varlığında sitoplazmada aktivite kazanmış STAT3, NF- $\kappa$ B gibi hücre çekirdeğine göç eder. DNA molekülüne bağlanmasından sonra hepatosit proliferasyonunda gerçekleşen iki aşamalı gen ekspresyonunun ilk fazı “*The immediate early genes (IEGs)*” olarak bilinenc-myc, jun-B, c-jun, c-fos gibi protoonkogenlerin ekspresyonudur(3, 119, 120). IEGs lösün ailesinin üyelerinden proteinleri kodlar ve bunlar hücre onarımıyla ilişkilidir. Bu genlerin aktive olduğu dönem “*acil erken faz*” olarak adlandırılır(121). 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, 64). Deney hayvanınaTNF- $\alpha$ 'nın enjekte edilmesi, AP-1'in bağlanmasını artırıcı yönde bir özellik kazandırır. AP-1'in bağlanması ise PH'den 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 G1 fazına doğru itilirler. Bu olay PH'den sonraki 4.saaate isabet eder(3). Hücre döngüsünde görev alan p53, p21, mdm genleri ile siklinler ve siklin bağımlı kinazlar olarak bilinen hücre içi enzimler PH uyarısıyla aktivite kazanırlar. Siklin D1'in kinaz ile oluşturduğu kompleks, hücre döngüsündeki bazı faktörleri fosforilleyerek, rejenerasyonun 20. saatinde, döngünün G1 fazından S fazına geçmesini ve replikasyonun gerçekleşmesini sağlar(3,59). Bu süreçte siklin D, E, C ve B'nin ekspresyonlarına da gereksinim duyulur ve sonuç olarak DNA molekülü replikasyona uğrar(3, 66) (Şekil 2.12.).



**Şekil 2.12.** PH sonrası karaciğer rejenerasyonunda gen aktivitesizinciri (3).

Hepatosit hücre döngüsünde, siklin D1'den siklin E'ye geçiş önemli bir sınır noktasıdır. 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(22). 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(67).

DNA molekülündeki ve gen ekspresyonlarındaki artışın tespit edilmesi, rejenerasyon sürecinin yönü ve ilerleyişinin yorumlanması açısından önemlidir. PH sonrası karaciğer rejenerasyonunda erken dönemde (ilk bir saat) gelişen olayların kronolojik sıralaması Şekil 2.13'de gösterilmiştir (113).

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

**Şekil 2.13.** PH sonrası karaciğer rejenerasyonunda erken dönemde (ilk bir saat) gelişen olayların kronolojik sıralaması (112).

### 2.2.2. Karaciğer Rejenerasyonunu Aktive Eden Faktörler

Karaciğer rejenerasyonunun bir takım stimülatör ve inhibitör maddelerin karşılıklı kompleks ilişkileri sonucu regüle edildiği kabul edilmektedir (3, 122). Karaciğerrejenerasyonunu hangi faktörün başlattığı yapılan birçok çalışmaya karşın günümüzdehala tam olarak ortaya konulamamıştır. Sitokinler ve büyüme faktörleri hepatik rejenerasyon ile ilişkili olan biyolojikmaddeler olup, hepatik rejenerasyonu uyarıp tetikleyenler ve durduranlar olarakgruplandırılırlar (64) (Şekil 2.14.).

Büyüme Uyarıcı Faktörler	
Tam Mitojen (birincil, temel)	Dolaylı Etkili Mitojenler (Komitojenler)
Hepatocyte Growth Factor (HGF)	İnsülin
Transforming Growth Factor- $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )	Glukagon
Epidermal Growth Factor (EGF)	Parathormon
Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	Tiroid hormonu
Insulin- like Growth Factor (IGF)	Adrenal kortikal hormonlar
Acidic Fibroblast Growth Factor	Katekolaminler
Keratinocyte Growth Factor	(norepinefrin, vazopresin, anjiotensin)
Büyüme Durdurucu Faktörler	
Transforming Growth Factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )	
Interleukin- 1 (IL- 1)	
Activanlar, inhibitörler	

**Şekil 2.14.** Karaciğer rejenerasyonunda etkili faktörler (64).

TNF- $\alpha$ , IL-6, HGF ve TGF- $\alpha$  hepatik rejenerasyonu tetiklerken, IL-1, TGF- $\beta$

ve aktivinin ise başlamış olan rejenerasyonu bloke ederler (21, 63, 64,66). Bunların yanında dolaylı olarak insülin, nörepinefrin, gastrin, prostoglandin E2, kalsiyum ve D vitamini gibi yardımcı mitojen maddelerin de temel mitojenler varlığında karaciğer rejenerasyonu üzerine önemli etkileri vardır(8, 21, 64). Hepatositlerin in vitro olarak HGF, EGF ve TGF- $\alpha$  büyüme faktörlerine tam cevap verebilmesi için ortamda ilk olarak TNF- $\alpha$  ve IL-6 sitokinleri ile sitotoksitite engelleyici diğer ajanlara gerek vardır(3).

**Hepatosit büyüme faktörü (HGF):** HGF karaciğer rejenerasyonunun kontrol ve düzenlenmesinde yüksek düzeyde mitojenik etki ile önemli rol oynar(123). En çok karaciğer Ito ve kupffer hücrelerinde olmak üzere akciğer, dalak, plasenta, beyin gibi birçok dokuda ve plazmada bulunan protein yapısında bir büyüme faktörüdür (124). HGF sıçanlarda, PH'den sonraki ilk 6 saatte karaciğer tarafından üretilir (66). Ayrıca sistemik olarak enjekte edilen HGF'nin karaciğer tarafından diğer organlara göre daha fazla tutulduğu görülmüştür (125). Bu molekül hem in vitro hem de in vivo şartlarda büyüme faktörü olma özelliğini devam ettirir(126). Rekombinant HGF, primer kültürde sıçan ve insan hepatositleri için potansiyel bir mitojendir. HGF, PH yapılan, kimyasal hasarlı ve akut hepatitli sıçanlarda daha fazla hasarın oluşmasına engel olmak için karaciğer rejenerasyonunu uyarır (127). %30 PH 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 (22, 66). Hepatektomiye takiben beş dakika içinde ürokinaz aktive olur ve plazminojenin plazmine dönüşümünde rol alır. Plazmin matriks yıkıcı metalloproteinazları uyarır. Matriks yıkımı sonucu HGF salgılanır(8). Sıçanlarda hepatektomi sonrası bir saat içinde plazma HGF konsantrasyonu 20 katına çıkar(128). PH'den sonraki ilk 18-24 saat içinde HGF mRNA seviyesi en üst düzeye ulaşır (64). İnsanlarda PH'yi takiben 1. ve 3. günler arasında plazma HGF seviyesi maksimuma ulaşır(129). Portal veni bağlanmamış sıçanlarda hepatektomi sonrası verilen HGF hem hepatosit kitlesini hemde DNA sentezini artırmakta, portal veni bağlanmış kontrol grubunda ise hipertrofi olmaksızın DNA sentezi artmaktadır (130). HGF gibi bazı büyüme faktörlerinin en önemli kaynağı pankreasın ekzokrin kısmı olduğu için, HGF parakrin mekanizmayla hepatositler

üzerine etkilidir. Pankreatektomi ile birlikte PH uygulanmış deneklerin karaciğerlerinin rejenerasyonu ve iyileşmesinde gerileme olmaktadır(10). HGF'nin mitojen etkisi sadece hepatositler ile sınırlı olmayıp farklı hücre tipleri üzerine de benzer etkiler yapar (64).

**TNF:** Karaciğer rejenerasyonu sırasında *Kupffer* hücrelerinin senteziyle oluşturulan proinflatuar bir sitokindir. TNF- $\alpha$ 'nın ekspresyonu sonucunda hepatositler hiperplazi göstererek, karaciğer ağırlığının vücut ağırlığına göre ihtiyaçtan daha fazla artmasına neden olmaktadır (131). PH sonrası 4-6. saatlerde serumda ve karaciğerde TNF- $\alpha$  düzeyi artar (132,133) 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 (TNFR1 ve TNFR2) 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 dakika arasında pik yapar. Daha sonra salınan IL-1 ve IL-6, TNF ekspresyonunu inhibe eder. 4 saat içinde TNF düzeyi sifıra düşer. TNF koşullara bağlı olarak NF- $\kappa$ B tarafından aktivasyonları düzenlenen hücreler üzerinde promitojenik etkiye sahiptir(134). Genetik olarak TNF reseptör defektli sıçanların PH'ye yanıtlarının yavaş ve eksik olduğu görülmüştür (133). TNF aynı zamanda indüklenebilir nitrik oksit sentaz'ın (iNOS) regülasyonunda rol oynar. iNOS defekti bulunan sıçanların karaciğer rejenerasyonları da defektlidir(135). TNF hepatositler için direkt mitojen değildir. HGF gibi direkt mitojenlerin mitojenik etkilerini artırır.

**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 (136). Travmadan sonra 60 dakika içinde dolaşımdaki düzeyi ölçülebilir, 4-6 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 PH'den sonra karaciğer rejenerasyonunu uyaran önemli bir mitojen ve anti-apoptotik faktördür(3, 137). Rejenerasyon uyarısına cevap verirken, TNF- $\alpha$  aktivasyonu ile etkinlik kazanan IL-6, farklı hedef hücre tipleri üzerine çok yönlü biyolojik aktiviteler gösteren pleotropik bir sitokindir(131). Bu sitokin, hemapoetik sistem düzenlenmesinde, lenfosit fonksiyonlarında ve hücre farklılaşmasında görev alan önemli bir mediatördür. Sıçanlarda PH'den sonraki 24-48. saatler arasında IL-6'nın serum konsantrasyon seviyesi artar(47, 64, 138). IL-6'nın fizyolojik miktarı rejenerasyon için gereklidir ancak fazla IL-6 büyüme durdurucu onkogenleri uyararak rejenerasyonun bozulmasına neden olabilir (98). İnflamatuvar sitokinlerin önemli kaynağı kupffer hücreleri(64) ve sinusoidlerdeki endoteldir (49). Ayrıca, TNF- $\alpha$ , IL-6 ve HGF ile heparine bağlı EGF'nin temel kaynağı, karaciğerdeki parankimal olmayan hücreler de olabilmektedir (22). IL-6 sitokininin hepatosit büyümesi üzerine etkisi otokrin mekanizma ile olabilir. Ayrıca IL-6'nın karaciğeri toksik hasarlardan korumada da önemli rolü vardır(119).

***Epidermal büyüme faktörü (EGF):*** Hepatositlerde DNA sentezini uyardığı belirlenen ilk faktördür (13). Hepatosit kültürlerinde mitojen etkisi kanıtlanmıştır(8). Hepatektomi sonrası artan noradrenalin uyarısıyla submandibular bezlerden ve *Brunner* bezlerinden salınımı artmaktadır(15). Amfiregülin epidermal growth faktör ailesinin bir üyesi olup hepatektomi yapılan sıçanlarda karaciğer rejenerasyonunun erken fazına etkili bir erken-yanıt büyüme faktörü olduğu görülmüştür (139). Hücre döngüsünde yer alan ve potansiyel

transkripsiyon faktörlerinden olan STAT3'ün aktivasyonu IL-6 sitokininin serbest kalmasına ve EGF'nin uyarısına bağlıdır(3, 64, 119, 120). Bu açıdan hücre döngüsünün ilerlemesinde IL-6 varlığı oldukça önemlidir (49). Sıçanlarda PH'den sonraki 30 dakika ve üçüncü saatler arasında STAT3'ün seviyesi yüksektir. STAT3'ün hücre büyümesi, farklılaşması ve pek çok sistemde hücrelerin G1'den S fazına geçişlerinde önemlidir. Hepatositlerin G1'den S fazına geçişinde, HGF ve TGF- $\alpha$  büyüme faktörlerinin de varlığında STAT3 aktivasyonu gereklidir (64).

***Transforme edici büyüme faktörü alfa (TGF- $\alpha$ ):*** Rejenerasyonun başlangıç safhasından sonra rol oynadığı düşünülmektedir. EGF ile aynı reseptör üzerine etki eder. Hepatosit kültürlerinde DNA sentezini artırmaktadır(13, 140).

***Norepinefrin:***  $\alpha$ 1-adrenerjik reseptörler yoluyla direkt EGF'yi artırarak indirekt yoldan karaciğer rejenerasyonunu artırır. Sempatik denervasyon ve  $\alpha$ -1 reseptör blokajı DNA sentezini azaltmaktadır(8).

***İnsülin:*** Porto sistemik şant sonucu gelişen karaciğer atrofisi insülin verilmesiyle engellenebilmektedir (141). Primer mitojen olmamasına karşın hücre kültürlerinde diğer büyüme faktörlerinin etkisini artırmaktadır(8).

***Hepatosit uyarıcı madde (HSS):*** 53 kilodalton ağırlığında bir proteindir. İn vitro ve in vivo olarak hepatotrofik etkisi vardır (142).

***Seks hormonları:*** Hepatektomi sonrası hepatositlerde östrojen reseptörleri artarken androjen reseptörleri azalmaktadır. Östrojenin hepatosit bölünmesini artırıcı etkisi vardır. Antiöstrojen bir ajan olan tamoksifenin in vitro ve in vivo karaciğer rejenerasyonunu azalttığı gösterilmiştir (13, 143). Buna karşın antiandrojenlerin belirgin bir etkisi gösterilememiştir (144).

***GM-CSF:*** Granülosit makrofaj koloni stimulan faktör'ün, deneysel çalışmalarda hepatik rejenerasyonu artırdığı, kupffer hücrelerinin diferansiyasyon ve proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir (145).

***Diğerleri:*** Fibroblast büyüme faktörü (FGF), vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), triiyodotironin (T3), retinoik asit, bazı ilaçlar (barbütatlar, diazepam, hipolipidemik ajanlar, anti epileptik ajanlar), büyüme hormonu, PGE2, siklosporin, FK506, vazopressin gibi faktörlerin karaciğer rejenerasyonuna olumlu katkıları olduğu bildirilmektedir(8, 132, 146-148).

### 2.2.3. Karaciğer Rejenerasyonunu İnhibe Eden Faktörler

**TGF- $\beta$ 1:** Bilinen en önemli rejenerasyon inhibitörüdür. Ito hücreleri tarafından hepatektomi sonrası erken dönemde salgılanır. Rejenerasyon devam ettiği sürece  $\alpha$ 2-makroglobuline bağlı inaktif formundadır. Zamanı geldiğinde aktive olarak rejenerasyonu sonlandırır(8). Bu zamanlamayı etkileyen faktörler bilinmemektedir.

**IL-1:** Sentezinin kaynağı makrofajlar, B ve T hücreleri, NK hücreleri, endotelial hücreler, epitelyal 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 kandaki tespit edilebilirlik 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 (149).

### 2.3.Kimyasal Sempatektomi

Hayvan çalışmalarında hepatic sempatik sinirlerin cerrahi ya da kimyasal denervasyonu, bu sinirlerin fonksiyonunun araştırılması için genellikle standart bir yöntem olarak kullanılmaktadır.Çeşitli araştırmacılar mikrocerrahi (150, 151) ve hepatic sinir pleksusuna fenol solüsyonu uygulanarak yapılan lokal kimyasal sempatektomi (152-154) gibi işlemler geliştirmişlerdir. Bu işlemler büyük hayvanlarda etkilidir fakat fareler gibi küçük hayvanlarda uygulanması zordur. Bu nedenle günümüzde deneysel araştırmalar bazında iki ana kimyasal sempatektomi ajanı kullanılmaktadır. Bunlar 6-OH-DA ve guanetidin monosulfat'tır. Bunun dışında antiNGF antikoru ile de sıçanlarda immunosempatektomi yapılmıştır (155, 156).

6-OH-DA katekolaminerjik nöronlar üzerine bir nörotoksik ajan olarak etki etmektedir. Yenidoğan sıçanlarda 50-150 µg/g dozunda ve 3-7 gün süreyle uygulanan 6-OH-DA komplet ve sürekli bir sempatektomi oluşturarak harabiyet yaptığı gösterilmiştir. Aynı doz ve sürede erişkin sıçanlarda verildiğinde ise yine sempatik sinir uçlarında 6-8 hafta süreyle geçici bir blokaj yapmaktadır (155, 157).6-OH-DA etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak spesifik etkisinin katekolaminerjik nöronlarda bulunan bir transport mekanizması yoluyla selektif uptake ve akümüasyonu şeklinde olduğu ileri sürülmüştür. İlacın sitotoksitesinin hücre içinde hidrojen peroksit, süperoksit radikal, hidroksil radikal ve muhtemelen de kinolonlar gibi toksik ürünlerin oluşumuna yol açan otooksidasyonu kolaylaştırıcı etkisi ile bağlantılı olduğuna inanılmaktadır. Bu nedenle 6-OH-DA kimyasal sempatektomi amacıyla kullanılırken birlikte bir antioksidan maddenin de solüsyona ilave edilmesi önerilmektedir (155).

Kimyasal sempatektomi için kullanılan diğer bir madde olan guanetidin'in sıçanlara 25-60 mg/kg dozunda ve 2-10 hafta süreyle verilmesi yine yaşa bağımlı olarak sempatik gangliyonlarda hücre içi adrenerjik cisimciklerin reversibl veya irreversibl harabiyetine neden olmaktadır. Guanetidin sempatik sinir sisteminde postsinaptik blokaj yaparken, presinaptik terminaller üzerine etki etmez. 6-OH-DA'nın santral sempatektomi etkisi daha güçlü iken guanetidin'in periferik sempatektomi etkisi daha belirgindir (158).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın cerrahi aşamaları Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar Laboratuvarında gerçekleştirilmiş olup ilgili konularda Tıbbi Patoloji ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dallarının katkıları alınmıştır. Tüm deneysel işlemler 12.01.2010 tarihli Deneysel Hayvanlar Etik Kurul kararına uygun olarak yapılmıştır.

#### 3.1. Deneysel Model

Çalışmada Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar Laboratuvarında üretilmiş, ağırlığı 170-280 gram arasında değişen, 10-12 haftalık, 64 adet erkek Wistar-Albino türü sıçan kullanıldı. Deneysel hayvanlar, deney süresince 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusları olan, uygun oda sıcaklığı ve nem oranı otomatik olarak sağlanan odalarda, dördü gruplar halinde standart kafeslerde, uygun diyet ve çeşme suyu verilerek yaşatıldılar.

Günlük değişen rejeneratif cevabın etkisine engel olmak için ameliyatlar günün ilk yarısında yapıldı. Sıçanlar intraperitoneal 50 mg/kg ketamin (*Ketasol®*, *İnterhas Tıbbi ve Kimyevi Ürünler San. ve Tic. A.Ş.*) ve 10 mg/kg xylazine (*Kepron Xylazine®*, *Biopharm Aşı İlaç San. ve Tic. Ltd. Şti.*) ile anestezi sağlandıktan sonra tüm sıçanlar cerrahi işlem süresince spontan solunum ile ventile oldu.

Kimyasal sempatektomi oluşturmak için her bir sıçana beş gün süreyle 100 mg/kg/gün intraperitoneal 6-Hidroksidopamin hidrobromid (*6-Hydroxydopamine hydrobromide®*, *Sigma-Aldrich*) uygulandı (34, 155, 157). 6-OH-DA'nın oksidasyonunu engellemek için bir antioksidan olan Askorbik asit (*Redoxon®*, *Bayer*, 0,1 mg/mL) kullanıldı (34, 155).

### 3.1.1.Deney Grupları

Denekler her biri onaltı sıçandan oluşan dört ana gruba ayrıldı. Daha sonra bu gruplar eşit sayıda sıçan içerecek şekilde iki alt gruba ayrıldı. Plasebo olarak 1 mL steril serum fizyolojik (%0,9 NaCl) intraperitoneal yoldan beş gün süreyle uygulandı.

- **Grup 1 (Kontrol, n=16):**Beş gün süreyle plasebo uygulanıp daha sonra kontrol ameliyatı yapıldı.
  - **Grup 1A (n=8):**Kontrol ameliyatından iki gün sonra hepatektomi yapıldı.
  - **Grup 1B (n=8):**Kontrol ameliyatından on gün sonra hepatektomi yapıldı.
- **Grup 2 (Sempatektomi, n=16):**Beş gün süreyle 6-OH-DA uygulanıp daha sonra kontrol ameliyatı yapıldı.
  - **Grup 2A (n=8):** Kontrol ameliyatından iki gün sonra hepatektomi yapıldı.
  - **Grup 2B (n=8):**Kontrol ameliyatından on gün sonra hepatektomi yapıldı.
- **Grup 3 (Kontrol+PH, n=16):**Beş gün süreyle plasebo uygulanıp daha sonra PH yapıldı.
  - **Grup 3A (n=8):**PH'den iki gün sonra hepatektomi yapıldı.
  - **Grup 3B (n=8):** PH'den on gün sonra hepatektomi yapıldı.
- **Grup 4 (Sempatektomi+PH, n=16):**Beş gün süreyle 6-OH-DA uygulanıp daha sonra PH yapıldı.
  - **Grup 4A (n=8):**PH'den iki gün sonra hepatektomi yapıldı.
  - **Grup 4B (n=8):** PH'den on gün sonra hepatektomi yapıldı.

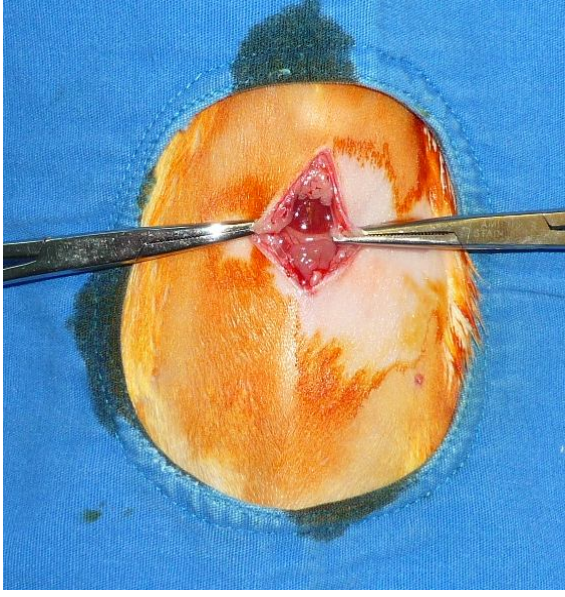
### 3.1.2. Cerrahi İşlem

Karın derisinin tüyleri tıraş edildikten sonra povidon iyot ile temizlenerek steril koşulları sağlandı. Orta hat insizyonla laparotomi yapıldı (Şekil 3.1.). Karına girildikten sonra falsiform ligament kesilerek karaciğer serbestleştirildi (Şekil 3.2.). Kontrol ameliyatına bu aşamada son verilirken, PH *Higgins* ve *Anderson*'un tanımladıkları yöntemine uygun olarak yapıldı (46). Buna göre median ve sol lateral loblar pediküllerinden 4/0 vicryl(*Pegelak*®, *Doğsan cerrahi dikiş malzemeleri*) ile bağlanarak %70'lik PH gerçekleştirildi (Şekil 3.3.).

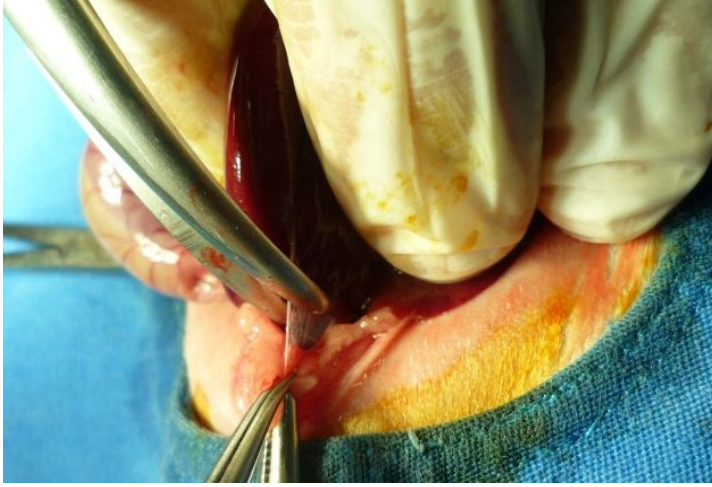
Ameliyat sonunda kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olunması için karın boşluğuna 10mL steril serum fizyolojik (%0,9 NaCl) verildi. Kanama kontrolü sonrası fasya ve kaslar 4/0 vicryl, cilt 4/0 ipek(*Silk*®,*Doğsan cerrahi dikiş malzemeleri*) sütün ile sürekli dikişlerle kapatıldı ve povidone iodine ile yara pansumanı yapıldı. Ameliyat sonrası 6. saatte su ve diyet alımına izin verildi. Ameliyat sonrası analjezi için parasetamol (*Parol*®, *Atabay*) 100 mg/kg/4saat oral yoldan verildi.

