

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**MEME KANSERİ VE G-CSF İLE FARELERDE İNDÜKLENEN
SPLENOMEGALİ MODELİNDE
PARSİYEL VE TOTAL SPLENEKTOMİNİN MİYELOİD
HÜCRELERE ETKİSİ**

Dr. Coşkun ÖZER

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Ataç BAYKAL

ANKARA 2016



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında gösterdiği üstün destek ve yardımlarından dolayı tez danışmanım Prof.Dr.Ataç Baykal'a , cerrahi kısmında yardımlarından dolayı Dr. Ömer Cennet, Dr. Murathan Erkent'e her zaman varlıklarını ve desteklerini hissettiğim eşime, aileme ve genel cerrahi hocalarıma, asistan arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr.Coşkun Özer

ÖZET

Ozer C. Splenomegali modelinde parsiyel ve total splenektominin kan parametrelerine etkisi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi, ANKARA 2016.

Birçok kanser tipinde immun sistemin işleyişinde bozukluklar görülür. Miyeloid kökenli hücreler tümör dokusuna yerleşerek kanser gelişimine, yayılım ve damarlanmasına katkıda bulunabilirler. MKH' nin asıl yerleşim yerleri ise dalak ve karaciğerdir. Özellikle yüksek düzeyde G-CSF eksprese eden kanser türlerinde hastalığın bu faktörle korele olarak daha kötü prognoz gösterdiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada 4T1 meme kanseri hücresi ve ticari G-CSF ile meydana getirilen splenomegali modelinde total ve parsiyel splenektominin periferik kan örneklerindeki immünolojik farklılıklar değerlendirilecektir. Çalışmaya toplam 28 adet altı haftalık Balb-c cinsi fare dahil edildi. Fareler kontrol meme kanseri, kontrol G-CSF enjeksiyonu uygulanan, meme kanseri sonrası parsiyel splenektomi, meme kanseri sonrası total splenektomi, G-CSF enjeksiyonu sonrası parsiyel splenektomi ve G-CSF enjeksiyonu sonrası total splenektomi olmak üzere altı gruba ayrıldı. Farelerde haftada iki kez tümör çapı, vücut ağırlıkları ve genel sağlık durumları takip edildi. G-CSF enjeksiyonu ise altı hafta boyunca hergün uygulandı. Tümör inokülasyonundan iki hafta ve G-CSF enjeksiyonunun üçüncü haftasında farelere total ve parsiyel splenektomi uygulandı. İşlemlerden üç hafta sonra deney sonlandırıldı.

Dalak ve toplanan kan örneklerinde MKH düzeyleri akım sitometrik immünofenotiplendirme ile analiz edildi. G-CSF splenomegaliyi destekledi. Splenektomi yapılan grupta da G-CSF ile sinerjistik olarak kilo artışı izlendi. Yapılan immünolojik analizlerde dalakta yüksek düzeyde MKH ve immatür granülosit hücre birikimi olduğu görüldü. Parsiyel splenektomi sonrası dalakta monositik hücre artışı gözlenirken, periferik kanda granülositik hücre artışı gözlemlendi.

Parsiyel ve total splenektomi sonrası metastaz dan sorumlu olan miyeloid kökenli hücrelerin sayısı çalışmamızda belirgin düşük saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: miyeloid kökenli hücre, granülosit koloni stimulan faktör, splenektomi



ABSTRACT

Ozer C. The effect of parsiyal and total splenectomy on the blood parameters in splenomegaly model. Hacettepe University Medical Department, PhD Thesis of General Surgery, ANKARA 2016.

Immune system plays an important role in the formation, distribution and destruction of cancer cells. Myeloid derived cell located into the tumor tissue may contribute to development of malignancy, invasion and vascularization. Spleen is the primary location of myeloid derived cells. In this study, immunological differences of peripheral blood samples between total and partial splenectomy at splenomegaly model which are generated by 4T1 breast cancer cells and commercial G-CSF will be assesed. Totally 28 Balb/c 6-week-old mice were included in this study. Mice were seperated into 6 subgroups as control breast cancer group, control G-CSF injected group, total splenectomy after breast cancer group, partial splenectomy after breast cancer group, total splenectomy after G-CSF injection group, partial splenectomy after G-CSF group. Tumor sizes, weights and general conditions of mice were checked twice a week. G-CSF injections were applied every day throughout 6 weeks. Partial and total splenectomy were applied to mice after 2 weeks tumor implantation and third week of G-CSF injection. After 3 weeks later all the procedures, we had experiment finished after 3 weeks. MKH levels in blood and spleen samples were analyzed by flow cytometric immunophenotyping. In splenectomy group weight gain were observed by injection of G-CSF. G-CSF supported splenomegaly. In immunological analyzes, high levels of MKH and immature granulocyte cell accumulation are seen in spleen samples. After partial splenectomy, while increase in cell number of monocytic series are observed at spleen, increase in granulocyte derived cells were seen at peripheral blood. Myeloid derived cells which are responsible for metastasis after partial and total splenectomy are determined at low levels.