Sıçanlar deney gruplarında belirlenen günlerde cerrahi sırasında eksanguinasyon yöntemiyle (kanı boşaltma),abdominal aortadan ortalama 8mL kan alınarak sakrifiye edildi ve eş zamanlı hepatektomi yapıldı (Şekil 3.4.) Sakrifikasyon öncesi sıçanlar tartım terazisi(*Desis T28*®, *ETS Elektronik Tartım Sistemleri*) ile tartılarak kaydedildi. Hepatektomi ile çıkarılan rejenere karaciğerin nemli ağırlığı hassas analitik terazi(*Precisa 125A SCS*®, *Biltek Sanayi ve Tic. A.Ş*) kullanılarak ölçüldü ve kaydedildi.

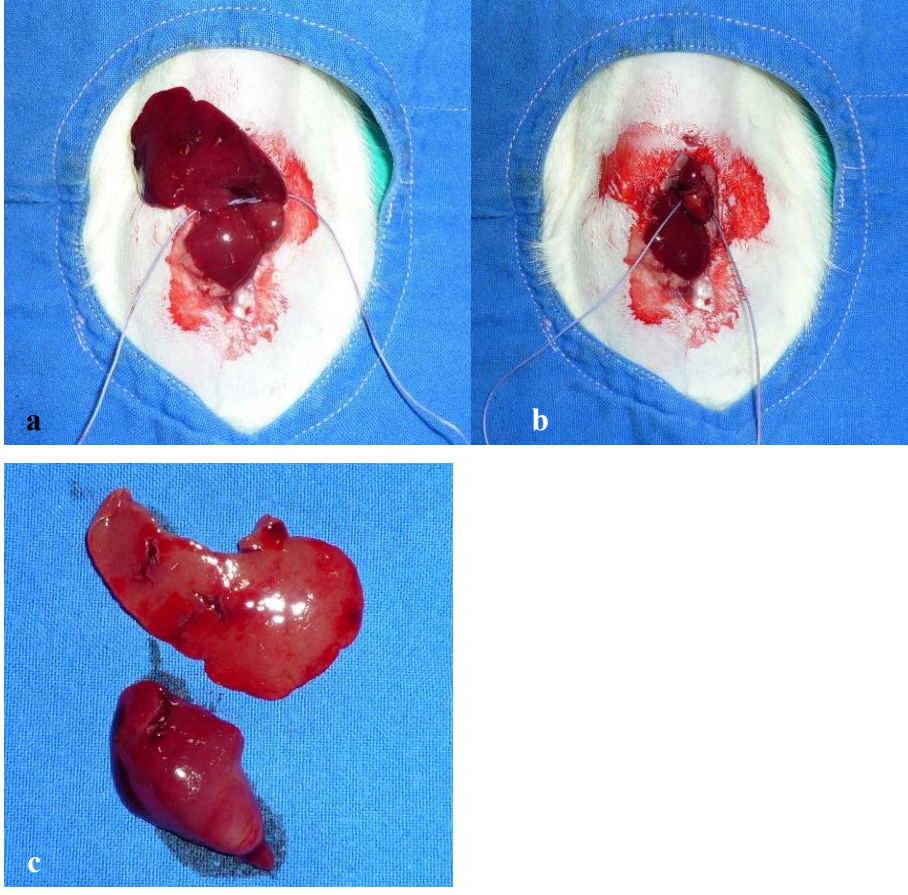
Doku örnekleri patolojik incelemeler için formol içinde uygun kaplara konularak patoloji laboratuvarına; kan örnekleri ise biyokimyasal incelemeler için kan toplama tüplerine(*BD Vacutainer*®, *U.K*) konularak soğuk (-4°C) saklama kabında hızla biyokimya laboratuvarına ulaştırıldı.



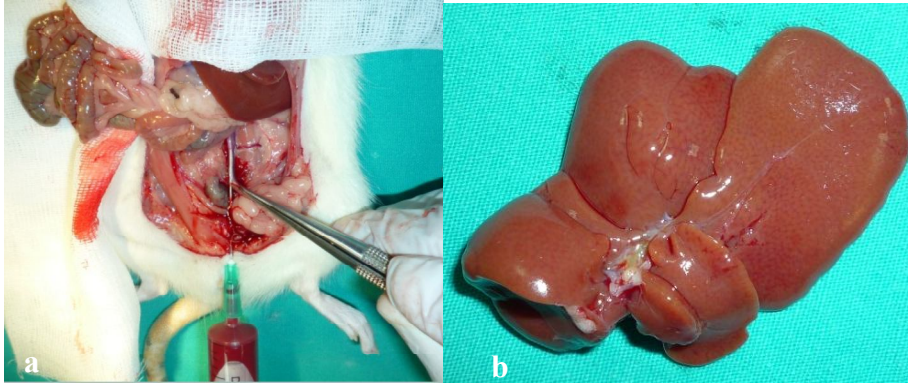
**Şekil 3.1.** Denek hayvanının karın bölgesinin hazırlanması ve laparotomi uygulaması.



**Şekil 3.2.**Falsiform ligamanın kesilerek karaciğerin serbestleştirilmesi.



**Şekil 3.3.** Sıçan karaciğerinin median (a) ve sol lateral (b) loblarının bağlanarak çıkarılması. Çıkarılan loblar (c).



**Şekil 3.4.** Cerrahi sırasında eksanguinasyon yöntemi (a) ve eş zamanlı hepatektomi yapılarak alınan rejenerer karaciğer dokusu (b).

### 3.2. Parametreler

#### 3.2.1. Morfolojik Parametreler

**Rejenerekaraciğer oranı (R):**Sakrifiye edilen sıçanın nemli karaciğer ağırlığının (K), sıçanın toplam vücut ağırlığına (V) oranının yüzdesi R değeri olarak ifade edildi.

$$R = K/V \times 100$$

Bu formülün kullanılması ile önce tüm sıçanlara ait R değerleri bulundu. Bundan sonra her alt grubu oluşturan 8 sıçanın R değerlerinin aritmetik ortalamaları alınarak alt gruba ait ortalama  $R \pm$  standart hata değerleri hesaplandı.

#### 3.2.2. Biyokimyasal Parametreler

Kontrol ameliyatı veya PH sonrası 2. ve 10. günlerde, sıçanların sakrifikasyonu esnasında alınan kan örnekleri Biyokimya Laboratuvarında santrifüj makinasında (*Eppendorf Centrifuge®*, 5810) 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıştırıldı. Bu serumlarda HGF, TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeyleri spesifik ELISA kitleri kullanılarak hesaplandı.

**i. Serum HGF Analizi:** Sıçan HGF kiti (*Rat HGF®*, *Cusabio*, *Cat. No: CSB-E07346r*) kullanılarak solid-faz sandviç ELİSA yöntemi ile yapıldı. Bu yöntemde monoklonal anti-rat HGF antikoruyla önceden kaplanmış 96 kuyucuk içeren mikropalaklar kullanıldı. Kuyucuklara eklenen serum ve standartlarda bulunan HGF, iki saatlik bir inkübasyon ile kuyucuklardaki antikorlara bağlandı ve bağlanmayan kısım uzaklaştırıldı. Ortama Biotinle işaretlenmiş ikincil antikor eklendi ve bir saat inkübasyon yapıldı. Yıkama aşaması ile bağlanmayan kısım uzaklaştırıldı. Daha sonra Streptavidin-horse radish peroksidaz konjugatı ortama eklenerek 60 dakika inkübasyon yapıldı. Bağlanmayan enzim ortamdan yıkama ile uzaklaştırılarak kromojenik substrat eklendi. İnkübasyon sonrası oluşan renk yoğunluğu 450 nm'de ölçüldü. Serum örneklerindeki HGF miktarları, standartlar yardımı ile çizilen eğriden hesaplandı. Sonuçlar pg/mL olarak verildi.

**ii. Serum TNF- $\alpha$  Analizi:** Sıçan TNF- $\alpha$  kiti (*Rat TNF- $\alpha$* ®, *Invitrogen, Cat. No: KRC3011*) kullanılarak solid-faz sandviç ELİSA yöntemi ile yapıldı. Bu yöntemde monoklonal anti-rat TNF- $\alpha$  antikoruyla önceden kaplanmış 96 kuyucuk içeren mikrolaklar kullanıldı. Kuyucuklara eklenen serum ve standartlarda bulunan TNF- $\alpha$ , iki saatlik bir inkübasyon ile bu antikorlarla bağlandı ve bağlanmayan kısım yıkamalar ile uzaklaştırıldı. Daha sonra ortama Biotinle işaretlenmiş ikinci antikor eklendi ve bir saat inkübasyon sonrasında yıkama aşaması tekrarlandı. Daha sonra Streptavidin-horse radish peroksidaz konjugatı ortama eklenerek 30 dakika inkübasyon yapıldı. Bağlanmayan enzim ortamdan yıkama ile uzaklaştırılarak substrat eklendi, inkübasyon sonrası oluşan renk yoğunluğu 450 nm'de ölçüldü. Serum örneklerindeki TNF- $\alpha$  miktarları, standartlar yardımı ile çizilen eğriden hesaplandı. Sonuçlar pg/mL olarak verildi.

**iii. Serum IL-6 Analizi:** Sıçan IL-6 kiti (*Rat IL-6*®, *RayBio, Cat. No: ELR-IL6-001*) kullanılarak solid-faz sandviç ELİSA yöntemi ile yapıldı. Bu yöntemde monoklonal anti-rat IL-6 antikoruyla önceden kaplanmış 96 kuyucuk içeren mikrolaklar kullanıldı. Kuyucuklara eklenen serum ve standartlarda bulunan IL-6, iki buçuk saatlik bir inkübasyon ile bu antikorlarla bağlandı ve bağlanmayan kısım yıkamalar ile uzaklaştırıldı. Daha sonra ortama Biotinle işaretlenmiş ikinci antikor eklendi ve bir saat inkübasyon sonrasında yıkama aşaması tekrarlandı. Daha sonra Streptavidin-horse radish peroksidaz konjugatı ortama eklenerek 45 dakika inkübasyon yapıldı. Bağlanmayan enzim ortamdan yıkama ile uzaklaştırılarak substrat eklendi, inkübasyon sonrası oluşan renk yoğunluğu 450 nm'de ölçüldü. Serum örneklerindeki IL-6 miktarları, standartlar yardımı ile çizilen eğriden hesaplandı. Sonuçlar pg/mL olarak verildi.

### 3.2.3. Histopatolojik Parametreler

**i. Mitotik İndeks:** %10'luk formol içinde saklanan karaciğer dokusu Hematoksilen-Eosine (H&E) ile boyanarak parafin bloklarda incelendi. Mitotik indeks; 10 büyük büyütme sahasında mitotik hepatositlerin sayısı hesaplanarak 1000 hücreye oranı şeklinde ifade edildi.

**ii.PCNA:** PCNA antikoruna ile boyanan hepatositler aşağıda tanımlanan immunohistokimyasal yöntemle belirlendi.

4-5 mikron kalınlığında parafin kesitler alındı ve 60 derecelik etüvde bir gece bırakıldı. İki kez 5'er dakika ksilol ve %100, %96, %70'lik alkol solüsyonlarında 5'er dakika deparafinize işlemin yapıldı ve çeşme suyuna alındı. Distile suya alınan kesitler Antijen Retreveal solüsyonunda [Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) veya citrate pH:6] 30dakika 98 derecede basınçlı ortamda kaynatılıp 20 dakika soğutulup distile suya alındı. %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 10 dakika muamele edilip distile su ve Tris ile tamponlanmış salin (TBS-Tween) 20 ile yıkandı. Protein bloklama solüsyonunda 20 dakika inkübe edilip, solüsyon fazlası döküldü. Uygun dilüsyondaki antikor solüsyondan 100'er mikrolitre lam üzerine uygulandı ve 1 saat inkübe edildi. Distile su ve TBS-Tween 20 ile yıkandı. İkincil antikor ile 15 dakika inkübe edildi. TBS-Tween 20 ile yıkandı. Strepto-avidin Link solüsyonu ile 15 dakika inkübe edilip distile su ve TBS-Tween 20 ile yıkandı. Diaminobenzidin(DAB) solüsyonu ile 1-5 dakika inkübe edilip distile su ve Tween 20 ile tekrar yıkandı. Hematoksilen ile 1 dakika zıt boyama yapıp alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra preparatlar kapatıldı.

Preparatlar ışık mikroskobunda 10 büyük büyütme sahasında PCNA ile boyanan hepatositlerin sayısı hesaplanarak 1000 hücreye oranı şeklinde ifade edildi.

**iii.Ki-67:**Ki-67 monoklonal antikoruna ile boyanan hepatositleryukarıda tanımlanan immünohistokimyasal yöntemle belirlendi.

Preparatlar ışık mikroskobunda 10 büyük büyütme sahasında Ki-67 ile boyanan hepatositlerin sayısı hesaplanarak 1000 hücreye oranı şeklinde ifade edildi.

**iv.Apoptotik indeks:**Rejenere karaciğer dokusundaki apoptotik değişiklikler immunohistokimyasal olarak TUNEL(Tdt-dUTP nick-end labeling) yöntemi ile hesaplanarak belirlendi.

**TUNEL Yöntemi:**4-5 mikron kalınlığında parafin kesitler alındı.Üç kez 5'er dakika ksilol ve iki kez 5'er dakika %100 alkol ve bir kez 5'er dakika %90, %80'lik alkol solüsyonlarında deparafinize işlemin yapıldı ve 2 dakika çeşme

suyunda yıkandı. Deparafinize edilen doku kesitleri distile suda yıkandıktan sonra 10-20µg/mL Proteinaz K ile muamele edilip 15 dakika oda ısısında bekletilerek inkübe edildi. Sonra 2 kez fosfat ile tamponlanmış salin (PBS) solüsyonu ile yıkandı. Kesitler oda ısısında endojen peroksidaz inaktivasyon solüsyonu (%3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile 5 dakika muamele edildikten sonra, PBS solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra TUNEL solüsyonu (*In situ Apoptosis Detection Kit*®, Takara) ile 37°C'de nemlendirilmiş odada 60-90 dakikasüresince inkübe edildi. Kurumasının önlenmesi için slaytlar lamel ile kapatıldı. Toplam 3 defa olacak şekilde 5'er dakika PBS solüsyonu ile yıkandı. 70 µl Anti-FITC HRP konjugatı ile karıştırılarak 30 dakika inkübe edildi. Toplam 3 defa olacak şekilde 5'er dakika PBS solüsyonu ile yıkandı. Oda sıcaklığında 10-15 dakika DAB solüsyonu ile inkübe edildikten sonra preparatlar distile su ile yıkandı. Son olarak %3'lük metilen yeşili ile boyandı. Işık mikroskopunda incelendi. 10 büyük büyütme sahasında TUNEL yöntemi ile boyanan hepatositlerin sayısı hesaplanarak 1000 hücreye oranı şeklinde ifade edildi.

### **3.3. İstatistiksel Analiz**

Gruplar arasında değişkenlerin farklılıklarını incelemek için parametrik test varsayımları kontrol edilip uygun olmadıkları saptandıktan sonra parametrik olmayan hipotez testlerinin kullanılmasına karar verildi. Grupların ikili karşılaştırılmalarında Mann-Whitney U testi kullanıldı. İki'den fazla grubun karşılaştırıldığı durumlar için ise Kruskal-Wallis varyans analizi ve bunu takiben ikili karşılaştırmalar amacıyla Mann-Whitney U testleri kullanıldı. Değişkenler arasındaki ilişki için ise Spearman korelasyon testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak kabul edildi. Değişkenler, ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. Tüm istatistiksel çözümler için Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows (18.0 version) paket programı, grafikler için ise GraphPad Prism (version 5.00) kullanıldı.

## 4. BULGULAR

Çalışma süresince PH yapılan gruplardan dört sıçan ameliyat sonrası erken dönemde kaybedildi. Kaybedilen sıçanların yerine yenileri konularak çalışmaya devam edildi. Tüm gruplarda, sakrifikasyon öncesi yapılan karın içi eksplorasyonlarında, makroskopik olarak olağandışı postoperatif değişiklikler gözlenmedi. Çalışma gruplarından elde edilen bulgular aşağıda belirtilmiştir:

### 4.1. Morfolojik Bulgular

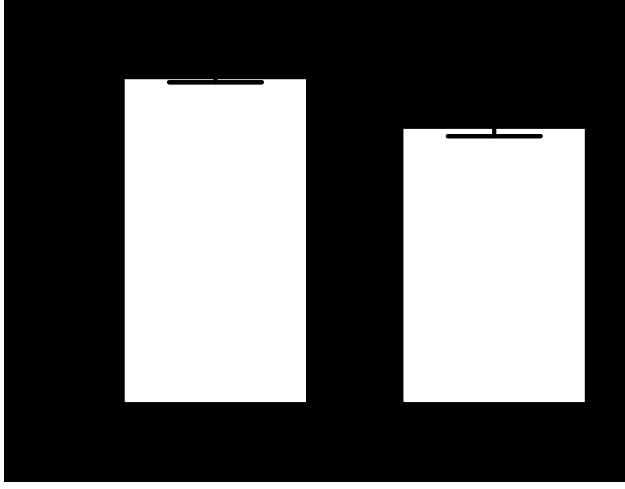
*Rejenere karaciğer oranı (R):* Grupların R değerleri Çizelge 4.1’de görülmektedir.

**Çizelge 4.1.** Grupların R değerleri (ortalama±standart hata).

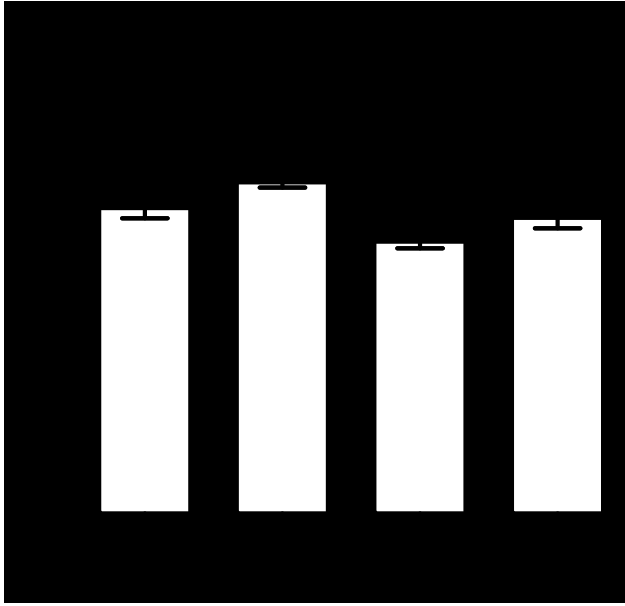
Grup	1		2		3		4	
	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
R değerleri	4,01 ± 0,13	3,77 ± 0,09	4,35 ± 0,06	3,69 ± 0,12	3,57 ± 0,08	3,51 ± 0,10	3,88 ± 0,13	4,17 ± 0,16

R değerleri için, her bir gruba ait alt grupların kendi aralarında (Grup 1A/1B; Grup 2A/2B; Grup 3A/3B; Grup 4A/4B) 2A ve 2B grupları dışında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ). 2A ve 2B grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p<0,002$ ; Şekil 4.1a.).

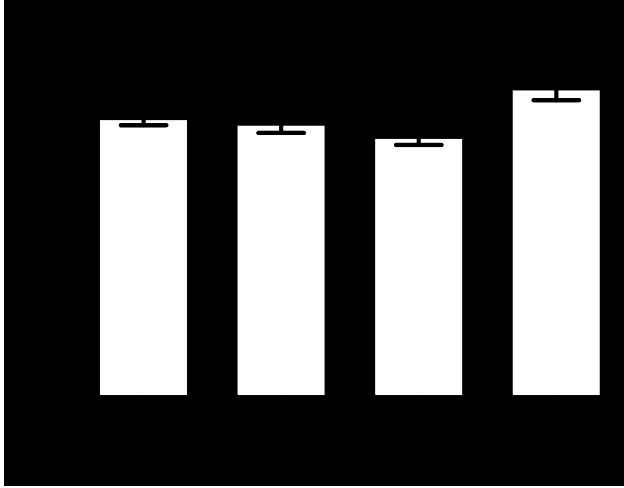
A alt gruplarının kendi aralarında ve B alt gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p<0,05$ ). Buna göre: Grup 1A ve Grup 2A ( $p<0,021$ ), Grup 1A ve Grup 3A ( $p<0,010$ ), Grup 2A ve Grup 3A ( $p<0,001$ ), Grup 2A ve Grup 4A ( $p<0,021$ ), Grup 2B ve Grup 4B ( $p<0,046$ ), Grup 3B ve Grup 4B ( $p<0,007$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttu (Şekil 4.1b. ve Şekil 4.1c.).



**Şekil 4.1a.** 2A ve 2B gruplarının R değerlerinde(ortalama±standart hata) anlamlı farklılık olduğunu gösteren grafik.

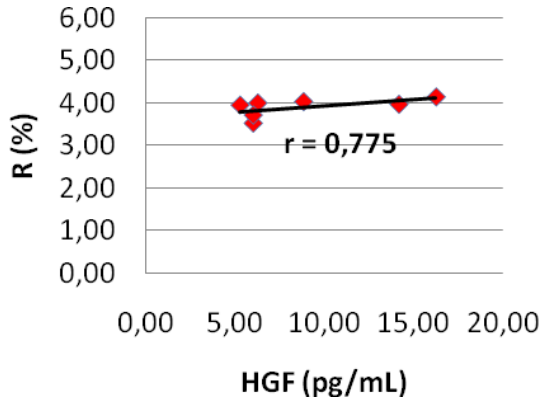


**Şekil 4.1b.** A alt gruplarına ait R değerlerini (ortalama±standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik.

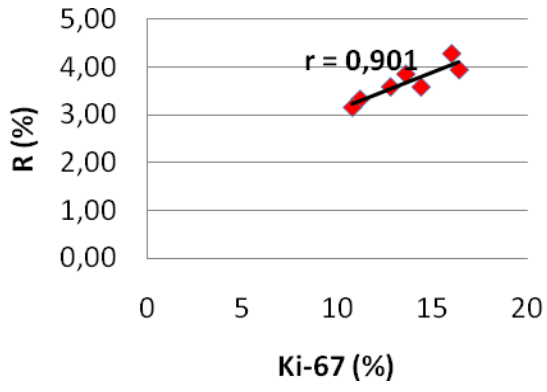


**Şekil 4.1c.**B alt gruplarına ait R değerlerini (ortalama±standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik.

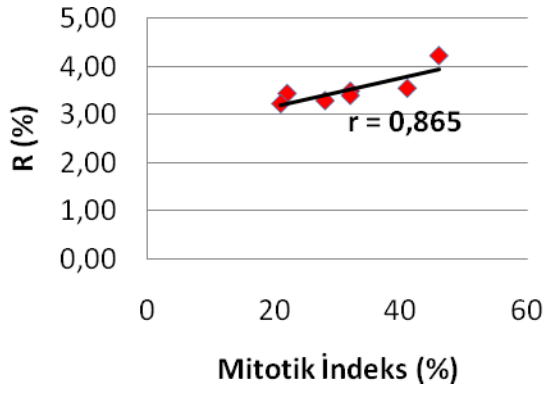
Yapılan korelasyon testinde R değerlerinin; Grup 1A'da HGF düzeyleri ile pozitif korele olduğu ( $p < 0,041$ ;  $r = 0,775$ ; Şekil 4.1d.), Grup 2B'de Ki-67 değerleriyle pozitif korele olduğu ( $p < 0,006$ ;  $r = 0,901$ ; Şekil 4.1e.), Grup 3B'de mitotik indeks ile pozitif korele olduğu ( $p < 0,012$ ;  $r = 0,865$ ; Şekil 4.1f.)saptandı.



**Şekil 4.1d.** Grup 1A'nın R değerlerinin HGF düzeyleri ile olan korelasyon grafiği.



**Şekil 4.1e.** Grup 2B'nin R değerlerinin Ki-67 değerleri ile olan korelasyon grafiği.



**Şekil 4.1f.** Grup 3B'nin R değerlerinin mitotik indeks ile olan korelasyon grafiği.

## 4.2. Biyokimyasal Bulgular

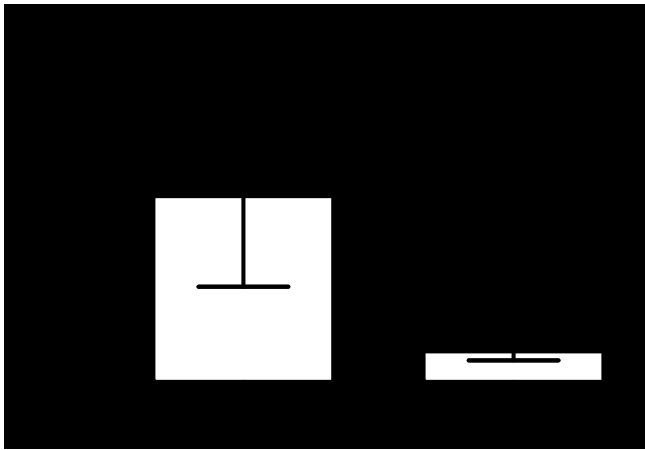
### 4.2.1.Serum HGF Bulguları

Grupların HGF düzeyleri Çizelge 4.2.1’de görülmektedir.

**Çizelge 4.2.1.** Grupların HGF düzeyleri (ortalama±standart hata).

Grup	1		2		3		4	
	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
HGF (pg/mL)	8,97 ± 1,67	17,50 ± 7,39	25,94 ± 18,93	9,51 ± 2,37	19,13 ± 7,65	15,23 ± 6,13	128,84 ± 62,85	21,20 ± 6,18

HGF düzeyleri için, her bir gruba ait alt grupların kendi aralarında değerlendirilmesi (Grup 1A/1B; Grup 2A/2B; Grup 3A/3B; Grup 4A/4B) sonucu 4A ve 4B grupları dışında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p > 0,05$ ). 4A ve 4B grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0,035$ ; Şekil 4.2.1a.).



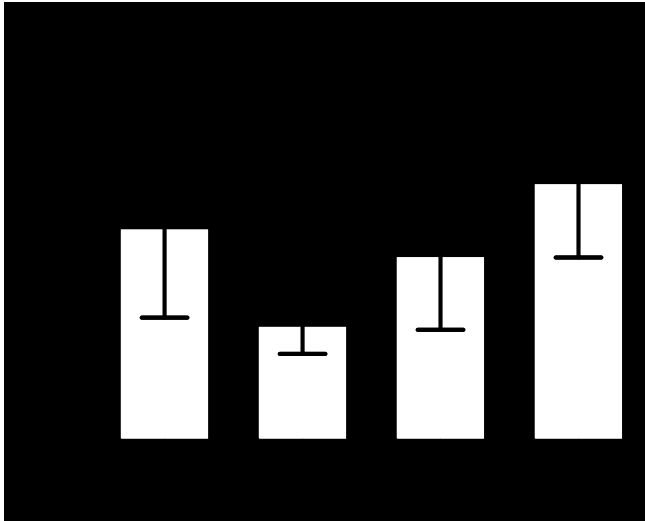
**Şekil 4.2.1a.** 4A ve 4B gruplarının HGF düzeylerinde (ortalama±standart hata) anlamlı farklılık olduğunu gösteren grafik.

A alt gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0,05$ ). Buna göre: Grup 1A ve Grup 4A ( $p < 0,002$ ), Grup 2A ve Grup

4A ( $p<0,002$ ), Grup 3A ve Grup 4A ( $p<0,002$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttu (Şekil 4.2.1b.). A alt grupları içinde 4A grubunun HGF düzeyi en yüksekti (Şekil 4.2.1b, "\*"). B alt gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ; Şekil 4.2.1c.).



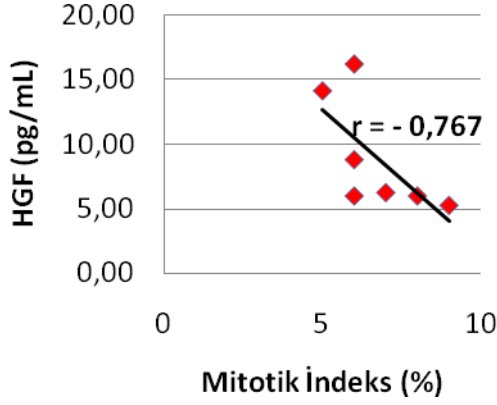
**Şekil 4.2.1b.** A alt gruplarının HGF düzeylerini (ortalama±standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik.



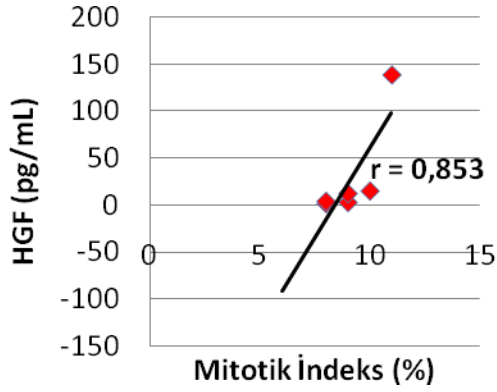
**Şekil 4.2.1c.** B alt gruplarının HGF düzeylerini (ortalama±standart hata) ve B alt grupları arasında anlamlı farklılığın olmadığını gösteren grafik.

Yapılan korelasyon testinde HGF düzeylerinin; Grup 1A'da mitotik indeks ile negatif korele olduğu ( $p<0,044$ ;  $r=-0,767$ ; Şekil 4.2.1d.), yine Grup 1A'da R değerleri ile pozitif korele olduğu ( $p<0,041$ ;  $r=0,775$ ; Bkz. Şekil 4.1c.), Grup

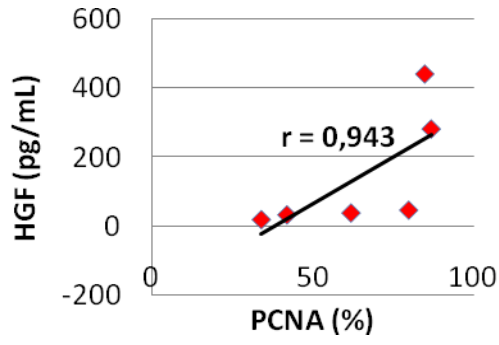
2A’da mitotik indeks ile pozitif korele olduğu ( $p<0,031$ ;  $r= 0,853$ ; Şekil 4.2.1e.), Grup 4A’daPCNAdeğerleri ile pozitif korele olduğu ( $p<0,005$ ;  $r= 0,943$ ; Şekil 4.2.1f.),Grup 1B’de TNF- $\alpha$  düzeyleri ile negatif korele olduğu ( $p<0,009$ ;  $r=-0,882$ ; Şekil 4.2.1g.), Grup 3B’de apoptotik indeks ile negatif korele olduğu ( $p<0,020$ ;  $r= -0,883$ ; Şekil 4.2.1h.) saptandı.



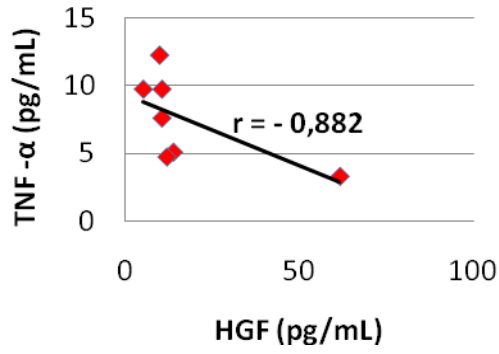
Şekil 4.2.1d. Grup 1A’nınHGF düzeylerinin mitotik indeks ile olan korelasyon grafiği.



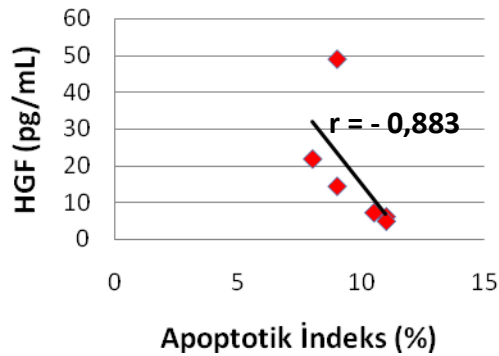
Şekil 4.2.1e. Grup 2A’nınHGF düzeylerinin mitotik indeks ile olan korelasyon grafiği.



Şekil 4.2.1f. Grup 4A'nın HGF düzeylerinin PCNA değerleri ile olan korelasyon grafiği.



Şekil 4.2.1g. Grup 1B'nin HGF düzeylerinin TNF-α düzeyleri ile olan korelasyon grafiği.



Şekil 4.2.1h. Grup 3B'nin HGF düzeylerinin apoptotik indeks ile olan korelasyon grafiği.

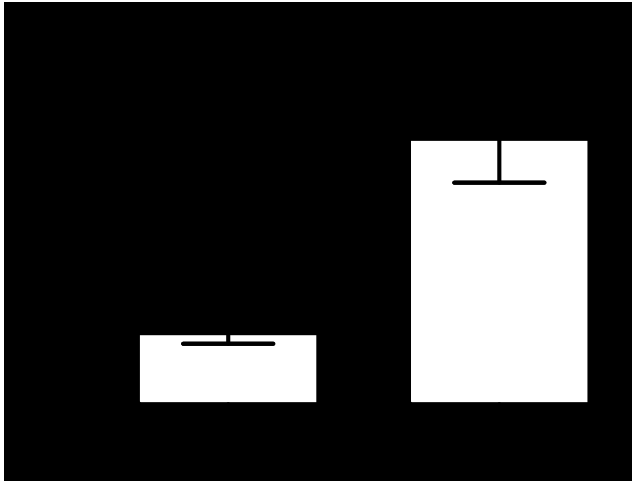
#### 4.2.2.Serum TNF- $\alpha$ Bulguları

Grupların TNF- $\alpha$  düzeyleri Çizelge 4.2.2’de görülmektedir.

**Çizelge 4.2.2.** Grupların TNF- $\alpha$  düzeyleri (ortalama  $\pm$  standart hata).

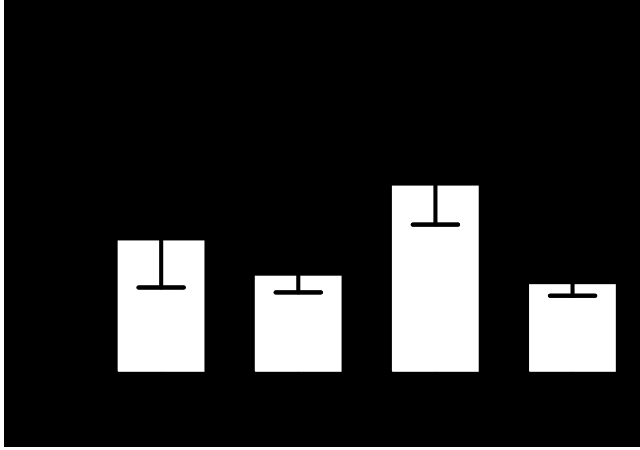
Grup	1		2		3		4	
	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	5,70 $\pm$ 2,06	7,50 $\pm$ 1,23	4,22 $\pm$ 0,78	4,43 $\pm$ 0,93	8,02 $\pm$ 1,73	8,28 $\pm$ 1,38	3,86 $\pm$ 0,57	14,41 $\pm$ 2,37

TNF- $\alpha$  düzeyleri için, her bir gruba ait alt grupların kendi aralarında değerlendirilmesi (Grup 1A/1B; Grup 2A/2B; Grup 3A/3B; Grup 4A/4B) sonucu 4A ve 4B grupları dışında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p > 0,05$ ). 4A ve 4B grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0,002$ ; Şekil 4.2.2a.). TNF- $\alpha$  düzeyi 4B grubunda 4A grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0,002$ ).

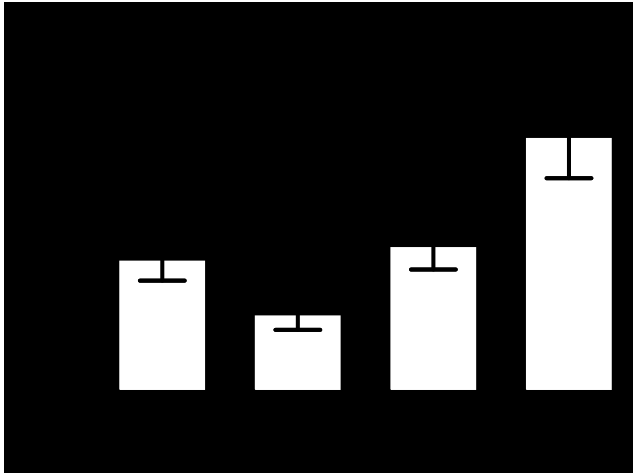


**Şekil 4.2.2a.** 4A ve 4B gruplarının TNF- $\alpha$  düzeylerinde (ortalama  $\pm$  standart hata) anlamlı farklılık olduğunu gösteren grafik.

A alt gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p > 0,05$ ; Şekil 4.2.2b.). B alt gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0,05$ ). Buna göre: Grup 1B ve Grup 4B ( $p < 0,010$ ), Grup 2B ve Grup 3B ( $p < 0,048$ ), Grup 2B ve Grup 4B ( $p < 0,003$ ), Grup 3B ve Grup 4B ( $p < 0,025$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttu (Şekil 4.2.2c.). B alt grupları içinde 4B grubunun TNF- $\alpha$  düzeyi en yüksekti (Şekil 4.2.2c, "\*\*").

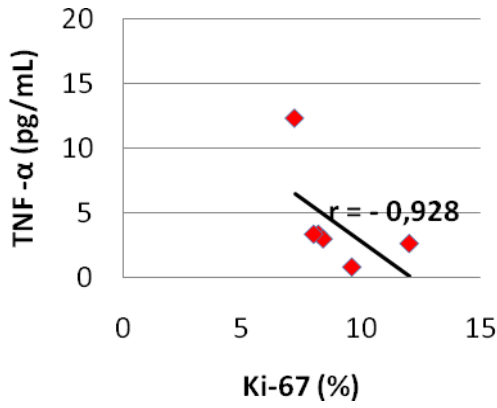


**Şekil 4.2.2b.** A alt gruplarının TNF- $\alpha$  düzeylerini (ortalama $\pm$ standart hata) ve A alt grupları arasında anlamlı farklılığın olmadığını gösteren grafik.

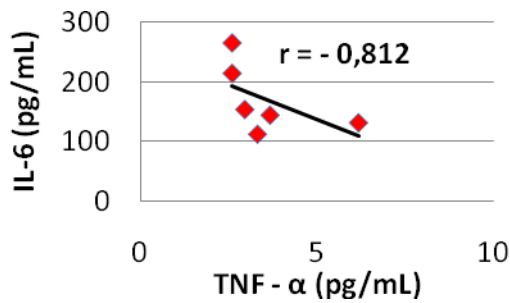


**Şekil 4.2.2c.** B alt gruplarının TNF- $\alpha$  düzeylerini (ortalama $\pm$ standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik.

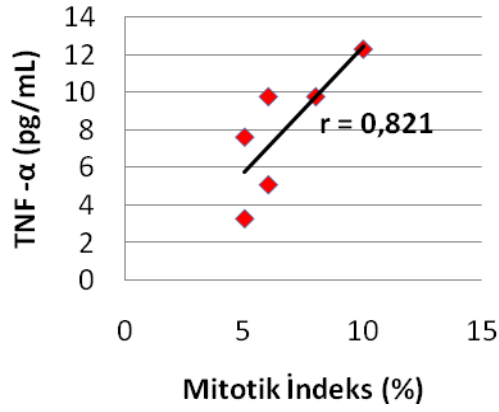
Yapılan korelasyon testinde TNF- $\alpha$  düzeylerinin; Grup 1A'da Ki-67 düzeyleri ile negatif korele olduğu ( $p < 0,008$ ;  $r = -0,928$ ; Şekil 4.2.2d.), Grup 4A'da IL-6 düzeyleri ile negatif korele olduğu ( $p < 0,050$ ;  $r = -0,812$ ; Şekil 4.2.2e.), Grup 1B'de mitotik indeksi ile pozitif korele olduğu ( $p < 0,045$ ;  $r = 0,821$ ; Şekil 4.2.2f.), yine Grup 1B'de HGF düzeyleri ile negatif korele olduğu ( $p < 0,009$ ;  $r = -0,882$ ; Bkz. Şekil 4.2.1g.), Grup 2B'de IL-6 düzeyleri ile pozitif korele olduğu ( $p < 0,005$ ;  $r = 0,943$ ; Şekil 4.2.2g.), Grup 3B'de Ki-67 değerleri ile pozitif korele olduğu ( $r = 1,000$ ; Şekil 4.2.2h.), Grup 4B'de PCNA değerleri ile pozitif korele olduğu ( $p < 0,005$ ;  $r = 0,940$ ; Şekil 4.2.2i.) saptandı.



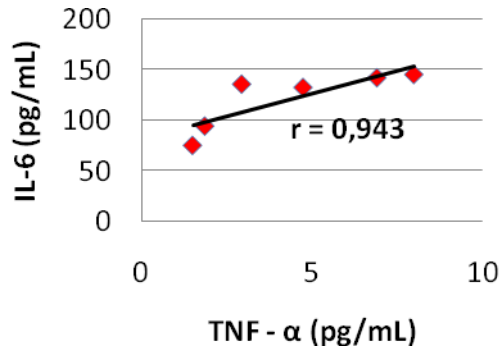
**Şekil 4.2.2d.** Grup 1A'nın TNF- $\alpha$  düzeylerinin Ki-67 değerleri ile olan korelasyon grafiği.



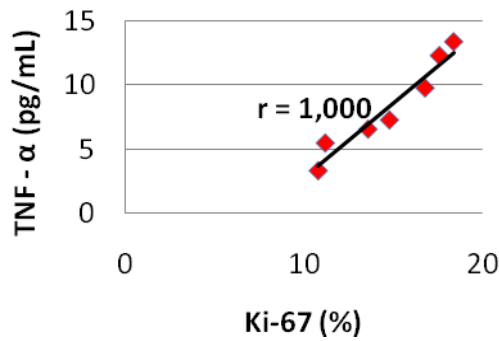
**Şekil 4.2.2e.** Grup 4A'nın TNF- $\alpha$  düzeylerinin IL-6 düzeyleri ile olan korelasyon grafiği.



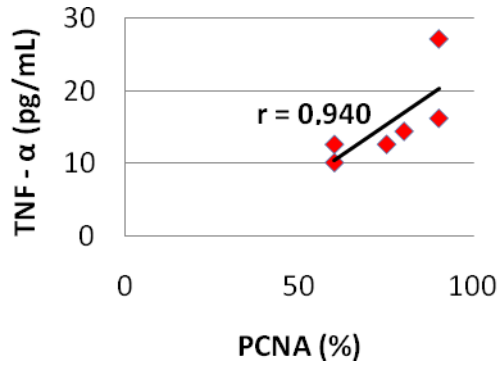
Şekil 4.2.2f. Grup 1B'ninTNF-α düzeylerinin mitotik indeks ile olan korelasyon grafiği.



Şekil 4.2.2g. Grup 2B'ninTNF-α düzeylerinin IL-6 düzeyleri ile olan korelasyon grafiği.



Şekil 4.2.2h. Grup 3B'ninTNF-α düzeylerinin Ki-67 değerleri ile olan korelasyon grafiği.



**Şekil 4.2.2i.** Grup 4B'nin TNF- $\alpha$  düzeylerinin PCNA değerleri ile olan korelasyon grafiği.

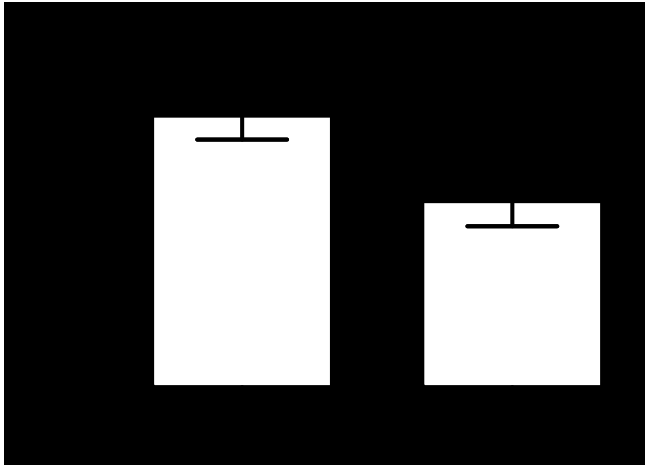
### 4.2.3.Serum IL-6 Bulguları

Grupların IL-6 düzeyleri Çizelge 4.2.3'de görülmektedir.

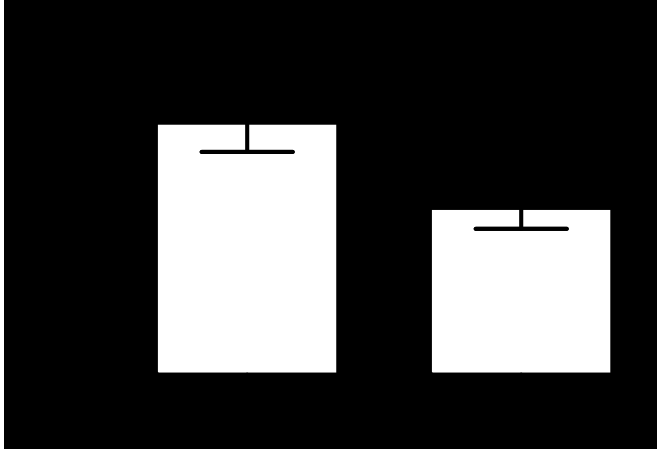
**Çizelge 4.2.3.** Grupların IL-6 düzeyleri (ortalama  $\pm$  standart hata).

Grup	1		2		3		4	
	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
IL-6 (pg/mL)	107,14 $\pm$ 4,25	130,67 $\pm$ 8,23	163,20 $\pm$ 18,31	116,18 $\pm$ 10,97	188,06 $\pm$ 16,61	128,84 $\pm$ 17,36	175,52 $\pm$ 20,36	116,18 $\pm$ 14,57

IL-6 düzeyleri için, her bir gruba ait alt grupların kendi aralarında değerlendirilmesi (Grup 1A/1B; Grup 2A/2B; Grup 3A/3B; Grup 4A/4B) sonucu Grup 3A ve Grup 3B ( $p < 0,025$ ), Grup 4A ve Grup 4B ( $p < 0,015$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (Şekil 4.2.3a. ve Şekil 4.2.3b.). Grup 1A ve Grup 1B, Grup 2A ve Grup 2B arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p > 0,05$ ).

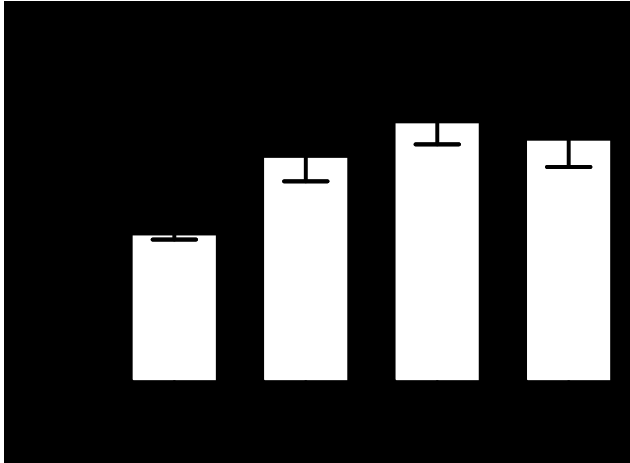


**Şekil 4.2.3a.** 3A ve 3B gruplarının IL-6 düzeylerini (ortalama  $\pm$  standart hata) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik.