Key words: myeloid derived cell, granulocyte colony stimulating factor, splenectomy

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kanser	2
2.2. Kanser İmmünolojisi.....	2
2.2.1 Kanser antijenleri	4
2.2.2 Efektör Mekanizmalar.....	4
2.2.2.1 Humoral immünite	4
2.2.2.2 Hücresel immünite	5
2.2.2.2.1 Sitotoksik T Lenfositler (CTL)	5
2.2.2.2.2 Makrofajlar.....	6
2.2.2.2.3 Natural Killer Hücreler (NK)	6
2.2.2.2.4 Dentritik hücreler	6
2.2.3 Kanserin İmmun Sistemden Kaçış Mekanizmaları.....	7
2.3 Meme Kanseri İmmünolojisi.....	7
2.3.1 Meme Kanseri	7
2.3.2 Meme Kanseri ve Mikroçevre.....	8

2.3.2.1 Hücre Dışı Matriks (HDM).....	9
2.3.2.2 Fibroblastlar	9
2.3.2.3 Vasküler Sistem	10
2.3.2.4.İmmün Hücreler.....	10
2.3.3. Miyeloid Kökenli Hücreler.....	12
2.3.4. Meme Kanserinde T Hücre Yanıtları	13
2.4. Deneysel Meme Kanseri Oluşturulması.....	13
2.5. Dalak	14
2. 5.1. Dalağın Fonksiyonları ve İmmünolojik Etkileri	15
2.5.2. Splenektomi Endikasyonları	16
2.5.3. Splenektomi Teknikleri.....	16
2.5.4. Splenektomi komplikasyonları.....	17
2.6. Splenektomi İmmünolojisi.....	18
3. MATERYAL METOD	19
3.1. Deney Hayvanları ve Protokolü	19
3.2 Çalışma Grupları	19
3.3. Anestezi.....	21
3.4. Cerrahi Teknik	21
3.4.1. Total Splenektomi	22
3.4.2. Parsiyel Splenektomi.....	22
3.5 Değerlendirme Parametreleri	22
3.6. İstatistiksel Analizler.....	24
4. BULGULAR	28
4.1. Hayvan Ağırlıkları	28

4.2. Dalak Boyut ve Ağırlıkları.....	29
4.3. Tümör Ağırlık Ve Çapları.....	32
4.4. Myeloid Kökenli Hücre Sayı ve Dağılımları	34
4.4.1.Periferik kanda myeloid kökenl hücreler	35
4.5. Periferik Kanda Lökositoz	37
4.6. Dalakda Myeloid Kökenli Hücreler	38
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇ.....	43
7. KAYNAKLAR	44

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

MDSC Miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler(myeloid depended stem cell)

MKH Miyeloid kökenli hücreler

CTL Sitotoksik T lenfositler

NK Doğal öldürücü hücreler (naturel killer)