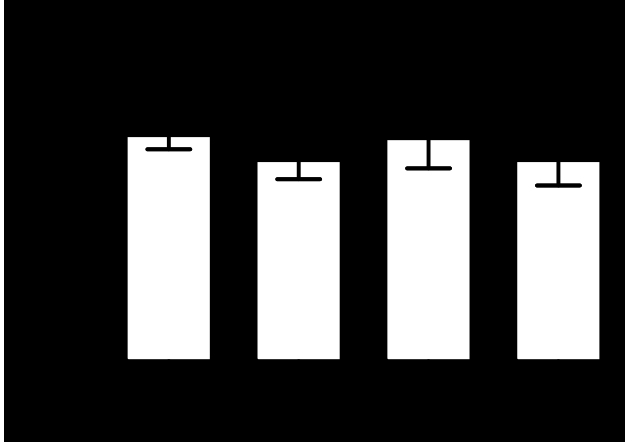


**Şekil 4.2.3b.** 4A ve 4B gruplarının IL-6 düzeylerini (ortalama±standart hata) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik.

A alt gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0,05$ ). Buna göre: Grup 1A ve Grup 2A ( $p < 0,005$ ), Grup 1A ve Grup 3A ( $p < 0,003$ ), Grup 1A ve Grup 4A ( $p < 0,003$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttu (Şekil 4.2.3c.). B alt gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p > 0,05$ ; Şekil 4.2.3d.).

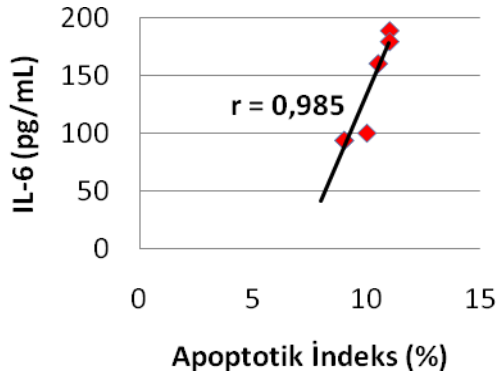


**Şekil 4.2.3c.** A alt gruplarının IL-6 düzeylerini (ortalama±standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik.



**Şekil 4.2.3d.**B alt gruplarının IL-6 düzeylerini (ortalama±standart hata) ve B alt grupları arasında anlamlı farklılığın olmadığını gösteren grafik.

Yapılan korelasyon testinde IL-6 düzeylerinin; Grup 4A’da TNF- $\alpha$  düzeyleri ile negatif korele olduğu ( $p < 0,050$ ;  $r = -0,812$ ; Bkz.Şekil 4.2.2e.), Grup 2B’de TNF- $\alpha$  düzeyleri ile pozitif korele olduğu ( $p < 0,050$ ;  $r = 0,943$ ; Bkz. Şekil 4.2.2g.),Grup 3B’de apoptotik indeks ile pozitif korele olduğu ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,985$ ; Şekil 4.2.3e.) saptandı.



**Şekil 4.2.3e.**Grup 3B’nin IL-6 düzeylerinin apoptotik indeks ile olan korelasyon grafiği.

### 4.3. Histopatolojik Bulgular

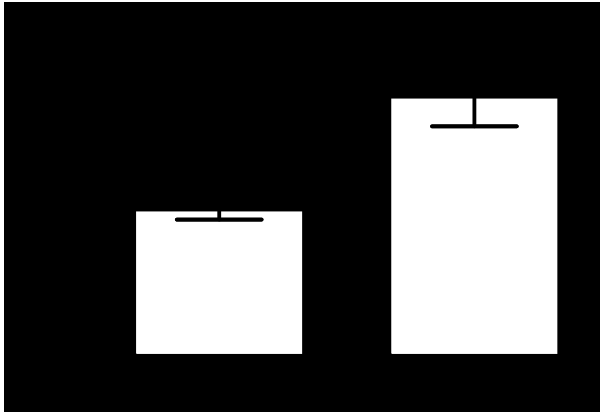
#### 4.3.1. Mitotik İndeks Bulguları

Grupların mitotik indeksleri Çizelge 4.3.1’de görülmektedir.

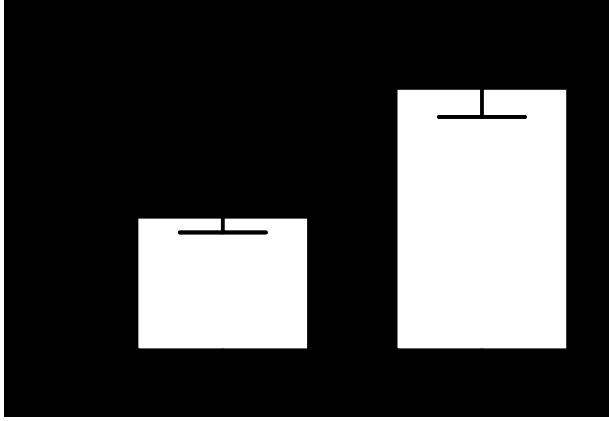
Çizelge 4.3.1. Grupların mitotik indeksleri (ortalama±standart hata).

Grup	1		2		3		4	
	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
Mitotik İndeks (%)	6,71 ± 0,52	7,00 ± 0,75	8,71 ± 0,60	15,42 ± 1,75	16,14 ± 1,89	31,71 ± 3,49	9,85 ± 0,50	19,14 ± 1,31

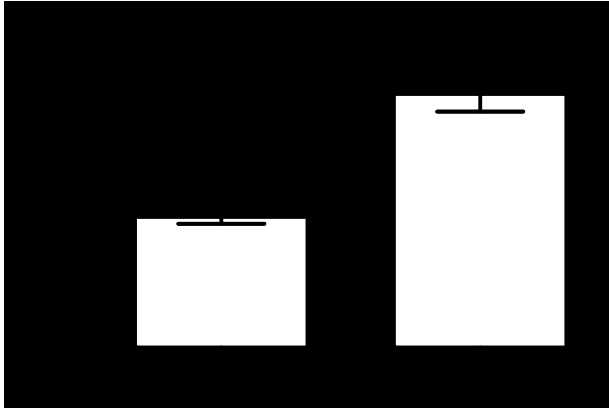
Mitotik indeksler için, her bir gruba ait alt grupların kendi aralarında değerlendirilmesi (Grup 1A/1B; Grup 2A/2B; Grup 3A/3B; Grup 4A/4B) sonucu Grup 2A ve Grup 2B ( $p < 0,003$ ), Grup 3A ve Grup 3B ( $p < 0,007$ ), Grup 4A ve Grup 4B ( $p < 0,002$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (Şekil 4.3.1a, Şekil 4.3.1b. ve Şekil 4.3.1c.). 1A ve 1B grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p > 0,05$ ).



Şekil 4.3.1a. 2A ve 2B gruplarının mitotik indekslerini (ortalama±standart hata) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik.

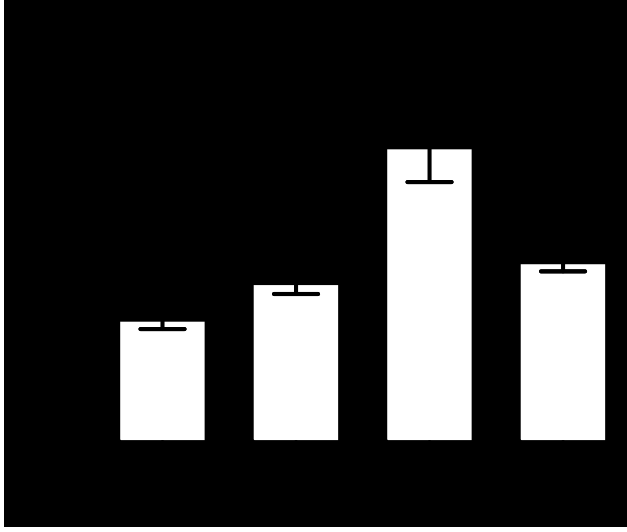


**Şekil 4.3.1b.**3A ve 3B gruplarının mitotik indekslerini (ortalama±standart hata) ve aralarında anlamlı farklılık olduğunu gösteren grafik.

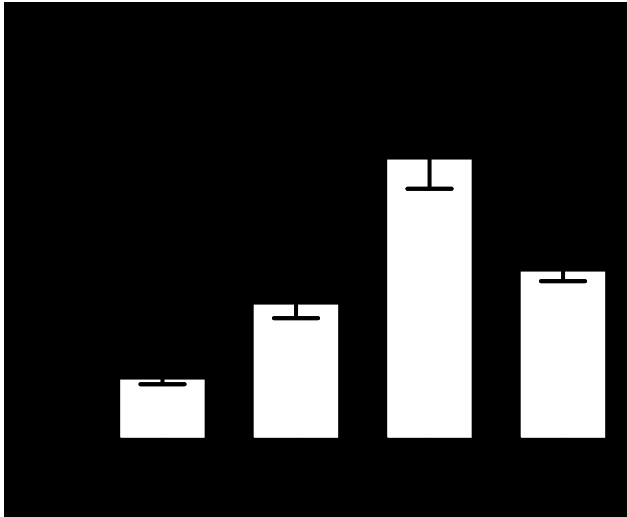


**Şekil 4.3.1c.**4A ve 4B gruplarının mitotik indekslerini (ortalama±standart hata) ve aralarında anlamlı farklılık olduğunu gösteren grafik.

A alt gruplarının kendi aralarında ve B alt gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0,05$ ). Buna göre: Grup 1A ve Grup 2A ( $p < 0,037$ ), Grup 1A ve Grup 3A ( $p < 0,002$ ), Grup 1A ve Grup 4A ( $p < 0,004$ ), Grup 2A ve Grup 3A ( $p < 0,004$ ), Grup 3A ve Grup 4A ( $p < 0,010$ ), Grup 1B ve Grup 2B ( $p < 0,002$ ), Grup 1B ve Grup 3B ( $p < 0,002$ ), Grup 1B ve Grup 4B ( $p < 0,002$ ), Grup 2B ve Grup 3B ( $p < 0,004$ ), Grup 3B ve Grup 4B ( $p < 0,005$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (Şekil 4.3.1d. ve Şekil 4.3.1e.) Mitotik indeksi en yüksek grup: A alt grupları içinde 3A grubu, B alt grupları içinde 3B grubu idi (Şekil 4.3.1d, "\*" ve Şekil 4.3.1e, "\*").



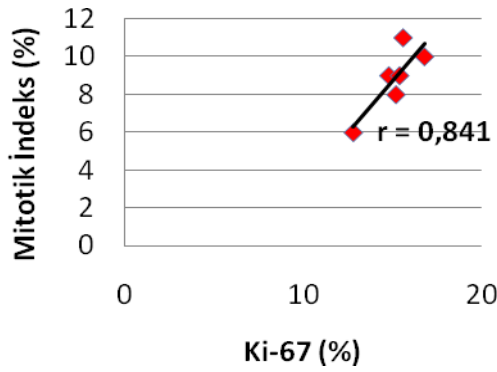
**Şekil 4.3.1d.**A alt gruplarının mitotik indekslerini (ortalama±standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik.



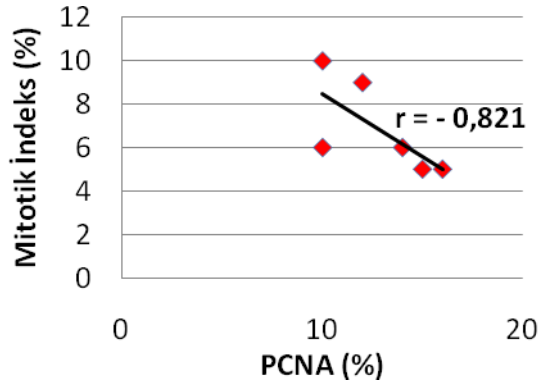
**Şekil 4.3.1e.** B alt gruplarının mitotik indekslerini (ortalama±standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik.

Yapılan korelasyon testinde mitotik indeksin; Grup 1A'da HGF düzeyleri ile

negatif korele olduğu ( $p<0,044$ ;  $r= -0,767$ ; Bkz.Şekil 4.2.1d.),Grup 2A’da Ki-67 değerleri ile pozitif korele olduğu ( $p<0,036$ ;  $r= 0,841$ ;Şekil 4.3.1f.), Grup 2A’daHGF düzeyleri ile pozitif korele olduğu ( $p<0,031$ ; $r= 0,853$ ; Bkz. Şekil 4.2.1e.),Grup 1B’deTNF- $\alpha$  düzeyleri ile pozitif korele olduğu ( $p<0,045$ ;  $r= 0,821$ ; Bkz. Şekil 4.2.2f.), yine Grup 1B’de PCNA değerleri ile negatif korele olduğu ( $p<0,045$ ;  $r= -0,821$ ; Şekil 4.3.1g.), Grup 3B’de R değerleri ile pozitif korele olduğu ( $p<0,012$ ;  $r= 0,865$ ; Bkz. Şekil 4.1e.)saptandı.

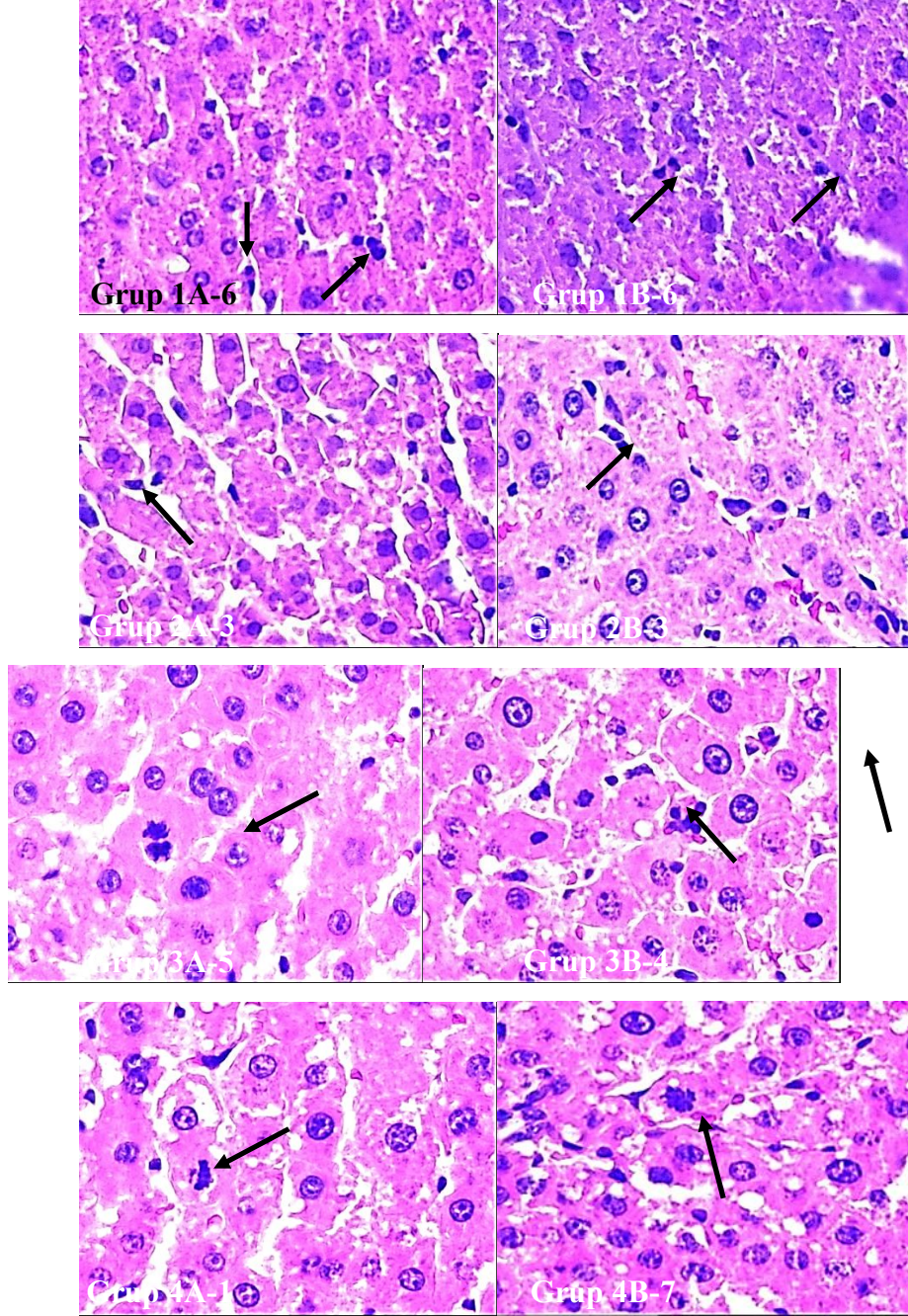


**Şekil 4.3.1f.** Grup 2A’nınmitotik indekslerinin Ki-67 değerleri ile olan korelasyon grafiği.



**Şekil 4.3.1g.** Grup 1B’ninmitotik indekslerinin PCNA değerleriile olan korelasyon grafiği.

Farklı gruptaki sıçanların karaciğer kesitlerindeki mitotik aktivite gösteren hepatositlere ait fotoğraflar Şekil 4.3.1h'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3.1h.Mitotik aktivite gösteren hepatositlere ait ışık mikroskobu fotoğrafları(x100).

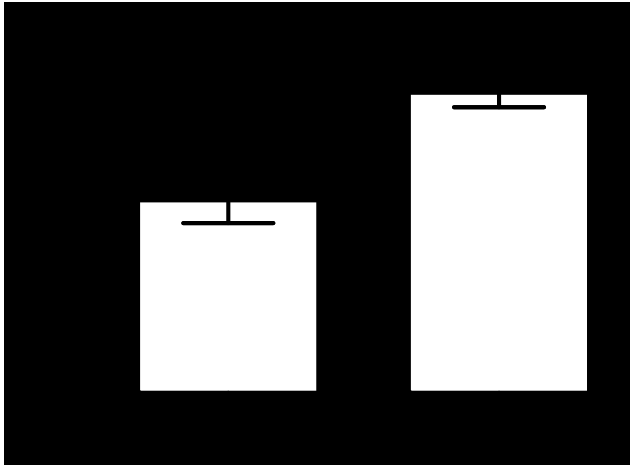
### 4.3.2. PCNA Bulguları

Grupların PCNA değerleri Çizelge 4.3.2’de görülmektedir.

**Çizelge 4.3.2.**Grupların PCNA değerleri (ortalama±standart hata).

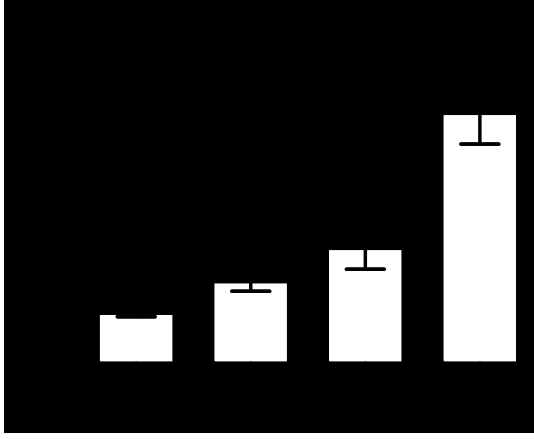
Grup	1		2		3		4	
	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
PCNA (%)	12,85 ± 0,88	12,71 ± 0,89	21,00 ± 2,48	32,71 ± 1,56	29,57 ± 5,38	27,14 ± 3,29	64,28 ± 7,91	76,42 ± 4,72

PCNA değerleri için,her bir gruba ait alt grupların kendi aralarında değerlendirilmesi (Grup 1A/1B; Grup 2A/2B; Grup 3A/3B; Grup 4A/4B) sonucu 2A ve 2B grupları dışında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ). 2A ve 2B grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p<0,004$ ; Şekil 4.3.2a.). 2B grubunun PCNA değerleri 2A grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ( $p<0,004$ ).

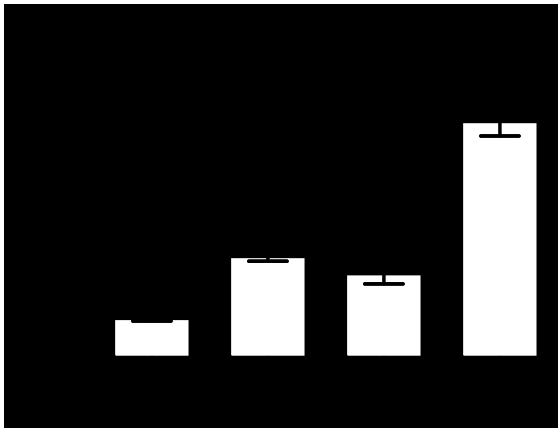


**Şekil 4.3.2a.** 2A ve 2B gruplarının PCNA değerlerini (ortalama±standart) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik.

A alt gruplarının kendi aralarında ve B alt gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu( $p<0,05$ ). Buna göre:Grup 1A ve Grup 2A ( $p<0,021$ ), Grup 1A ve Grup 3A ( $p<0,009$ ), Grup 1A ve Grup 4A ( $p<0,002$ ), Grup 2A ve Grup 4A ( $p<0,002$ ), Grup 3A ve Grup 4A ( $p<0,009$ ),Grup 1B ve Grup 2B ( $p<0,002$ ), Grup 1B ve Grup 3B ( $p<0,002$ ), Grup 1B ve Grup 4B ( $p<0,002$ ), Grup 2B ve Grup 4B ( $p<0,002$ ), Grup 3B ve Grup 4B ( $p<0,002$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttu (Şekil 4.3.2b. ve Şekil 4.3.2c.). PCNA değeri en yüksek grup: A alt grupları içinde 4A grubu, B alt grupları içinde 4B grubu idi (Şekil 4.3.2b, "\*" ve Şekil 4.3.2c, "\*").

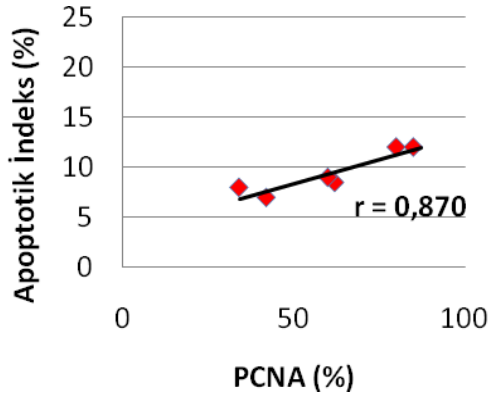


**Şekil 4.3.2b.**A alt gruplarının PCNA değerlerini (ortalama±standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik.

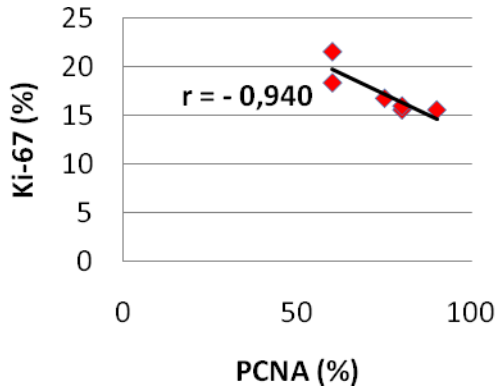


**Şekil 4.3.2c.**B alt gruplarının PCNA değerlerini (ortalama±standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik.

Yapılan korelasyon testinde PCNA değerlerinin; Grup 4A'da HGF düzeyleri ile pozitif korele olduğu ( $p < 0,005$ ;  $r = 0,943$ ; Bkz.Şekil 4.2.1f.), yine Grup 4A'da apoptotik indeks ile pozitif korele olduğu ( $p < 0,024$ ;  $r = 0,870$ ; Şekil 4.3.2d.), Grup 1B'de mitotik indeksi ile negatif korele olduğu ( $p < 0,045$ ;  $r = -0,821$ ; Bkz. Şekil 4.3.1g.), Grup 4B'de TNF- $\alpha$  düzeyleri ile pozitif korele olduğu ( $p < 0,005$ ;  $r = 0,940$ ; Bkz. Şekil 4.2.2i.), yine Grup 4B'de Ki-67 değerleri ile negatif korele olduğu ( $p < 0,005$ ;  $r = -0,940$ ; Şekil 4.3.2e.) saptandı.

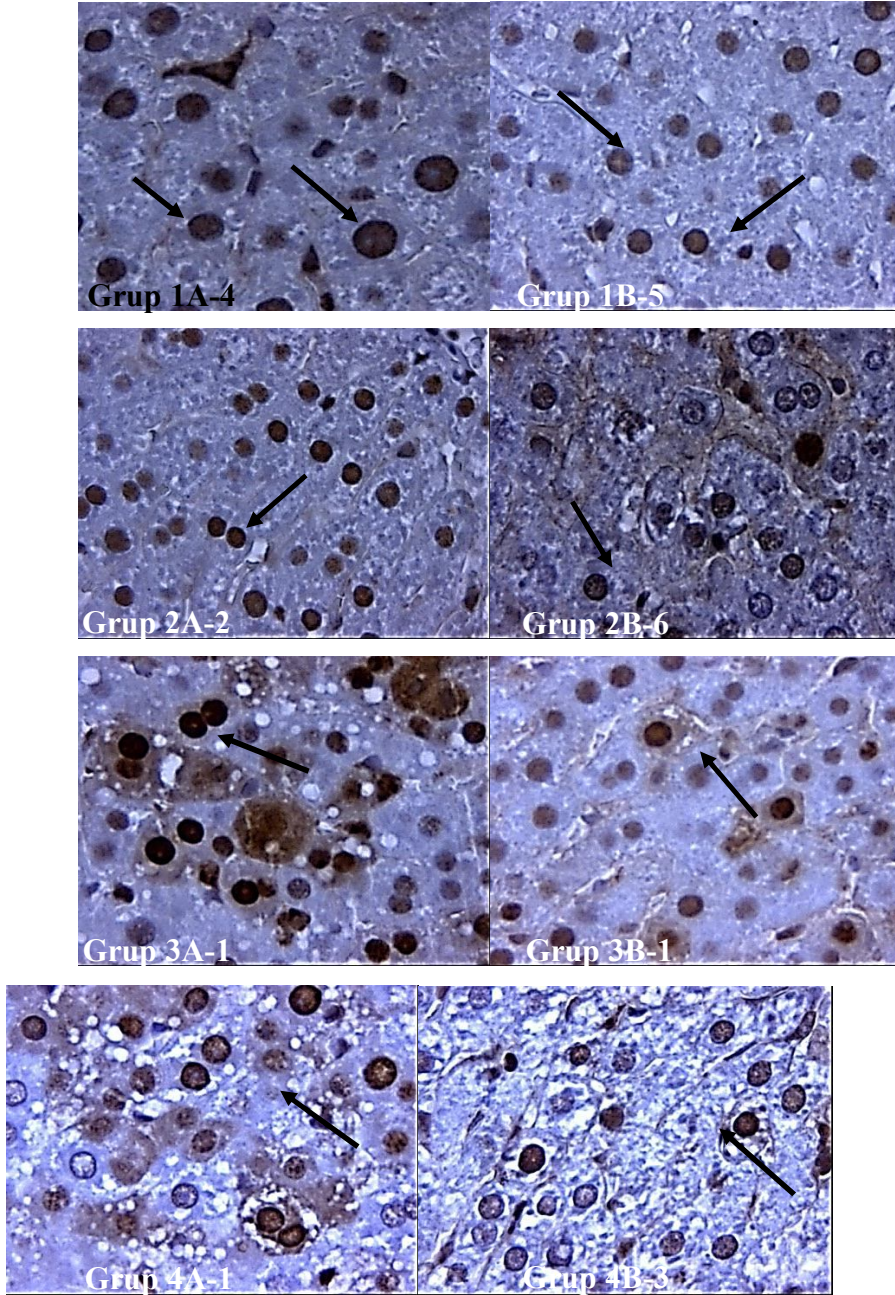


**Şekil 4.3.2d.** Grup 4A'nın PCNA değerlerinin apoptotik indeks ile olan korelasyon grafiği.



**Şekil 4.3.2e.** Grup 4B'nin PCNA değerlerinin Ki-67 değerleriyle olan korelasyon grafiği.

Farklı gruplardaki sıçanların karaciğer kesitlerindeki PCNA antikoru ile boyanan hepatositlere ait fotoğraflar Şekil 4.3.2f'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3.2f.PCNA antikoru ile boyanan hepatositlere ait ışık mikroskopi fotoğrafları (x100).

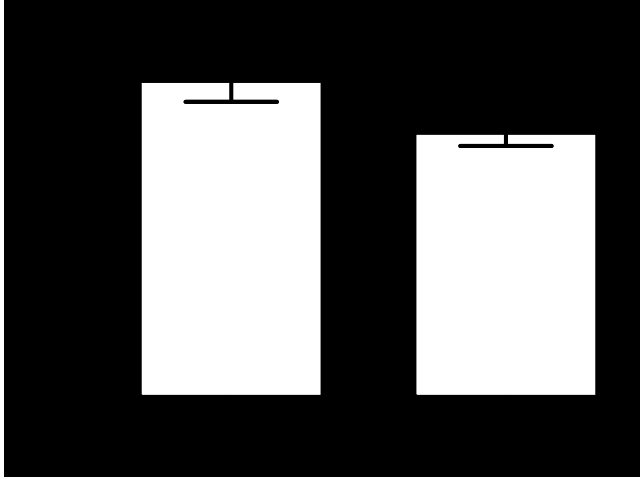
### 4.3.3. Ki-67 Bulguları

Grupların Ki-67 değerleri Çizelge 4.3.3’de görülmektedir.

**Çizelge 4.3.3.** Grupların Ki-67 değerleri (ortalama±standart hata).

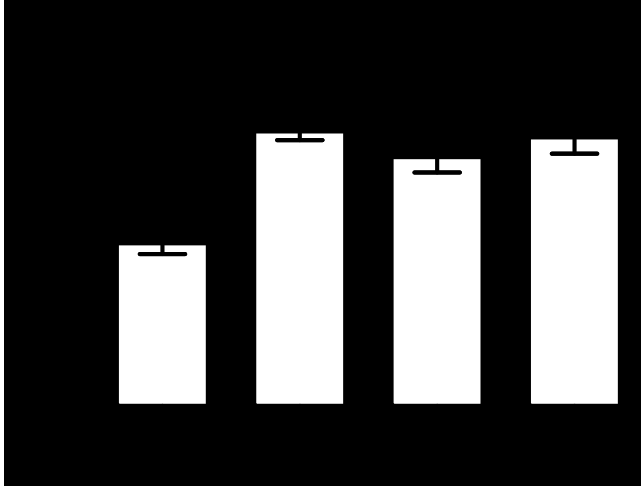
Grup	1		2		3		4	
	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
Ki-67 (%)	8,88	7,42	15,00	13,60	13,60	14,74	14,68	17,77
	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,58	0,36	0,46	0,82	0,83	1,14	0,89	0,91

Ki-67 değerleri için, her bir gruba ait alt grupların kendi aralarında değerlendirilmesi (Grup 1A/1B; Grup 2A/2B; Grup 3A/3B; Grup 4A/4B) sonucu Grup 1A ve Grup 1B grupları dışında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p > 0,05$ ). 1A ve 1B grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0,046$ ; Şekil 4.3.3a.).

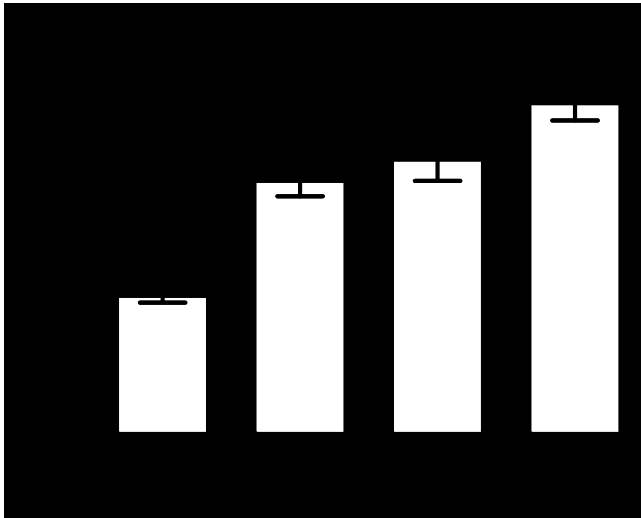


**Şekil 4.3.3a.** 1A ve 1B gruplarının Ki-67 değerlerini (ortalama±standart hata) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik.

A alt gruplarının kendi aralarında ve B alt gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0,05$ ). Buna göre: Grup 1A ve Grup 2A ( $p < 0,002$ ), Grup 1A ve Grup 3A ( $p < 0,004$ ), Grup 1A ve Grup 4A ( $p < 0,003$ ), Grup 1B ve Grup 2B ( $p < 0,002$ ), Grup 1B ve Grup 3B ( $p < 0,002$ ), Grup 1B ve Grup 4B ( $p < 0,002$ ), Grup 2B ve Grup 4B ( $p < 0,015$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (Şekil 4.3.3b. ve Şekil 4.3.3c.).

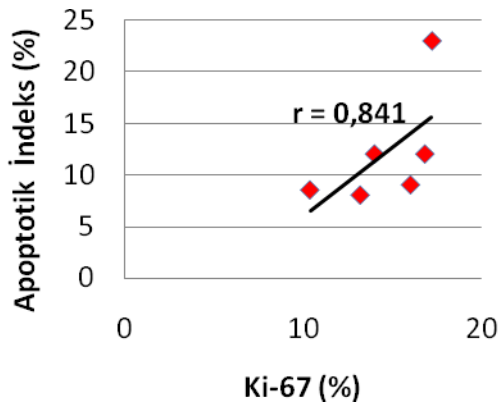


**Şekil 4.3.3b.** A alt gruplarının Ki-67 değerlerini (ortalama  $\pm$  standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik.



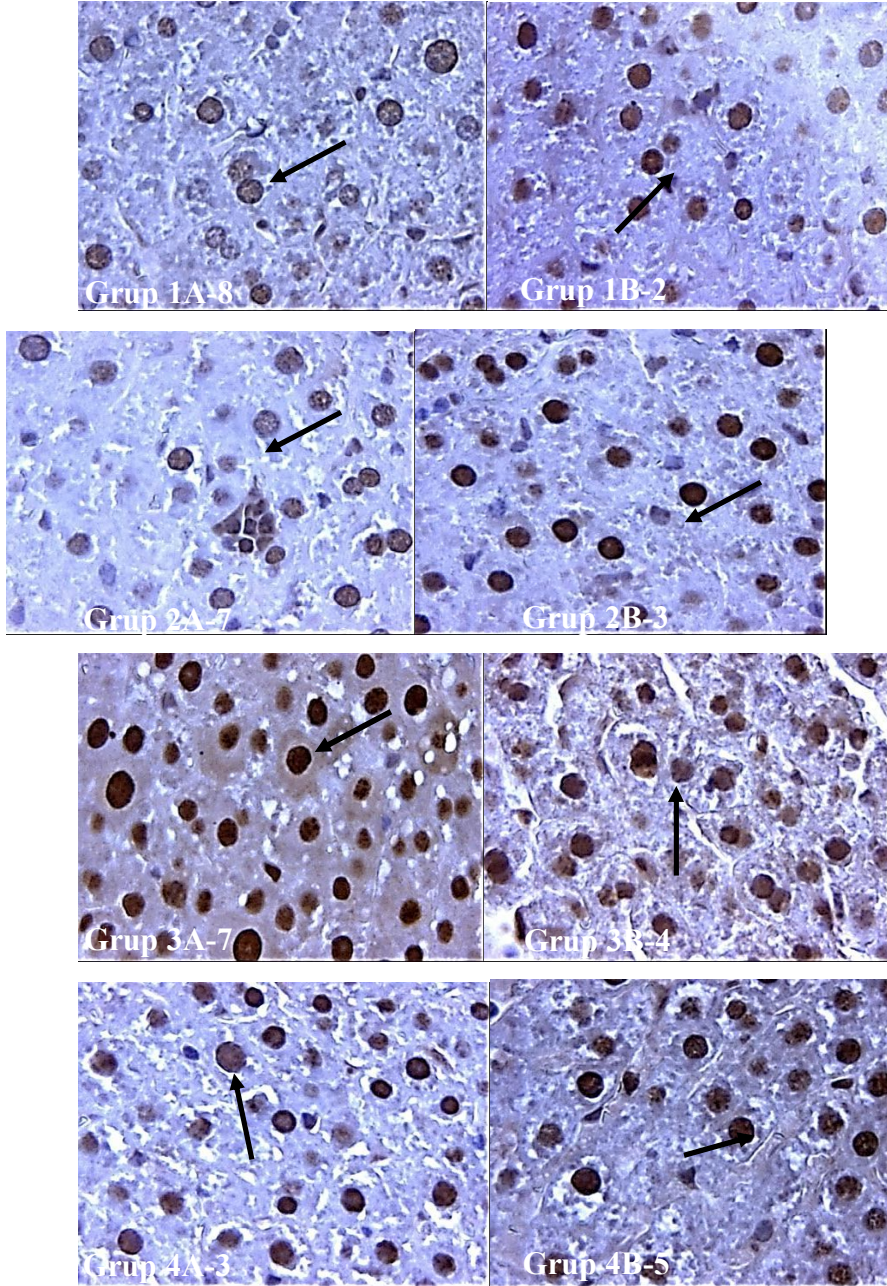
**Şekil 4.3.3c.** B alt gruplarının Ki-67 değerlerini (ortalama  $\pm$  standart hata) ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları gösteren grafik.

Yapılan korelasyon testinde Ki-67 değerlerinin; Grup 1A'da TNF- $\alpha$  düzeyleri ile negatif korele olduğu ( $p < 0,008$ ;  $r = -0,928$ ; Bkz.Şekil 4.2.2d.), Grup 2A'da mitotik indeksi ile pozitif korele olduğu ( $p < 0,036$ ;  $r = 0,841$ ; Bkz. Şekil 4.3.1f.), Grup 4A'daapoptotikindeks ile pozitif korele olduğu ( $p < 0,036$ ;  $r = 0,841$ ; Şekil 4.3.3d.), Grup 2B'de R değerleri ile pozitif korele olduğu ( $p < 0,006$ ;  $r = 0,901$ ; Bkz. Şekil 4.1d.), Grup 3B'de TNF- $\alpha$  düzeyleri ile pozitif korele olduğu ( $r = 1,000$ ; Bkz. Şekil 4.2.2h.), Grup 4B'de PCNAdeğerleri ile negatif korele olduğu ( $p < 0,005$ ;  $r = -0,940$ ; Bkz. Şekil 4.3.2e.)saptandı.



**Şekil 4.3.3d.**Grup 4A'nınKi-67 değerlerinin apoptotik indeks ile olan korelasyon grafiği.

Farklı gruplardaki sıçanların karaciğer kesitlerindeki Ki-67 antikoruna ile boyanan hepatositlere ait fotoğraflar Şekil 4.3.3e’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3.3e.Ki-67 antikoruna ile boyanan hepatositlere ait ışık mikroskobisi fotoğrafları (x100).

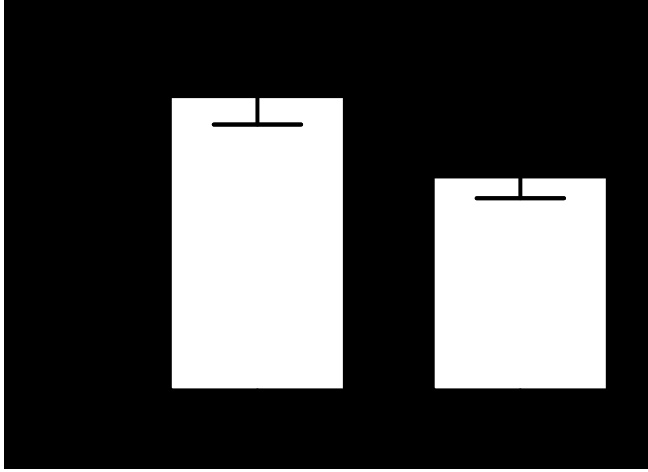
#### 4.3.4. Apoptotik İndeks Bulguları

Grupların apoptotik indeksleri Çizelge 4.3.4a'da görülmektedir.

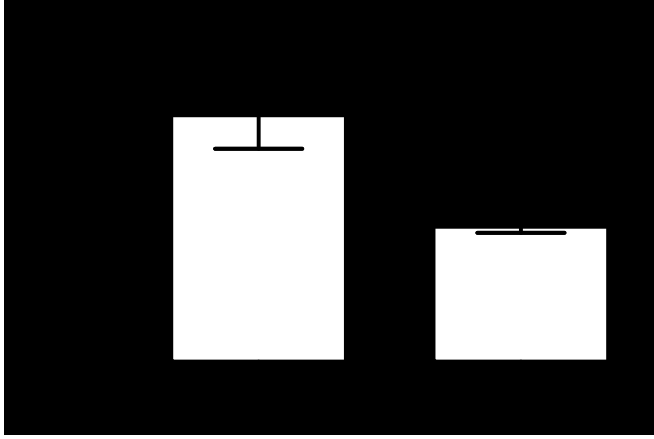
Çizelge 4.3.4a. Grupların apoptotik indeksleri (ortalama±standart hata).

Grup	1		2		3		4	
	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
Apoptotik İndeks (%)	9,00 ± 0,81	9,85 ± 0,88	12,57 ± 1,21	9,14 ± 0,93	17,85 ± 2,42	9,78 ± 0,43	11,35 ± 2,07	23,42 ± 1,83

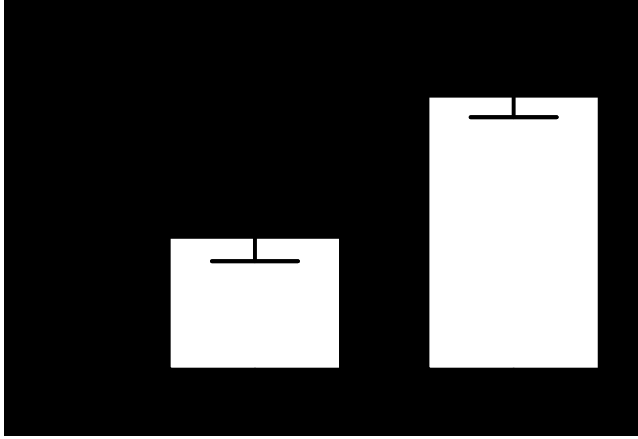
Apoptotik indeks için, her bir gruba ait alt grupların kendi aralarında değerlendirilmesi (1A/1B; 2A/2B; 3A/3B; 4A/4B) sonucu Grup 2A ve Grup 2B ( $p < 0,044$ ), Grup 3A ve Grup 3B ( $p < 0,007$ ), Grup 4A ve Grup 4B ( $p < 0,010$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (Şekil 4.3.4a, Şekil 4.3.4b, Şekil 4.3.4c.). 1A ve 1B grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p > 0,05$ ).



Şekil 4.3.4a. 2A ve 2B gruplarının apoptotik indekslerini (ortalama±standart hata) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik.

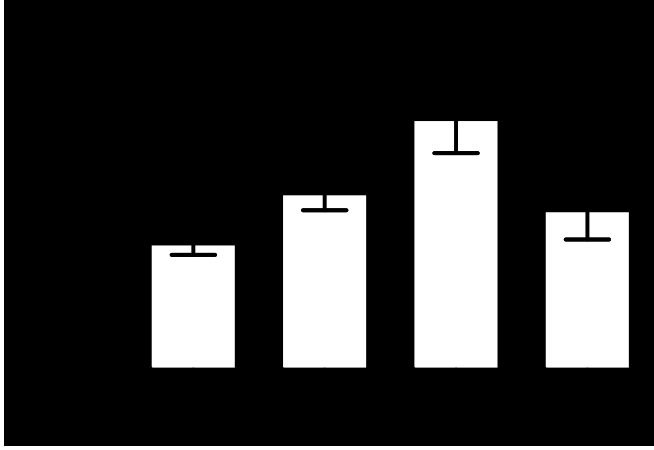


**Şekil 4.3.4b.**3A ve 3B gruplarının apoptotik indekslerini (ortalama±standart hata) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik.

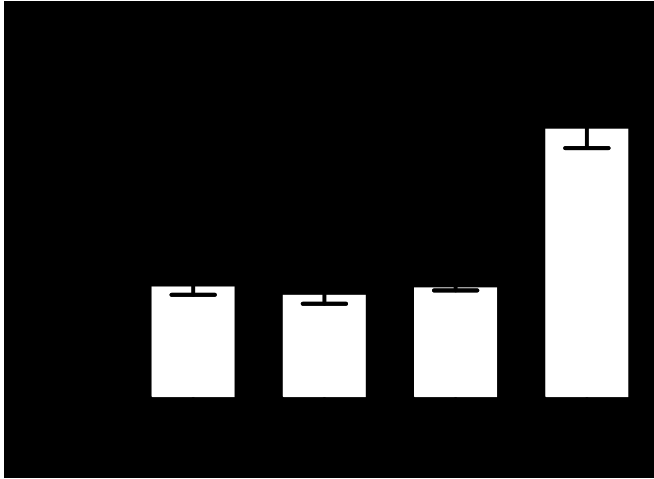


**Şekil 4.3.4c.**4A ve 4B gruplarının apoptotik indekslerini (ortalama±standart hata) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik.

A alt gruplarının kendi aralarında ve B alt gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0,05$ ). Buna göre: Grup 1A ve Grup 2A ( $p < 0,034$ ), Grup 1A ve Grup 3A ( $p < 0,006$ ), Grup 3A ve Grup 4A ( $p < 0,040$ ), Grup 1B ve Grup 4B ( $p < 0,002$ ), Grup 2B ve Grup 4B ( $p < 0,002$ ), Grup 3B ve Grup 4B ( $p < 0,002$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (Şekil 4.3.4d. ve Şekil 4.3.4e.).



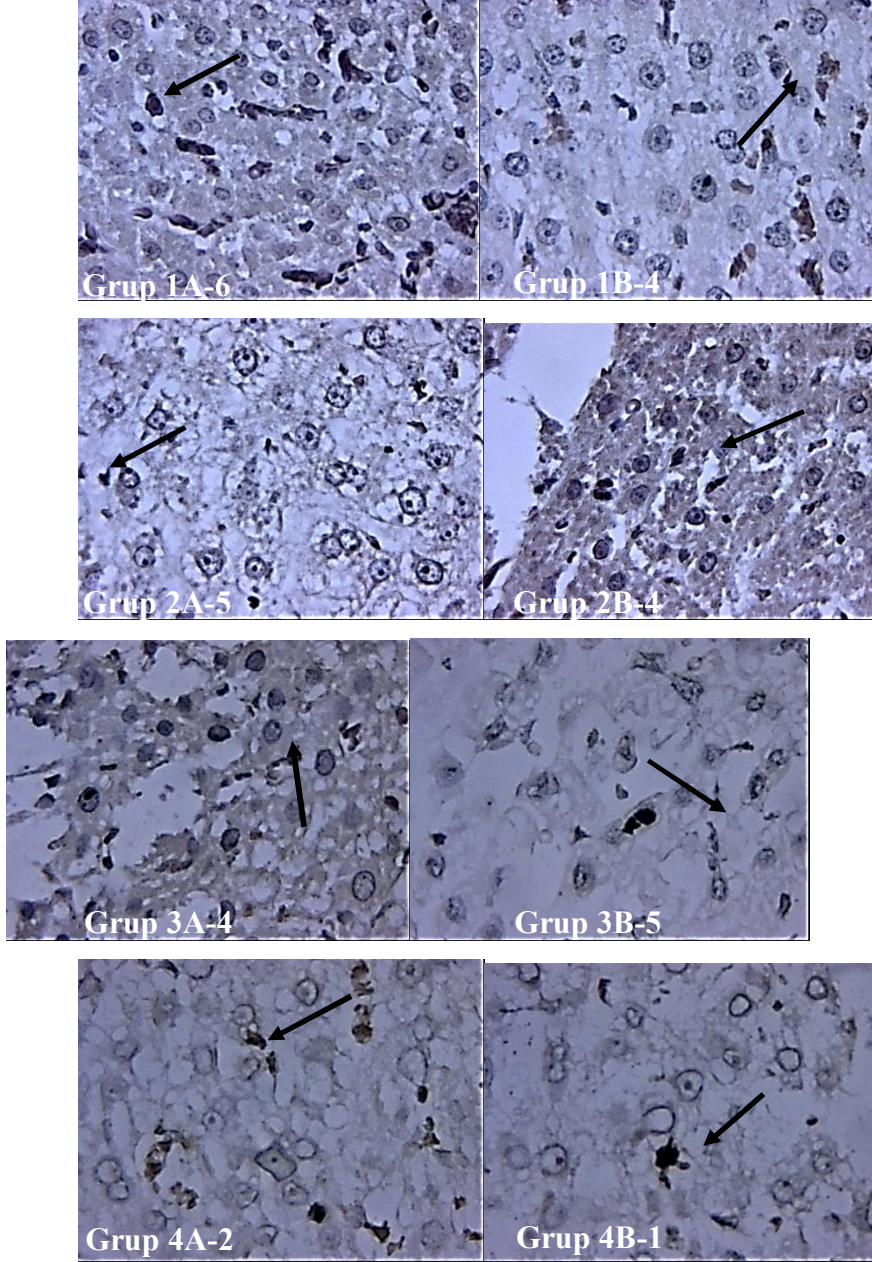
**Şekil 4.3.4d.**A alt gruplarının apoptotik indekslerini (ortalama±standart hata) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik.



**Şekil 4.3.4e.**B alt gruplarının apoptotik indekslerini (ortalama±standart hata) ve aralarındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik.

Yapılan korelasyon testinde grupların apoptotik indekslerinin; Grup 4A'da PCNA değerleriyle pozitif korele olduğu ( $p < 0,024$ ;  $r = 0,870$ ; Bkz.Şekil 4.3.2d.), yine Grup 4A'da Ki-67 değerleri ile pozitif korele olduğu ( $p < 0,036$ ;  $r = 0,841$ ; Bkz. Şekil 4.3.3d.), Grup 3B'de HGF düzeyleri ile negatif korele olduğu ( $p < 0,020$ ;  $r = -0,883$ ; Bkz. Şekil 4.2.1h.), yine Grup 3B'de IL-6 düzeyleri ile pozitif korele olduğu ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,985$ ; Bkz. Şekil 4.2.3e.)saptandı.

Farklı gruplardaki sıçanların karaciğer kesitlerindeki apoptotik hepatositlere ait fotoğraflar Şekil 4.3.4f'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3.4f. Apoptotik hepatositlere ait ışık mikroskopi fotoğrafları (x100).

#### 4.4. Korelasyon Testi Bulguları

Her bir gruba ait alt gruplarda morfolojik, biyokimyasal ve histopatolojik parametrelerinkorelasyon testi sonucu elde edilen, istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) bulgular Çizelge 4.4’de görülmektedir.

Gruplar	Parametreler	Pozitif korelasyon	Negatif korelasyon
Grup 1A	HGF / Mitotik indeks		+
	TNF- $\alpha$ / Ki-67		+
	R / HGF	+	
Grup 2A	Mitotik indeks / Ki-67	+	
	HGF / Mitotik indeks	+	
Grup 4A	Apoptotik indeks / PCNA	+	
	HGF / PCNA	+	
	Apoptotik indeks / Ki-67	+	
	IL-6 / TNF- $\alpha$		+
Grup 1B	Mitotik indeks / PCNA		+
	TNF- $\alpha$ / Mitotik indeks	+	
	TNF- $\alpha$ / HGF		+
Grup 2B	R / Ki-67	+	
	IL-6 / TNF- $\alpha$	+	
Grup 3B	R / Mitotik indeks	+	
	HGF / Apoptotik indeks		+
	TNF- $\alpha$ / Ki-67	+	
	IL-6 / Apoptotik indeks	+	
Grup 4B	Ki-67 / PCNA		+
	TNF- $\alpha$ / PCNA	+	

Çizelge 4.4. Her bir gruba ait alt gruplarda araştırılan parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı olan korelasyonları (pozitif/negatif) gösteren çizelge.

## 5. TARTIŞMA

Karaciğer, sahip olduğu rejenerasyon kapasitesi ile diğer organlardan ayrı bir özellik sergiler. Rejenerasyon; proinflamatuvar sitokinlerin, hormonların, transkripsiyon faktörlerinin ve oksidatif stres ürünlerinin rol oynadığı komplike bir süreçtir (4). Karaciğer rejenerasyonundaki düzenleyici mekanizmalar, meydana gelen mikro ve makro çevre değişiklikleri ve bunların birbirleriyle ilişkileri tam olarak bilinmemektedir. Buna karşın karaciğerin rejenerasyona ne zaman başlayacağı ve ne zaman durduracağı konusundaki bilgilerimiz daha açıktır (3). Karaciğer dokusunun kaybı rejenerasyonu başlatmaktadır (8). Büyümenin durmasını sağlayan hassas nokta ise vücut kütlesi ile karaciğer kütlesi arasındaki ilişkidir. Karaciğer, vücudun fonksiyonel ihtiyaçlarını karşılayacak, metabolizmayı gerçekleştirecek büyüklüğe erişince büyüme durmaktadır (29, 50, 51). İlginç olarak organ nakli 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 (46, 63).

Karaciğer rejenerasyonu ile ilgili çalışmaların çoğunda deney hayvanlarında önceden var olan hasarlı karaciğer üzerinde çalışılmış ya da kimyasal maddeler kullanılarak veya PH yapılarak karaciğerde hasar oluşturulmuştur. Karaciğer rejenerasyonu için en ideal modelin PH olduğu, çünkü diğer yöntemlerdeki doku hasarının inflamasyonu her zaman yeterince başlatamayabileceği belirtilmiştir (8). Sıçanlarda yapılan PH araştırmalarına en uygun modelin karaciğerin %65-70'lik kısmının rezeke edildiği model olduğu belirtilmiştir (59). Karaciğer rejenerasyonunu irdelediğimiz bu çalışmada, sıçanlarda başarılı bir PH modeli oluşturulmuştur. Çalışmamızda PH modelinin mortalitesi %6,25 olarak bulunmuştur. Literatüre bakıldığında, bu oranın diğer çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür. Sonuçta kaybedilen sıçanların yerine yenileri ilave edilmiş ve deney başarılı bir şekilde tamamlanabilmiştir.

PH ile ilgili deneysel çalışmalarda karaciğer ağırlık ölçümlerinin yapılması, rejenerasyon oranının belirlenmesi açısından oldukça önemlidir (49, 62, 63). PH ile oluşturulan hasarlarda alınan karaciğer kütlesi ile hepatektomiden belirli zaman sonra alınan tüm karaciğerin kütleleri değerlendirilerek karaciğer rejenerasyon oranları hesaplanabilmektedir (10, 159, 160). *Li ve ark.* sıçanlarda PH'den 48 saat sonra kalan karaciğer ağırlığının iki katına çıktığını ve 7-10 gün içinde de tam ağırlığa ulaştığını bildirmişlerdir (60). *Tang ve ark.* da araştırmalarında PH'den 24, 48, 72 saat ve 8 gün sonra rejenerasyon oranlarını tespit ederek bu oranın zamana göre yükseldiği sonucuna ulaşmışlardır (10). Çalışmamızda, kimyasal sempatektominin PH yapılan sıçanlarda 2. gündeki rejenere olan karaciğer ağırlığını kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede olmamakla birlikte artırdığı ve daha sonra bu artışın 10. günde anlamlı duruma geldiği görülmüştür. PH yapılmayan sıçanlarda ise kimyasal sempatektominin karaciğer rejenerasyon oranı üzerine etkisi 2. günde daha belirgin iken bu etki 10. günde azalma eğilimi göstermiştir. Burada R değeri ile anlamlı korelasyon gösteren herhangi bir parametre saptanmamıştır. Ayrıca, PH de kimyasal sempatektomiden bağımsız olarak karaciğer rejenerasyon oranını anlamlı derecede artırmaktadır. Bu sonuçlar deneysel modelimizde bir yandan karaciğer rejenerasyonun gerçekleştiğini desteklerken diğer yandan da kimyasal sempatektominin bu rejenerasyon sürecinin morfolojik bileşenine olumlu yönde katkı sağladığını göstermiştir.

Karaciğer rejenerasyonunda önemli rol oynayan HGF, TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\alpha$ , IL-1 ve TGF- $\beta$  gibi sitokinlerin serum seviyelerinin belirlenmesi, karaciğerde rejenerasyonun durumu hakkında bilgi verebilmektedir (21, 63, 64, 66). *Pediaditakis ve ark.* çalışmalarında PH sonrası ilk 3 saatte intrahepatik depo edilen aktif HGF'nin tüketildiği ve sonrasındaki 3 ile 48 saat içinde yeni HGF sentezinin gerçekleştiğini tespit etmişlerdir (161). *Lindross ve ark.* yaptıkları çalışmada PH sonrası bir saat içinde plasma HGF düzeyinin 20 kat arttığını, 24 saat içinde yavaşça azaldığını, fakat 72 saat kadar yüksek kalarak daha sonra normale döndüğünü tespit etmişlerdir (128). Çalışmamızda, kimyasal sempatektominin PH yapılan sıçanlarda 2. gündeki HGF düzeylerini diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı olarak yükselttiği saptanmıştır. Ancak bu artışın 10. günde yapılan ölçümlerde kontrol grubu düzeyine yaklaşarak anlamlılığını

kaybettiği gözlenmiştir. Bu bulgular HGF ile PCNA arasında saptanan pozitif korelasyonlar ile uyumluluk göstermektedir. Dolayısıyla, kimyasal sempatektominin karaciğerin rejenerasyon sürecinde çok yönlü olarak beklenen etki mekanizmaları arasında HGF üzerinden işleyen bir yolak olabileceği de düşünülmelidir.

TNF- $\alpha$  ve IL-6 sitokinlerinin karaciğer rejenerasyonunda önemli rol oynadığı birçok araştırmada bildirilmiştir (120, 162). Ayrıca karaciğer rejenerasyonunun başlatılmasında IL-6'nın üretimini uyararak düzenlenmesini sağlayan sitokinin TNF- $\alpha$  olduğu da gösterilmiştir (3, 47, 138). 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. *Iwai* ve *ark.* çalışmalarında sıçanlarda PH'den 24 saat sonra TNF- $\alpha$  ve IL-6 sitokinlerinin seviyelerinde yükselme olduğunu ve 48 saat sonra en yüksek seviyeye ulaştığını, 72. saatte ise kontrol grubu hayvanlarında belirlenmiş olan normal seviyeye düştüğünü belirtmişlerdir (162). Çalışmamızda, kimyasal sempatektomi ve PH'nin 2. gündeki TNF- $\alpha$  ile ilgili verilerde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı, buna karşın 10. gündeki veriler incelendiğinde; kimyasal sempatektominin, PH yapılan sıçanlarda TNF- $\alpha$  düzeyini diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı olarak artırdığı gösterilmiştir. Bu bulgular, literatürdeki benzer çalışmalardan farklı olarak kimyasal sempatektominin TNF- $\alpha$  üzerinden etkide bulunduğu rejenerasyon sürecinin göreceli olarak daha geç bir dönemde işlemeye başladığını desteklemektedir. Bu çalışma ile TNF- $\alpha$  düzeylerinin 10. günden sonraki seyrinin nasıl olduğu/olacağı konusunda objektif bir yorum yapmak olası değilse de en azından TNF- $\alpha$  ile ilişkili rejenerasyon mekanizmasının daha geç devreye girmesi yanında daha uzun vadeli bir süreci içereceği de söylenebilir.

*Scotte* ve *ark.* çalışmalarında, karaciğer rejenerasyonunun devam ettiği süreçte normal olarak IL-6 üretiminin olmadığını sadece başlangıçta üretildiğini belirtmişlerdir (163). *Scotte* ve *ark.* yaptıkları başka bir çalışmada ise, IL-6'nın serum seviyesini PH'den sonraki ilk 24. saatte en yüksek, sonraki saatlerde düşerek normal seviyeye geldiğini saptamışlardır (131). Görüldüğü gibi aynı yazarın değişik çalışmalarında bile farklı bulgular ortaya çıkabilmektedir. Başka

bir çalışmada ise, *Kaya ve ark.* PH'den sonraki 24-48 saatler arasında IL-6 serum seviyesinin en yüksek değere ulaştığını belirtmişlerdir (98). Bizim bulgularımıza göre kimyasal sempatektomi ve PH'nin her ikisi de 2. gündeki IL-6 düzeylerini kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yükseltmektedir. Diğer yandan, 10. günde ise IL-6 düzeyleri kimyasal sempatektomi ve PH'den bağımsız olarak bazal değerlere geri dönmektedir. Burada, farklı bir bulgu olarak; kimyasal sempatektominin PH yapılmayan sıçanlarda 2. gündeki IL-6 düzeylerini anlamlı olarak yükseltmiş olması, diğer yandan bu etkinin PH yapılması ile birlikte ortadan kalkması ya da maskelenmiş olması dikkati çekmektedir. Her iki durum da göz önüne alındığında, kimyasal sempatektominin karaciğer rejenerasyon sürecinde en azından ilk 10 gün içerisinde IL-6 ile ilişkili bir yolak üzerinden anlamlı bir rol oynamadığı ileri sürülebilir. Ancak, kimyasal sempatektominin, IL-6 ve TNF- $\alpha$  arasındaki korelasyonun 2.gününde negatif, 10.gününde pozitif olmasına etki ederek rejenerasyon sürecinin bu bölümünde de dolaylı bir rol oynaması söz konusu olabilir.

Karaciğer rejenerasyonunun değerlendirilmesinde histopatolojik olarak bazı proliferasyon indeksi parametreleri kullanılmaktadır. PCNA ve mitotik indeks bunlardan en yaygın kullanılan iki tanesidir. Bunların dışında Ki-67, AG-NOR ve p53 de bu amaçla kullanılmaktadır (70, 164, 165). Mitotik indeks, karaciğer kesitlerinde ek herhangi bir materyal gerektirmemesi ve kolay değerlendirilmesi nedeniyle günümüzde en yaygın kullanılan proliferasyon indeksidir. Kötücül nedenlerle yapılan rezeksiyonlarda sağkalım hakkında en doğru bilgiyi veren parametre mitotik indekstir (166). Küratif rezeksiyon yapılan hepatosellüler karsinomlu hastalarda sağkalım üzerine etkili faktörlerle ilgili yapılan çalışmada mitotik indeksin, AgNOR ve PCNA'ya göre prognostik değerinin daha fazla olduğu belirtilmiştir (167). Hasarsız karaciğerde normal şartlarda mitotik aktivite görülmezken, karaciğerin kitle kaybı olan veya toksik nedenlerle gelişen doku hasarlarında mitotik aktivite artar (168, 169). Bu artış sıçanlarda ilk 24-48 saatte daha belirgindir ve 72. saatten sonra azalır. *Laconi ve ark.* %70 hepatic rezeksiyon yaptıkları sıçanlarda mitotik hücre sayısının hepatektomi sonrası 24 ve 48. saatlerde 72 ve 144. saatlere oranla daha yüksek olduğunu saptamışlardır (170). Çalışmamızda, 2. gündeki mitotik indeksin PH yapılan sıçanlarda daha

belirgin olmak üzere kimyasal sempatektomi yapılan sıçanlarda da anlamlı olarak yükseldiği gösterilmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalardan farklı olarak kontrol grubu dışındaki tüm gruplardaki bu anlamlı artış 10. günde daha da belirginleşmektedir. Burada, kimyasal sempatektominin mitotik indeksi PH'ye kıyasla anlamlı fakat daha ılımlı bir şekilde artırmasının nihai karaciğer işlevini ne şekilde etkileyeceğini öngörmek olası değildir. Bu durum, karaciğer rejenerasyon sürecini geciktirerek olumsuz etki yapabileceği gibi daha yavaş ancak daha sağlıklı bir rejenerasyon süreci ile de sonuçlanabilir. Bu konunun, uzun dönemde karaciğerin işlevsel testlerini içeren yeni çalışmalarla irdelenmesi yararlı olacaktır.

PCNA, 36 kD ağırlığında asidik nükleer proteindir. Hücre döngüsünün geç G1 ve S fazında, hücre çoğalması ve DNA onarımı esnasında salınır (171). PCNA'nın immünohistokimyasal olarak saptanması dokuda proliferasyon yapan hücre fraksiyonunu göstermektedir (164). PCNA incelemesi için herhangi bir antijenin in vivo uygulanması gerekmemektedir (21, 172, 173). Mitotik aktivite gibi PCNA ile boyanan hücreler normal karaciğer dokusunda oldukça az sayıda iken, rejenerasyon yapan karaciğer dokusunda artar. Bu artış mitotik aktivite gibi rejenerasyon yapan karaciğerde 24. ve 48. saatlerde en üst düzeydedir (93). *Kogure ve ark.* PH sonrası rejenerasyonu değerlendirirken PCNA ile işaretlemenin 24. saatten başlayıp artarak 48. saatte en yüksek düzeye geldiğini ve 72. saatte düştüğünü belirtmişlerdir (174). PH sonrası rejenerasyonun değerlendirildiği bir çalışmada da PCNA işaretlenme oranının PH sonrası 24. saatte yükselmeye başladığı bildirilmiştir (94). Çalışmamızda, 2. gündeki PCNA değerlerinin kimyasal sempatektomi yapılan sıçanlarda daha belirgin olmak üzere PH yapılanlarda da kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. Bu anlamlı artış, 10. günde yapılan ölçümlerde PH uygulanan sıçanlarda mevcut literatürle uyumlu olarak azalma eğilimindeyken, kimyasal sempatektomi yapılanlarda halen artmaya devam etmektedir. Bu durum, PH'nin mitotik indeks üzerine etkisini taklit edecek şekilde, burada kimyasal sempatektominin PCNA üzerine etkisi şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Bu kompleks etkileşimler PCNA'nın apoptotik indeks, HGF, mitotik indeks, Ki-67 ve TNF- $\alpha$  ile olan korelasyon analizlerine de yansımıştır.

*Sagakuchi* ve *ark.* sıçanlarda yaptıkları çalışmada PH sonrası Ki-67 değerlerinin 48. saatte pik yaptığı, 7. günde ise %10'un altına indiğini göstermişlerdir (175). *Gerlach* ve *ark.* çalışmalarında, PH sonrası Ki-67 değerlerinin DNA sentezinin artışına paralel olarak 13. saatte artmaya başladığını, 36. saatte en üst değere ulaştığını, daha sonra azalmaya başladığını fakat 9. gün Ki-67 değerlerinin beklenenden farklı olarak normalden yüksek seyrettiğini gözlemlemişlerdir (176). Çalışmamızda, hem kimyasal sempatektominin hem de PH'nin 2. gündeki Ki-67 değerlerini kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yükselttiği saptanmıştır. Bu anlamlı etki kimyasal sempatektomi ve PH kombinasyonu ile şiddetlenme göstermemektedir. Diğer yandan bu anlamlı etkiler 10. günde de devam etmekte olup, bu kez PH yapılmış sıçanlarda kimyasal sempatektominin etkisinin anlamlı olmamakla birlikte bir miktar şiddetlenmiş olduğu izlenmektedir. Bu veriler erken dönemde Ki-67'nin rol aldığı karaciğer rejenerasyon sürecinin kimyasal sempatektomiden bağımsız olduğunu, ancak geç dönemde kimyasal sempatektominin etkisinin ortaya çıktığını düşündürmektedir.

PH sonrası karaciğerin fonksiyonel kapasitesi kadar kendi büyüklüğünün de önemli olması, rejenerasyonu başlatıcı ve durdurucu etkenler arasında çok iyi bir dengenin oluşmasına neden olmaktadır. Rejenerasyon sürecinde karaciğer kütlesi, vücudun fonksiyonel olarak istediğinden daha büyük miktara ulaşırsa vücut kendi ihtiyacına göre karaciğer kütlesini azaltmaktadır (3, 63, 66). Karaciğerdeki kütleli fazlalık "*programlanmış hücre ölümü*" olarak tanımlanan apoptozis ile azaltılmaktadır (67). Literatürde apoptozis ile ilgili çok sayıda çalışma olmasına rağmen, sıçanlarda PH sonrası karaciğer rejenerasyonunda apoptozisin değerlendirildiği çok az sayıda çalışma mevcuttur. *Shimizu* ve *ark.* sıçanlarda PH sonrası sinüzoidal rejenerasyon ve remodelizasyonu değerlendirdikleri çalışmalarında, PH sonrası 72. saatte sinüzoidal apoptotik hücreler görmeye başladıklarını, 120 ile 144. saatler arasında dahi apoptotik sinüzoidal hücreler görmeye devam ettiklerini bildirmişlerdir (61). Çalışmamızda, 2. gündeki apoptotik indeks, PH yapılan sıçanlarda daha belirgin olmak üzere kimyasal sempatektomi yapılanlarda da kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yükselmiştir. Kimyasal sempatektomi sonrası PH yapılması ise apoptotik indekste anlamlı olmayan bir artışa neden olmuştur. 10. gündeki incelemelerde ise yalnızca

kimyasal sempatektomi sonrası PH uygulanan sıçanlardaki apoptotik indeksin anlamlı olarak yükseldiği, diğer iki grupta (yalnızca kimyasal sempatektomi veya yalnızca PH yapılan gruplar) ise apoptotik indeksin kontrol değerlerine gerilediği gözlenmiştir. Bu bulgular, apoptotik sürecin kimyasal sempatektomiyle ilişkili bölümünün 2. günden sonra artarak 10. günde de devam ettiğini göstermektedir. Ancak, mekanizmayı belirlemeye yönelik yapmış olduğumuz korelasyon analizleri de bu bulguyu açıklamakta yetersiz kalmıştır.

Yukarıda daha önce tartışılan tüm veriler bir arada değerlendirildiğinde; kimyasal sempatektominin PH sonrası 2. günde belirginleşen ve hem HGF hem de IL-6 ile ilişkili hücre proliferasyonun ön planda olduğu bir rejenerasyon sürecinde etkili olduğu, 10. günde ise bu hiperplazik süreci dengelemek üzere TNF- $\alpha$  ile ilişkili apoptotik mekanizmaların devreye girerek organizmanın gereksinim duyduğundan daha fazla bir hiperplaziyi engellediği ileri sürülebilir. Rejenerasyon sürecinin bu dinamik yapısında; biyokimyasal parametreler (HGF, TNF- $\alpha$  ve IL-6) ile histopatolojik parametreler (mitotik indeks, PCNA, Ki-67, apoptotik indeks) arasında saptanan korelasyonlar ön plandadır. Ancak, hem biyokimyasal parametrelerin kendi aralarındaki hem de histopatolojik parametrelerin kendi aralarındaki anlamlı korelasyonlar da dikkati çekmektedir.

PH deneysel modelinin kullanıldığı, kimyasal sempatektomi aracılığıyla otonom sinir sisteminin sıçanlarda karaciğer rejenerasyonu üzerine etkilerinin belirlenmesini amaçladığımız bu çalışmanın yukarıdaki paragraflarda belirtilen ve yorumlanan sonuçlarının gelecek araştırmalar için kaynak olabileceği görüşündeyiz. Kimyasal sempatektominin ya da onun bu çalışmada araştırılan parametreler üzerine etkilerini göz önünde bulundurarak doğrudan bu parametreler üzerine etkili ajanların PH sonrası karaciğer rejenerasyonu için kullanılabilirliğinin gelecekte yapılacak başka deneysel çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Bu bağlamda, yaptığımız çalışmaya ek olarak benzer deneysel modellerde otonom sinir sisteminin karaciğer rejenerasyon sürecine etkisinin moleküler düzeyde belirlenmesinin de yeni araştırma konuları olabileceği düşüncesindeyiz.

## 6. SONUÇLAR

Bu çalışmada elde edilen bulgular literatürdeki bilgiler ile birlikte değerlendirildiğinde aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

- Kimyasal sempatektomi, PH yapılan sıçanlarda, 2. günde karaciğer rejenerasyon oranını kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede olmamakla birlikte artırmakta ve daha sonra bu artış 10. günde anlamlı duruma gelmektedir. PH yapılmayan sıçanlarda ise kimyasal sempatektominin karaciğer rejenerasyon oranı üzerine etkisi 2. günde daha belirgin iken bu etki 10. günde azalma eğilimi göstermiştir. Ayrıca, PH de kimyasal sempatektomiden bağımsız olarak karaciğer rejenerasyon oranını anlamlı derecede artırmaktadır. Bu sonuçlar, deneysel modelimizde bir yandan HGF ve R değeri arasında pozitif korelasyonun olduğu karaciğer rejenerasyonun gerçekleştiğini desteklerken diğer yandan da kimyasal sempatektominin bu rejenerasyon sürecinin morfolojik bileşenine olumlu yönde katkı sağladığını göstermiştir.
- Kimyasal sempatektomi, PH yapılan sıçanlarda, mitotik indeks ve PCNA ile pozitif korelasyon gösterecek şekilde 2. gündeki HGF düzeylerini diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı olarak yükseltmektedir. Ancak bu artışın 10. günde yapılan ölçümlerde kontrol grubu düzeyine yaklaşarak anlamlılığını kaybettiği gözlenmiştir. Bu veriler, kimyasal sempatektominin karaciğerin rejenerasyon sürecinde çok yönlü olarak beklenen etki mekanizmaları arasında HGF üzerinden erken dönemde işleyen bir yolak olabileceğini de düşündürmektedir.
- Kimyasal sempatektomi ve PH'nin 2. gündeki TNF- $\alpha$  ile ilgili verilerde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı, buna karşın 10. gündeki veriler incelendiğinde; kimyasal sempatektominin, PH yapılan sıçanlarda TNF- $\alpha$  düzeyini diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı olarak artırdığı gösterilmiştir. Bu bulgular, literatürdeki benzer çalışmalardan farklı olarak kimyasal sempatektominin TNF- $\alpha$  üzerinden etkide bulunduğu rejenerasyon sürecinin göreceli olarak daha geç bir dönemde işlemeye başladığını desteklemektedir.

TNF- $\alpha$  ile histopatolojik parametreler arasındaki korelasyon analizleri de buna paraleldir. Bu çalışma ile TNF- $\alpha$  düzeylerinin 10. günden sonraki seyrinin nasıl olduğu/olacağı konusunda objektif bir yorum yapmak olası değilse de en azından TNF- $\alpha$  ile ilişkili rejenerasyon mekanizmasının daha geç devreye girmesi yanında daha uzun vadeli bir süreci içereceği de söylenebilir.

- Kimyasal sempatektomi ve PH'nin her ikisi de 2. gündeki IL-6 düzeylerini kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yükseltmektedir. Diğer yandan, 10. günde ise IL-6 düzeyleri kimyasal sempatektomi ve PH'den bağımsız olarak bazal değerlere geri dönmektedir. Burada, farklı bir bulgu olarak; kimyasal sempatektominin PH yapılmayan sıçanlarda 2. gündeki IL-6 düzeylerini anlamlı olarak yükseltmiş olması, diğer yandan bu etkinin PH yapılması ile birlikte ortadan kalkması ya da maskelenmiş olması dikkati çekmektedir. Her iki durum da göz önüne alındığında, kimyasal sempatektominin karaciğer rejenerasyon sürecinde en azından ilk 10 gün içerisinde PH'nin etkilerini taklit eden bir IL-6 yolağı üzerinden rol oynadığı sürebilir.
- İkinci gündeki mitotik indeksin PH yapılan sıçanlarda daha belirgin olmak üzere kimyasal sempatektomi yapılanlarda da anlamlı olarak yükseldiği gösterilmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalardan farklı olarak kontrol grubu dışındaki tüm gruplardaki bu anlamlı artış 10. günde daha da belirginleşmektedir. Burada, kimyasal sempatektominin mitotik indeksi PH'ye kıyasla anlamlı fakat daha ılımlı bir şekilde artırmasının nihai karaciğer işlevini ne şekilde etkileyeceğini öngörmek olası değildir. Bu durum, karaciğer rejenerasyon sürecini geciktirerek olumsuz etki yapabileceği gibi daha yavaş ancak daha sağlıklı bir rejenerasyon süreci ile de sonuçlanabilir. Bu konunun, uzun dönemde karaciğerin işlevsel testlerini içeren yeni çalışmalarla irdelenmesi yararlı olacaktır.
- İkinci gündeki PCNA değerlerinin kimyasal sempatektomi yapılan sıçanlarda daha belirgin olmak üzere PH yapılanlarda da kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artışı saptanmıştır. Bu anlamlı artış, 10. günde yapılan ölçümlerde PH uygulanan sıçanlarda mevcut literatürle uyumlu olarak azalma eğilimindeyken, kimyasal sempatektomi yapılanlarda halen artmaya devam etmektedir. Bu durum, PH'nin mitotik indeks üzerine etkisini taklit edecek

şekilde, burada kimyasal sempatektominin PCNA üzerine etkisi şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Yapılan korelasyon analizleri bu etkinin biyokimyasal olarak TNF- $\alpha$  ile pozitif etkileşim içinde olduğunu göstermiştir.

- Hem kimyasal sempatektominin hem de PH'nin 2. gündeki Ki-67 değerlerini kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yükselttiği saptanmıştır. Bu anlamlı etki kimyasal sempatektomi ve PH kombinasyonu ile şiddetlenmemektedir. Diğer yandan bu anlamlı etkiler 10. günde de devam etmekte olup, bu kez PH yapılmış sıçanlarda kimyasal sempatektominin etkisinin anlamlı olmamakla birlikte bir miktar şiddetlenmiş olduğu izlenmektedir. Bu veriler erken dönemde Ki-67'nin rol aldığı karaciğer rejenerasyon sürecinin kimyasal sempatektomiden bağımsız olduğunu, ancak geç dönemde kimyasal sempatektominin etkisinin ortaya çıktığını düşündürmektedir.
- İkinci gündeki apoptotik indeks, PH yapılan sıçanlarda daha belirgin olmak üzere kimyasal sempatektomi yapılanlarda da kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yükselmiştir. Kimyasal sempatektomi sonrası PH yapılması ise apoptotik indekste anlamlı olmayan bir artışa neden olmuştur. 10. gündeki incelemelerde ise yalnızca kimyasal sempatektomi sonrası PH uygulanan sıçanlardaki apoptotik indeks anlamlı olarak yükseldiği, diğer iki grupta (yalnızca kimyasal sempatektomi veya yalnızca PH yapılan gruplar) ise apoptotik indeksin kontrol değerlerine gerilediği gözlenmiştir. Bu bulgular, apoptotik sürecin kimyasal sempatektomiyle ilişkili bölümünün 2. günden sonra artarak 10. günde de devam ettiğini göstermektedir.

Tüm bu veriler bir arada değerlendirildiğinde; kimyasal sempatektominin PH sonrası 2. günde belirginleşen ve hem HGF hem de IL-6 ile ilişkili hücre proliferasyonunun ön planda olduğu bir rejenerasyon sürecinde etkili olduğu, 10. günde ise bu hiperplazik süreci dengelemek üzere TNF- $\alpha$  ile ilişkili apoptotik mekanizmaların devreye girerek organizmanın gereksinim duyduğundan daha fazla bir hiperplaziyi engellediği ileri sürülebilir. Bu kompleks etkileşimlerin ve ve otonom sinir sisteminin karaciğer rejenerasyon sürecindeki rolünün tam belirlenebilmesi için başka çalışmalara da gereksinim vardır.

## 7. ÖZET

### PARSİYELHEPATEKTOMİ YAPILAN SIÇANLARDA KİMYASALSEMPATEKTOMİNİN KARACİĞER REJENERASYONU ÜZERİNEETKİLERİ

Bu çalışmada parsiyel hepatektomi (PH) yapılan sıçanlarda kimyasal sempatektominin karaciğer rejenerasyonu üzerine etkilerinin deneysel olarak araştırılması amaçlandı.

Çalışmamızda her biri onaltı sıçandan oluşan dört ana grup oluşturuldu (Grup 1: kontrol, Grup 2: sempatektomi, Grup 3: kontrol+parsiyel hepatektomi, Grup 4: sempatektomi+parsiyel hepatektomi).Daha sonra, bu gruplar her biri sekiz sıçan içerecek şekilde A ve B alt gruplarına ayrıldı.A alt gruplarına kontrol ameliyatı ya da parsiyel hepatektomiden 2 gün sonra hepatektomi yapılırken, B alt gruplarına ise 10 gün sonra hepatektomi yapıldı.Kimyasal sempatektomi oluşturmak içinher bir sıçana beş gün süreyle6-Hidroksidopamin hidrobromid (100 mg/kg/gün, intraperitoneal) uygulanırken, plasebo olarak ise serum fizyolojik (1 mL, intraperitoneal)yine beş gün süreyle uygulandı. Deney sonlandırılmadan önce; ağırlık ölçümleri yapıldı, kan ve karaciğer örnekleri alınarak biyokimya ve patoloji laboratuvarlarına gönderildi. Morfolojik parametre olarak karaciğer rejenerasyon oranı kullanıldı. Biyokimyasal parametre olarak alınan kan örneklerinde HGF, TNF- $\alpha$ , IL-6 ölçümleri yapıldı. Doku örnekleri ise mitotik indeks, PCNA, Ki-67 ve apoptotik indeksi belirlemek üzere histopatolojik olarak incelendi.

Çalışmamızda, kimyasal sempatektominin PH yapılan sıçanlarda 2. gündeki karaciğer rejenerasyon oranını kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede olmamakla birlikte artırdığı ve daha sonra bu artışın 10. günde anlamlı duruma geldiği görülmüştür. PH yapılmayan sıçanlarda ise kimyasal sempatektominin karaciğer rejenerasyon oranı üzerine etkisi 2. günde daha belirgin iken bu etki 10. günde azalma eğilimi göstermiştir. Ayrıca, PH de kimyasal sempatektomiden bağımsız olarak karaciğer rejenerasyon oranını anlamlı derecede artırmaktadır.

HGF düzeyi ile ilgili bulgularımız değerlendirildiğinde; kimyasal sempatektominin PH yapılan sıçanlarda 2. gündeki HGF düzeylerini diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı olarak yükselttiği saptanmıştır. Ancak bu artışın 10. günde yapılan ölçümlerde kontrol grubu düzeyine yaklaşarak anlamlılığını kaybettiği gözlenmiştir.

Çalışmamızda, kimyasal sempatektomi ve PH'nin 2. gündeki TNF- $\alpha$  ile ilgili verilerde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı, buna karşın 10. gündeki veriler incelendiğinde; kimyasal sempatektominin, PH yapılan sıçanlarda TNF- $\alpha$  düzeyini diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı olarak artırdığı gösterilmiştir.

IL-6 ile ilgili bulgularımıza göre; kimyasal sempatektomi ve PH'nin her ikisi de 2. gündeki IL-6 düzeylerini kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yükseltmektedir. Diğer yandan, 10. günde ise IL-6 düzeyleri kimyasal sempatektomi ve PH'den bağımsız olarak bazal değerlere geri dönmektedir. Burada, farklı bir bulgu olarak; kimyasal sempatektominin PH yapılmayan sıçanlarda 2. gündeki IL-6 düzeylerini anlamlı olarak yükseltmiş olması, diğer yandan bu etkinin PH yapılması ile birlikte ortadan kalkması ya da maskelenmiş olması dikkati çekmektedir.

Çalışmamızda, 2. gündeki mitotik indeksin PH yapılan sıçanlarda daha belirgin olmak üzere kimyasal sempatektomi yapılan sıçanlarda da anlamlı olarak yükseldiği gösterilmiştir. Yine farklı bir bulgu olarak, kontrol grubu dışındaki tüm gruplardaki bu anlamlı artış 10. günde daha da belirginleşmektedir.

PCNA ile ilgili bulgularımıza göre; 2. gündeki PCNA değerlerikimyasal sempatektomi yapılan sıçanlarda daha belirgin olmak üzere PH yapılanlarda da kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır. Bu anlamlı artış, 10. günde yapılan ölçümlerde PH uygulanan sıçanlarda azalma eğilimindeyken, kimyasal sempatektomi yapılanlarda halen artmaya devam etmektedir.

Çalışmamızda, hem kimyasal sempatektominin hem de PH'nin 2. gündeki Ki-67 değerlerini kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yükselttiği saptanmıştır. Bu anlamlı etki kimyasal sempatektomi ve PH kombinasyonu ile şiddetlenme göstermemektedir. Diğer yandan bu anlamlı etkiler 10. günde de devam etmekte olup, bu kez PH yapılmış sıçanlarda kimyasal sempatektominin etkisinin anlamlı olmamakla birlikte bir miktar şiddetlenmiş olduğu izlenmektedir.

Apoptotik indekse ilişkin bulgularımıza göre; 2. gündeki apoptotik indeks, PH yapılan sıçanlarda daha belirgin olmak üzere kimyasal sempatektomi yapılanlarda da kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yükselmiştir. Kimyasal sempatektomi sonrası PH yapılması ise apoptotik indekste anlamlı olmayan bir artışa neden olmuştur. 10. gündeki incelemelerde ise yalnızca kimyasal sempatektomi sonrası PH uygulanan sıçanlardaki apoptotik indeksin anlamlı olarak yükseldiği, diğer iki grupta (yalnızca kimyasal sempatektomi veya yalnızca PH yapılan gruplar) ise apoptotik indeksin kontrol değerlerine gerilediği gözlenmiştir.

Tüm bu veriler bir arada değerlendirildiğinde; kimyasal sempatektominin PH sonrası 2. günde belirginleşen ve hem HGF hem de IL-6 ile ilişkili hücre proliferasyonunun ön planda olduğu bir rejenerasyon sürecinde etkili olduğu, 10. günde ise bu hiperplazik süreci dengelemek üzere TNF- $\alpha$  ile ilişkili apoptotik mekanizmaların devreye girerek organizmanın gereksinim duyduğundan daha fazla bir hiperplaziyi engellediği ileri sürülebilir. Bu kompleks etkileşimlerin ve ve otonom sinir sisteminin karaciğer rejenerasyon sürecindeki rolünün tam belirlenebilmesi için başka çalışmalara da gereksinim vardır.

**Anahtar Kelimeler:**Parsiyel hepatektomi, kimyasal sempatektomi, karaciğer rejenerasyonu, HGF, PCNA.

## **8.ABSTRACT**

### **THE EFFECTS OF CHEMICAL SYMPATHECTOMY ON LIVER REGENERATION IN RATS UNDERGOING PARTIAL HEPATECTOMY**

The study aims to analyze experimentally the effects of chemical sympathectomy on liver regeneration in rats undergoing partial hepatectomy (PH).

In our study, there were four main groups with sixteen rats in each group (Group 1: control, Group 2: sympathectomy, Group 3: control+partial hepatectomy, Group 4: sympathectomy+partial hepatectomy). The groups were then distributed into two sub-groups as Group A and Group B with eight rats in each group. Hepatectomy was performed on Group A two days after the control operation or partial hepatectomy; whereas in Group B it was performed ten days after the operation. To form chemical sympathectomy, each rat was administered 6-Hydroxydopamine hydrobromide (100 mg/kg/day, intraperitoneal) for 5 days and normal saline (1 mL, intraperitoneal) was also administered to control groups as placebo for 5 days. Before the end of the experiment; weighing measurements were made, blood and liver samples were obtained, and they were sent to the biochemistry and pathology laboratories. Regenerated liver ratio was used as the morphological parameter. HGF, TNF- $\alpha$ , IL-6 measurements were performed on blood samples obtained as biochemical parameters. Tissue samples were analyzed histopathologically to determine mitotic index, PCNA, Ki-67 and apoptotic index.

In our study, chemical sympathectomy was found to increase not significantly the regenerated liver ratio in the rats with PH on the 2<sup>nd</sup> day compared to the control group. The increase was later found to be significant on the 10<sup>th</sup> day. While the effect of chemical sympathectomy on liver regeneration rate was much more significant in the rats without PH on the 2<sup>nd</sup> day, it tended to decline on the 10<sup>th</sup> day. Moreover, PH significantly increased the liver regeneration rate independently from chemical sympathectomy.

When our findings on the HGF level were assessed; chemical sympathectomy was found to increase the HGF level significantly in the rats with

PH on the 2<sup>nd</sup> day, compared to all other groups. However, the increase was observed to lose its significance and it approached the level of the control group in the measurements made on the 10<sup>th</sup> day.

In our study, chemical sympathectomy and PH did not cause any significant change in the data related to TNF- $\alpha$  on the 2<sup>nd</sup> day. On the other hand, when the data obtained on the 10<sup>th</sup> day were analyzed, chemical sympathectomy was found to increase the TNF- $\alpha$  level significantly in the rats with PH, compared to all other groups. According to our findings related to IL-6; both chemical sympathectomy and PH increased the IL-6 levels on the 2<sup>nd</sup> day significantly compared to control groups. Furthermore, the IL-6 levels returned to the basic values on the 10<sup>th</sup> day, independently from chemical sympathectomy and PH. Here, a remarkable finding was that chemical sympathectomy increased the IL-6 levels significantly in the rats without PH on the 2<sup>nd</sup> day and the effect was removed or concealed when PH was performed.

In our study, mitotic index was more significantly increased in the rats with PH on the second day and also it was found to increase significantly in the rats with chemical sympathectomy. Another remarkable finding was that the significant increase in all groups except the control group became much more notable on the 10<sup>th</sup> day.

Our findings regarding PCNA were found out that PCNA levels significantly increased both in the rats with chemical sympathectomy (more remarkable than the others) and in the rats with PH significantly on the 2<sup>nd</sup> day compared to the control group. While the significant increase tended to decline in the rats with PH based on the measurements made on the 10<sup>th</sup> day, it continued to increase in the rats with chemical sympathectomy.

In our study, it was observed that both chemical sympathectomy and PH increased Ki-67 levels significantly on the 2<sup>nd</sup> day, compared to the levels in control groups. The significant effect was not aggravated by the combination of chemical sympathectomy and PH. On the other hand, the significant effects continued on the 10<sup>th</sup> day, but that time the effect of chemical sympathectomy was a little aggravated in the rats with PH but it was not significant.

Our findings as to apoptosis demonstrated that the apoptotic index was more significantly increased in the rats with PH on the 2<sup>nd</sup> day. It also increased in the rats with chemical sympathectomy significantly compared to the control group. Performing the PH after the chemical sympathectomy led to an insignificant increase in the apoptotic index. In the analysis conducted on the 10<sup>th</sup> day, it was found that the apoptotic index increased significantly only in the rats with PH performed after chemical sympathectomy. However, the apoptotic index was observed to regress to the control values in the other two groups (groups with chemical sympathectomy only or PH only)

When these all data are considered; it is suggested that chemical sympathectomy is effective in a regeneration process that becomes prominent on the 2<sup>nd</sup> after the PH through cell proliferation related to both HGF and IL-6. Moreover, it may also be suggested that apoptotic mechanisms related to TNF- $\alpha$  activate and hinder hyperplasia being much higher than the organism needs in order to balance the hyperplasia on the 10<sup>th</sup> day. Accordingly, further studies are needed to determine the effects of these complex interactions and the role of autonomic nervous system on the liver regeneration process.

**Key Words:** Partial hepatectomy, chemical sympathectomy, liver regeneration, HGF, PCNA.

## 9. 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; 365-98.
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 2000; 32: 19-31.
4. Bismuth H, Houssin D, Castaing D. Major and minor segmentectomies reglees in liver surgery. World J Surg 1982; 6: 10-7.
5. Hamanoue M, Kawaida K, Takao S. Rapid and marked induction of hepatocyte growth factor during liver regeneration after ischemic or chrush injury. Hepatology 1992; 16: 1485-92.
6. Perek S, Kapan S. Ed: Değerli Ü, Bozfakioğlu Y. Cerrahi Gastroenteroloji. s.194-208. 5. Basım, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2000.
7. Nagasue N, Yukaya H, Ogawa Y. Human liver regeneration after major hepatic resection. Ann Surg 1987; 206: 30-9.
8. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. Science 1997; 276: 60-6.
9. Bismuth H, Houssin D, Castaing D. Major and minor segmentectomies reglees in liver surgery. World J Surg 1982; 6: 10-7.
10. Tang TX, Hashimoto T, Chao LY, Itoh K, Manabe T. Effects of partial pancreatectomy on liver regeneration in rats, Journal of Surgical Research 1997; 72, 8-14.
11. Diehl AM, Rai RM. Regulation of signal transduction during liver regeneration. FASEB J 1996; 10: 215-27.
12. Fausto N, Laird AD, Webber EM. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. FASEB J 1995; 9: 15-1536.
13. Michalopoulos GK. Liver regeneration: molecular mechanism of growth control. FASEB J 1990; 4: 176-87.

14. Nishizaki T, Takenaka K. Alteration in levels of human hepatocyte growth factor following hepatectomy. *J Am Coll Surg* 1995; 181: 6-10.
15. Noguchi S, Ohba Y. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Endocrinol* 1991; 128: 425-31.
16. LaBrecque DR, Steele G, Fogerty S. Purification and physical-chemical characterisation of hepatic stimulator substance. *Hepatology* 1987; 7: 100-6.
17. Linder RM, Cady B. Hepatic resection. *Surg Clin North Am* 1980; 60: 349-60.
18. İwatsuki S, Shaw BW Jr, Starzi TE. Experience with 150 liver resections. *Ann Surg* 1983; 197: 247-52.
19. Koniaris LG, Mckillop IH, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver Regeneration *Am Coll Surg* 2003; 634-59.
20. Wheatley J, Rosenfield NS, Berger L. Liver regeneration in children after major hepatectomy for malignancy. *J Surg Res* 1996; 61: 183-9.
21. Andıran F, Ayhan A, Tanyel FC, Abbasoğlu O. and Sayek İ. Regenerative capacities of normal and cirrhotic liver following 70% hepatectomy in rats and the effect of a-Tocopherol on cirrhotic regeneration, *Journal of Surgical Research* 2000; 89: 184-8.
22. Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation, *Mechanisms of Development* 2003; 120: 117-30.
23. Gaglio PJ. Liver regeneration investigated in a non-human primate model (Macaca mulatta), *Journal of Hepatology* 2000; 37: 625-32.
24. Berthoud HR, Neuhuber WL. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci* 2000; 85: 1-17.
25. Blumgart LH. Liver atrophy, hypertrophy and regenerative hyperplasia in the rat: The relevance of blood flow; in Porter R, Whelan J (eds): *Ciba Found Symp 55 (NS): Hepatotrophic Factors*. Amsterdam, Elsevier Excerpta Medica 1978; 181-215.
26. Cruise JL, Knechtle SJ, Bollinger RR, Kuhn C, Michalopoulos G. Alpha-1-adrenergic effects and liver regeneration. *Hepatology* 1987; 7: 1189-94.

27. Cucchiaro G, Yamaguchi Y, Milles E. Evaluation of selective liver denervation methods. *Am J Physiol* 1990; 259: 781-5.
28. Kato H, Shimazu T. Effect of autonomic denervation on DNA synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy. *Eur J Biochem* 1983; 134: 473-8.
29. Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ. Liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 556-62.
30. Morley CG, Royse VL. Adrenergic agents as possible regulators of liver regeneration. *Int J Biochem* 1981; 13: 969-73.
31. Ohtake M, Sakaguchi T, Yoshida K, Muto T. Hepatic branch vagotomy can suppress liver regeneration in partially hepatectomized rats. *HPB Surg* 1993; 6: 277-86.
32. Pietroletti R. Immunocytochemical study of the hepatic innervation in the rat after partial hepatectomy. *Histochem J* 1987; 19: 327-32.
33. Dubuisson L, Desmouliere A, Decourt B, Evade L, Bedin C, Boussarie L, et al. Inhibition of rat liver fibrogenesis through noradrenergic antagonism. *Hepatology* 2002; 35: 325-31.
34. Karagüzel G, Gedikoğlu G, Tanyel FC, Büyükpamukçu N, Hiçsönmez A. Subsequent biological effects of chemical sympathectomy in rats undergoing unilateral testicular torsion. *Eur Urol* 1995; 28: 147-51.
35. Tang Y. Norepinephrine modulates myelopoiesis after experimental thermal injury with sepsis. *Ann Surg* 2001; 233: 266-75.
36. Tanaka K, Ohkawa S, Nishino T, Niijima A, Inoue S. Role of the hepatic branch of the vagus nerve in liver regeneration in rats. *Am J Physiol* 1987; 253: 439-44.
37. Kuran O. *Sistematik Anatomi. Filiz Kitabevi, İstanbul* 1983; 429-43.
38. Nagasue N, Yukaya H, Ogawa Y. Human liver regeneration after major hepatic resection. *Ann Surg* 1987; 206: 30-9.
39. Isselbacher KJ, Podolsky DK. Liver and biliary tract disease. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine* (Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL editors), 14th Edition. McGraw-Hill, New York 1998: 1660-3.

40. Perek S, Kapan S. Ed: Değerli Ü, Bozfakioğlu Y. Cerrahi Gastroenteroloji. 5. Basım, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2000; 194-208.
41. Couinaud C. Liver anatomy: portal (and suprahepatic) or biliary segmentation. *Digest Surg* 1999; 16: 459-67.
42. Blumgart LH, Jarnagin W, Fong Y. Liver Resection for Bening Disease and for Liver and Biliary Tumors. In: *Surgery of The Liver and Biliary Tract* (Blumgart LH editors), 3th Edition. WB Saunders Company, New York 2000; 1639-715.
43. Emre A, Kalaycı G. Karaciğerin Cerrahi Anatomisi. *Genel Cerrahi* 2002; 2: 1083-90.
44. Rozga J, Jeppsson B, Bengmark S, Demetriou AA. A simple two-stage technique of total hepatectomy in rat. *J Surg Res* 1992; 52: 46.
45. Emond J, Capron-Laudereau M, Meriggi F, Bernuau J, Reynes M, Haussin D. Extent of hepatectomy in the rat. *Eur Surg Res* 1989; 21: 251.
46. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver of the white rat following partial removal. *Arch Path* 1931; 12: 186.
47. Borowiak M, Garratt AN, Wüstefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. Met provides essential signals for liver regeneration. *PNAS* 2004; 101: 10608-13.
48. Palmes D and Spiegel HU. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials* 2004; 1601-11.
49. Aoki T, Murakami M, Niiya T, Murai N, Shimizu Y, Kato H, et al. Capacity of hepatic regeneration following a second partial hepatectomy in rats, *Hepatology Research* 2001; 21: 228-41.
50. Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg* 2002; 89: 1089-95.
51. Fausto N. Hepatic regeneration. Zakim D, Boyer TD (eds). *Hepatology* WB Saunders, Philadelphia 1996; 32-58.
52. Ethier C, Kestekian R, Christine B, Dube C. Vitamin D depletion retards the normal regeneration process after partial hepatectomy in the rat. *Endocrinology* 1990; 126: 2947-59.

53. Bucher RL. Regeneration of Mammalian Liver. Cancer Commission of Harvard University 1995; 1081.
54. 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.
55. Bartel H, Orkisz S, Kmiec B. Ultrastructural of Hepatocyte Regeneration Rat Liver. *Folia Morphol* 1972; XXXVI: 367-72.
56. Tuzek HV, Rabes H. Loss of proliferation capacity of hepatocytes following subtotal hepatectomy. *Experientia* 1971; 27: 26-530.
57. Eguchi S, Kamlot A, Ljubimova J. Fulminant hepatic failure in rats: Survival and effect on blood chemistry and liver regeneration. *Hepatology* 1996; 24: 1452-9.
58. Fernandez MA, Turro S, Ingelmo-Torres M, Enrich C, Pol A. Intracellular trafficking during liver regeneration Alterations in late endocytic and transcytotic pathways, *Journal of Hepatology* 2004; 40: 132-9.
59. Ebrenfried JA, Ko TC, Thompson EA. and Evers BM. Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration, *Surgery* 1997; 122(5): 927-35.
60. Li Y, Wang HY. and Cho CH. Effects of heparin on hepatic regeneration and function after partial hepatectomy in rats, *World Journal of Gastroenterology* 1999; 5(4): 305-7.
61. Shimizu H, Miyazaki M, Wakabayashi Y, Mitsuhashi N, Kato A, Ito H, et al. Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats, *Journal of Hepatology* 2001; 34: 683-9.
62. Altun S ve Özalpan A. Hepatektomi oranı ile rejenerasyon arasındaki ilişki, *Rst.Tıp Fak. Mecmuası* 198; 61: 4.
63. Hou Z, Yanaga K, Kamohara Y, Eguchi S, Tsutsumi R, Furu J, et al. A new suppressive agent against interleukin-1b and tumor necrosis factor-a enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats, *Hepatology Research* 2003; 26: 40- 6.
64. Ankoma-Sey V. Hepatic regeneration- revisiting the myth of prometheus. *News Physiol Sci* 1999; 14: 149-55.

65. Schulte-Hermann R, Grasl-Kraupp E, Bursch W. Apoptosis and hepatocarcinogenesis. In: Jirtle RL, (Ed). Liver Regeneration and Carcinogenesis. Molecular and Cellular Mechanisms. Academic Press, San Diego California 1995; 141–78.
66. Kay MA, Fausto N. Liver regeneration: prospects for therapy based on new technologies, *Molecular Medicine Today* 1997; 108-15.
67. Andreeff M, Goodrich DW, Pardee AB. Cell proliferation, differentiation and apoptosis, *Cancer Medicine*, 6th Edition, Cancer Biology, Section 1, Chapter 2, BC Decker Inc 2000; 17-32.
68. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
69. Lockshin RA, Zakeri ZF. Programmed cell death: New thoughts and relevance to aging. *J Gerontol* 1990; 45: 135–40.
70. Jungermann K, Stumpel F. Role of hepatic, intrahepatic and hepatoenteral nerves in the regulation of carbohydrate metabolism and hemodynamics of the liver and intestine. *Hepatogastroenterology* 1999; 46(suppl 2): 1414-7.
71. Rangari M, Sinha S, Kapoor D, Mohan JC, Sarin SK. Prevalence of autonomic dysfunction in cirrhotic and noncirrhotic portal hypertension. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 707–13.
72. Hendrickse MT, Thuluvath PJ, Triger DR. Natural history of autonomic neuropathy in chronic liver disease. *Lancet* 1992; 339: 1462-4.
73. Dillon JF, Plevris JN, Nolan J, Ewing DJ, Neilson JM, Bouchier IA, et al. Autonomic function in cirrhosis assessed by cardiovascular reflex tests and 24-hour heart rate variability. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1544-7.
74. Miyajima H, Nomura M, Muguruma N, Okahisa T, Shibata H, Okamura S, et al. Relationship among gastric motility, autonomic activity, and portal hemodynamics in patients with liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 647–59.
75. Pozzi M, Grassi G, Redaelli E, Dell’oro R, Ratti L, Redaelli A, Foglia G, et al. Patterns of regional sympathetic nerve traffic in preascitic and ascitic cirrhosis. *Hepatology* 2001; 34: 1113–8.

76. Kiba T. The Role of the Autonomic Nervous System in Liver Regeneration and Apoptosis – Recent Developments. *Digestion* 2002; 66: 79–88.
77. Cruise JL, Knechtle SJ, Bollinger RR, Kuhn C, Michalopoulos G. Alpha-1-adrenergic effects and liver regeneration. *Hepatology* 1987; 7: 1189–94.
78. Andre C, Couton D, Gaston J, Erraji L, Renia L, Varlet P, et al. Beta-2-adrenergic receptor-selective agonist clenbuterol prevents Fas-induced liver apoptosis and death in mice. *Am J Physiol* 1999; 276: 647–54.
79. Souba WW, Wilmore DW. Animals Models of Liver Regeneration. In: Rozga J (Eds). *Surgical Research*. Academic Press, San Diego California 2001; 623-36.
80. McGowan JA, Strain A, Bucher NLR. DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: Effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon and cyclic-AMP. *J Cell Physiol* 1981; 108: 353-60.
81. Taub R, Greenbaum LE, Peng Y. Transcriptional regulatory signals define cytokine-dependent and independent pathways in liver regeneration. *Sem Liver Dis* 1999; 19: 117-27.
82. La Brecque DL, Feigenbawn A, Bachur NR. Diurnal rhythm: Effects on hepatic regeneration and hepatic regenerative stimulator substance. *Science* 1978; 199: 1082-4.
83. Maruyama H, Harada A, Kurokawa T, Kobayashi H, Nonami T, Nakao A. Duration of liver ischemia and hepatic regeneration after hepatectomy in rats. *J Surg Res* 1995; 58: 290-4.
84. Chijiwa K, Nakano K, Kameoka N, Nagai E, Tanaka M. Proliferating cell nuclear antigen, plasma fibronectin, and liver regeneration rate after seventy percent hepatectomy in normal and cirrhotic rats. *Surgery* 1994; 116: 544-9.
85. Ngala Kenda JF, Hemptinne B, Lambotte L. Role of metabolic overload in the initiation of DNA synthesis following partial hepatectomy in the rat. *Eur Surg Res* 1984;16: 294-9.
86. De Sequra AG, Aguilera MJ, Codesal J, Codoceo R, De-Miguel E. Comparative effects of growth hormone in large and small bowel resection in the rat. *J Surg Res* 1996; 62: 5-10.

87. Kamel OW, Franklin WA, Ringus, Meyer JS. Thymidine labeling index and Ki-67 growth fraction in lesions of the breast. *Am J Pathol* 1989; 134(1): 107-13.
88. Kallioniemi OP, Blanco G, Alavaikko M, Hietanen T, Mattila J. Improving the prognostic value of DNA flow cytometry in breast cancer by combining DNA index and S-phase fraction. *Cancer* 1988; 62: 2183-90.
89. Chow PKH. Serial ultrasoundguided ercutaneous liver biopsy in a partial hepatectomy porcine model: a new technique in the study liver regeneration. *J Surg Res* 1997; 70: 134-7.
90. Iimura Y, Nishiura T, Hellerbrand C. NFB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J Clin Invest* 1998; 101: 802-11.
91. Tzung SP, Fausto N, Hockenbery DM. Expression of Bcl-XL family during liver regeneration and identification of Bcl-XL as a delayed early response gene. *Am J Pathol* 1997; 150: 1985-95.
92. Selzner M, Clavien PA. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: Disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology* 2000; 31: 35-42.
93. Tanno M, Taguchi T. Proliferating cell nuclear antigen in normal and regenerating rat livers. *Exp Mol Pathol* 1999; 67: 192-200.
94. Assy N. Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats, *J Lab Clin Med* 1998; 131: 251-6.
95. Picard C, Lambotte L, Starkel P, Sempoux C, Saliez A, Berge VVD, et al. Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats, *Journal of Hepatology* 2002; 32: 645-52.
96. Kamer E, Çöker A, Sevinç AR, Özkara E, Özer E. and Özzeybek T. Effect of intraperitoneal administration of gemcitabine and paclitaxel on hepatic regeneration in rats, *Turk J Gastroenterol* 2003; 14(1): 1-6.
97. Furuta K, Kakita A, Takahashi T, Tomiya T. and Fujiwara K. Experimental study on liver regeneration after simultanous partial hepatectomy and pancreatectomy, *Hepatology Research* 2000; 17: 223-36.

98. Kaya Y, Coşkun T, Aral E. Pringle manevrasının parsiyal karaciğer rezeksiyonundan sonra karaciğerin Interlökin-6 üretimine etkisi, Çağdaş Cerrahi Dergisi 2002; 16(4): 202-7.
99. Gerdes J, Lemke H, Barsch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunology 1984; 133(4): 1710-5.
100. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a Mouse monoclonal antibody reactive with a human antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer 1983; 31: 13-20.
101. Hopf NJ, Brem J, Bohl J, Perneczky A. Image analysis of proliferating cells in tumors of the human nervous system: an immunohistological study with the monoclonal antibody Ki-67. Neurosurgery 1994; 35(5): 917-23.
102. Dalquen P, Baschiera B, Chaffard R, Dieterich H, Feichter GE. MIB-1 (Ki-67) immunostaining cancer cells in cytologic smears. Acta Cytol 1997; 41 (2): 229-37.
103. Wintzer HO, Zipfel I, Mönting JS, Hellrich U, Kleist S. Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. Cancer 1991; 67(2): 421-8.
104. Tavassoli FA. General consideration. In: Pathology of the Breast. ed.2. Connecticut, Appelton & Lange 1999; 26-62.
105. Bai M, Agnantis NJ, Kamina S, Demou A, Zagorianakou P, Katsaraki A, Kanavaros P. In vivo cell kinetics in breast carcinogenesis. Breast Cancer Res 2001; 3: 276-83.
106. Dağistan E. Meme kanserinde hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi (Uzmanlık Tezi). İstanbul: Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2002.
107. Ikeda G, Isaji S, Das BC, Watanabe M, Kawarada Y. Prognostic significance of biologic factors in squamous cell carcinoma of the esophagus. Cancer 1999; 86: 1396-405.
108. Matsushima H, Goto T, Hosaka Y, Kitamura T, Kawabe K. Correlation between proliferation, apoptosis and carcinogenesis in prostate carcinoma and their relation to androgen ablation. Cancer 1999; 85: 1823-7.

109. Manzoni G, Verlato G, Tomezzoli A, Guglielmi A, Pelosi G, Ricci F. Study on Ki67 immunoreactivity as a prognostic indicator in patients with advanced gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1998; 28: 534-7.
110. Mars WM, Kim TH, Stolz DB. Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for the initiation of liver regeneration. *Hepatology* 1995; 21: 1695-701.
111. Laurent S, Otsuka M, De Saeger C. Expression of presumed specific early and late factors associated with liver regeneration in different rat surgical models. *Lab Invest* 2001; 81: 1299-307.
112. Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol* 2007; 213: 286–300.
113. Tanaka Y, Mak KM, Lieber CS. Immunohistochemical detection of proliferating lipocytes in regenerating rat liver. *J Pathol* 1990; 160: 129-34.
114. Widmann JJ, Fahimi HD. Proliferation of mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells in regenerating rat liver. *Am J Pathol* 1975; 80: 349-66.
115. Theocharis SE, Skepelitou AS, Margeli AP. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 245-52.
116. Mokry J, Nemecek S. Immunohistochemical detection of proliferative cells. *Sb Ved Pr Le7k Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove* 1995; 38: 107-13.
117. Akça S, Dinçer D. Karaciğer Rejenerasyon Yeteneği: Karaciğerin Diğer Organlardan Farkı. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi* 2004; 8/4: 261-5.
118. Watanabe M, Yamaguchi K, Chijiwa K. and Tanaka M. Improves survival and pulmonary injury after partial hepatectomy under ischemia/reperfusion in rats. *Journal of Surgical Research* 2001; 101: 146-51.
119. Debonera F, Aldeguer X, Shen X, Gelman AE, Gao F, Que X, et al. Activation of interleukin-6/STAT3 and liver regeneration following transplantation, *Journal of Surgical Research* 2001; 96: 289-95.
120. Vogten JM. Angiogenesis in the liver, *Drukkerij Onkenhout B.V. Hilversum* 2004; 1: 10-20.

121. Tsuchiya T, Miyazawa M, Abe T, Saito T, Kanno H, Ishii S, et al. Hepatic regeneration and ischemia/reperfusion injury in fatty-liver rats, *Transplantation Proceedings* 2000; 32: 2324.
122. Selden AC, Hodgson HJF. Growth factors and the liver. *Gut* 1991; 32:601-3.
123. Panis Y, Lomri N, and Emond JC. Early gene expression associated with regeneration is intact after massive hepatectomy in rats. *Journal of Surgical Research* 1998; 79: 103-8.
124. Nakamura T, Ueno T, Sakamoto M, Sakata R, Torimura T, Hashimoto, et al. Suppression of transforming growth factor- $\beta$  results in upregulation of transcription of regeneration factors after chronic liver injury, *Journal of Hepatology* 2004; 41: 974-82.
125. Michalopoulos GK, Appasamy R. Metabolism of HGF-SF and its role in liver regeneration. *EXS* 1993; 65: 275-83. Review.
126. Akino K, Akita S, Mizuguchi T, Takumi I, Yu R, Wang X, et al. A novel molecular marker of pituitary tumor transforming gene involves in a rat liver regeneration, *Journal of Surgical Research* 2005.
127. Kaibori M, Sakakura Y, Oda M, Okumura T, Kwon AH and Kamiyama Y. Role of hepatocyte growth factor in hepatic ischemia and reperfusion Injury, *Transplantation Proceedings* 2000; 32: 2285-6.
128. 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.
129. Nishizaki T, Takenaka K, Yoshizumi T. Alteration in levels of human hepatocyte growth factor following hepatectomy. *J Am Coll Surg* 1995; 181: 6-10.
130. Ishii 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.
131. Scotte M, Masson S, Lyoumi S, Hiron M, Paul Teniere P, Lebreton JP, et al. Cytokine gene expression in liver following minor or major hepatectomy in rat, *Cytokine* 1997; 9(11): 859-67.

132. Akerman P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby GJ, et al. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol* 1992; 263: 579-85.
133. Yamada Y, Webber EM, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Analysis of liver regeneration in mice lacking type 1 or type 2 tumor necrosis factor receptor: Requirement for type 1 but not type 2 receptor. *Hepatology* 1998; 28: 959-70.
134. Kirillova I, Chaisson M, Fausto N. Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor kappaB activation. *Cell Growth Differ* 1999; 10(12): 819-28.
135. Rai RM, Lee FY, Rosen A, Yang SQ, Lin HZ, Koteish A, et al. Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(23): 13829-34.
136. Meissner M. Biomarkers of sepsis: clinically useful? *Current Opin Crit Care* 2005; 11: 473-80.
137. Galun E, Axelrod JH. The role of cytokines in liver failure and regeneration: potential new molecular therapies, *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1592: 345-58.
138. Salazar-Montes A, Rincon AR, Panduro A, Armendariz-Borunda J. Chemically induced liver regeneration is characterized by specific IL-6 gene expression, *Hepatology Research* 1999; 15: 10-21.
139. Amfiregülin: Farelerde Karaciğer Rejenerasyonunun Erken Tetikleyicisi, *Gastroenterology Türkçe Baskı* 2005; 1(1): 43-51.
140. 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.
141. Strazl TE, Porter KA, Kashiwagi N. Portal hepatotrophic factors, diabetes mellitus and acute liver atrophy, hypertrophy and regeneration. *Surg Gynecol Obstet* 1975; 141: 843-58.
142. Francavilla A, Polimeno L, Barone M. Hepatic regeneration and growth factors. *J Surg Oncol* 1993; 13: 1-7.

143. Van Thiel DH, Stauber R, Gavalier JS. Hepatic regeneration. Effects of age, sex hormone status, prolactine and cyclosporine. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 1309-12.
144. Svonos GW, Eagon PK, Elm M. Effect of antiandrogen flutamide on measures of hepatic regeneration in rats. *Dig Dsi Sci* 1989; 34: 1916-23.
145. 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.
146. Ekberg S, Luther M, Nakamura T. Growth hormone promotes early initiation of hepatocyte growth factor gene expression in the liver of hypophysectomised rats after partial hepatectomy. *J Endocrinol* 1992; 135: 59-67.
147. Goss JA, Mangino MJ, Callery MP. Prostaglandin E2 down regulates kupffer cell production of IL-1 and IL-6 during hepatic regeneration. *Am J Physiol* 1993; 601-8.
148. Tsujii H, Okamoto Y, Kikuchi E. Prostaglandin E2 and liver regeneration. *Gastroenterology* 1993; 105: 495-9.
149. Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC. Travmaya sistemik yanıt: Principles of Surgery, Türkçesi. Yedinci baskı. Geçim IE (ed) Ankara 1999, 3-55.
150. Holmin T, Ekelund M, Kullendorff CM. A microsurgical method for denervation of the liver in the rat. *Eur Sug Res* 1984; 16: 288–93.
151. Lutt WW. Evaluation of surgical denervation of the liver in cats. *Can J Physiol Pharmacol* 1989; 59: 1013–6.
152. Lutt WW. Afferent and efferent neural roles in liver function. *Prog Neurobiol* 1983; 21: 323–48.
153. Nakade Y, Yoneda M, Nakamura K. Involvement of endogenous CRF in carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Am J Physiol* 2002; 282: 1782–8.
154. Yokohama S, Yoneda M, Nakamura K. Effect of central corticotropinreleasing factor on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Am J Physiol* 1999; 276: 622–8.

155. Chelmicka-Szorc E, Arnason BGW. Effect of 6-hydroxydopamine on tumor growth. *Cancer Res* 1976; 36: 2382.
156. Clark DWJ, Lavery R, Pheln EL. Long-lasting peripheral and central effects of 6-hydroxydopamine in rats. *Br J Pharmacol* 1972; 44: 233.
157. Collier B, Johnson G, Quik M, Welmer S. Effect of chemical destruction of adrenergic neurons on some cholinergic mechanisms in adult rat sympathetic ganglia. *Br J Pharmacol* 1984; 82: 827.
158. Zochodne DW, Huang Z, Word KK, Low PA. Guanethidine induced adrenergic sympathectomy augments endoneural perfusion and lowers microvascular resistance. *Brain Research* 1990; 519: 112.
159. Fan Y, Praet M, Huysse JV, Lelie B, Hemptinne B. Effects of portal vein arterialization on liver regeneration after partial hepatectomy in the rat, *Liver Transplantation* 2002; 8(2): 146-52.
160. Wada W, Medina J, Hasegawa Y, Kuwano H, Kojima I. Adenovirusmediated overexpression of the activin bc subunit accelerates liver regeneration in partially hepatectomized rats, *Journal of Hepatology* 2005; 43: 823-8.
161. Pediaditakis P, Lopez-Talavera JC, Petersen B, Monga SP, Michalopoulos GK. The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat. *Hepatology* 2001; 34: 688–693.
162. Iwai M, Cui T, Kitamura H, Saito M, Shimazu T. Increased secretion of tumour necrosis factor and interleukin 6 from isolated, perfused liver of rats after partial hepatectomy, *Cytokine* 201; 13(1): 60-4.
163. Scotte M, Daveau M, Hiron M, Tcnikre P, Lebreton JP. Absence of expression of interleukin-6 (IL-6) mRNA in regenerating rat liver, 1993; 315(2): 159-62.
164. Hall PA, Levison DA. Assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol* 1990; 43: 184-92.
165. Baak JPA. Mitosis counting in tumors. *Hum Pathol* 1990; 21: 683-5.

166. Ouchi K, Sugawara T, Ono H. Mitotic index is the best predictive factor for survival of patients with resected hepatocellular carcinoma. *Dig Surg* 2000; 17: 42-8.
167. Ebelt J, Neid M, Tannapfel A. Prognostic significance of proliferation markers in hepatocellular carcinoma (HCC). *Zentralbl Chir* 2000; 125: 597-601.
168. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-92.
169. Bachem MG, Sell KM, Melchior R, Kropf J, Eller T, Gressner AM. Tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor  $\alpha$ 1 (TGF  $\alpha$ 1) stimulate fibronectin synthesis and the transdifferentiation of fat-storing cells in the rat liver into myofibroblasts. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1993; 63: 123-30.
170. Laconi S, Curreli F, Diana S. Liver regeneration in response to partial hepatectomy in rats treated with retrorsine: a kinetic study. *J Hepatol* 1999; 31: 1069-74.
171. Yamano T, Hirai R, Hato S. Delayed liver regeneration with negative regulation of hepatocyte growth factor and positive regulation of transforming growth factor $\alpha$ 1RNA after portal branch ligation in biliary obstructed rats. *Surgery* 2002; 131: 163-71.
172. Iatropoulos MJ, Williams GM. Proliferation markers. *Exp Toxicol Pathol* 1996; 48: 175-81.
173. Rudolph P, Peters J, Lorenz D, Schmidt D, Parwaresch R. Correlation between mitotic and Ki-67 labeling indices in paraffin-embedded carcinoma specimens. *Hum Pathol* 1998; 29: 1216-22.
174. Kogure 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: 977-84.
175. Sakaguchi K, Takeuchi E, Suzuki M. DNA polymerases and Ki-67 nuclear antigen are induced in correlation with the resected mass of rat liver up to 90%. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385: 135-42.
176. Gerlach C, Sakkab D. Y, Scholzen T, Dabler R. Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *J Hepatol* 1997; 26: 573-8.