TİM Tümör ilişkili makrofajlar

TAN Tümör ilişkili nötrofiller

TAA Tümör bağlantılı antijenler

TSA Tümör spesifik antijenler

TSTA Tümör spesifik transplantasyon antijenleri

MHC Major histocompatibility kompleks

TNF Tümör nekroz faktör

PG Prostoglandinler

HDM Hücre dışı matriks

MMP Matriks metalloproteaz

TGF- β Transforming growth faktör-beta

VEGF Vasküler endotelyal growth faktör

DC Dendritik hücreler

NO Nitrik oksit

GM-CSF Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör

IFN Interferon

STAT 6 Phospho-signal transducer and activator of transcription 6

iNOS İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

c AMP Siklik adenosin mono fosfat

RES Retikuloendotelyal sistem

RESİMLER DİZİNİ

Resim.1: G-CSF enjeksiyonu yapılmış tümörsüz farenin laparotomi öncesi görüntüsü....	24
Resim.2: 4T1 meme kanseri hücresi enjekte edilmiş farede laparotomi öncesi.....	24
Resim. 3: Orta hat laparotomi insizyonu ile karın içine girilmesi.....	25
Resim. 4: G-CSF enjeksiyonu sonrası laparotomide splenomegali görüntüsü.	25
Resim. 5: G-CSF sonrası splenomegali görülen dalakta total splenektomi.	26
Resim. 6: Laparotomi ve splenektomi sonrası katların anatomik olarak kapatılması sonrası.	26
Resim. 7: 4T1 meme kanseri hücresi enjeksiyonu sonrası görülen splenomegali	27
Resim. 8: Parsiyel splenektomi sonrası kalan dalak dokusunun görüntüsü.	27
Resim. 9: G-CSF sonrası kontrol grubu ve parsiyel splenektomi uygulanan farelerin sakrifikasyon sonrası dalak görüntüleri.	30
Resim. 10: 4T1 meme kanseri hücresi enjeksiyonu sonrası parsiyel splenektomi uygulanan farelerin sakrifikasyon sonrası çıkarılan dalak ve tümörleri	31
Resim. 11: Total splenektomi sonrası çıkan dalak spesmenlerinin görüntüsü	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.4.1. 1: Hayvan ağırlıkları.....	28
Şekil.4.2. 1: Dalak ağırlıkları	29
Şekil.4.3.1: Tümör ağırlık değişimleri.....	32
Şekil.4.3. 2: Tümör boyut değişimleri.....	33
Şekil.4.3.3: Sakrifikasyon sonrası tümör boyut değişimleri.....	33
Şekil.4.4.1.1: Periferik kanda miyeloid kökenli hücre sayı ve dağılımları.....	35
Şekil.4.4.1. 2: Periferik kanda monositik hücre dağılımları.....	35
Şekil.4.4.1.3: Periferik kanda granülositik hücre dağılımları.....	36
Şekil.4.5.1: Periferik kanda lökositoz.....	37
Şekil.4.6.1: Dalakta Total miyeloid kökenli hücre yüzdeleri.....	38
Şekil.4.6.2: Dalakta granülositik hücre sayıları.....	39
Şekil.4.6.3: Dalakta monositik hücre sayıları.....	40

GİRİŞ ve AMAÇ

Birçok kanser tipinde immün sistemin işleyişinde bozukluklar görülür. Tümör dokusundaki kanser hücreleri tarafından üretilen granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (granulocyte-macrophage colony –stimulating factor, GM-CSF), granülosit koloni faktör (granulocyte colony –stimulating factor, GCSF), makrofaj koloni uyarıcı faktör (macrophage colony –stimulating factor, M-CSF) ve kök hücre faktörü (stem cell, SCF) direk olarak hematopoezi destekleyici yönde etki gösteren faktörlerdir. Bu faktörler nedeni ile kemik iliği daha fazla miyeloid hücre üretmeye başlar ve bu hücreler olgunlaşmalarını tamamlayamadan dolaşıma geçerler. Tümör dokusuna yerleşen bu immatür hücreler tümör gelişimine, yayılmasına ve damarlanmasına katkıda bulunmaya başlar. Hatta kansere karşı gelişebilecek yeni immün aktiviteyi de baskılama kapasitesinde kazanırlar. Bu immatür hücrelerin özellikle dalak ve karaciğerde biriktiği, buralarda immün baskılama yaptığı; buralardan çıkarakta tümöre yerleşip kanseri destekleyen miyeloid hücrelere dönüştüğü bilinmektedir. Özellikle G-CSF’yi yüksek düzeylerde eksprese eden kanser türlerinde hastalığın bu faktörle körele olarak daha kötü prognoz gösterdiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada G-CSF’nin etkisini incelemek amacı ile bu faktörü yüksek düzeyde eksprese eden 4T1 meme kanseri hücresi ve direk olarak ticari G-CSF (filgrastim) kullanılacaktır. Bu amaçla deney hayvanlarında doğrudan tümör geliştirelerek veya tümörden salgılanan faktör olan G-CSF enjekte edilerek periferik kan ve dalakta oluşacak değişiklikler araştırılacaktır. Daha sonra bu hayvanların bir kısmına (yeni bir gurup olarak) splenektomi veya parsiyel splenektomi uygulanacak ve bir süre (2 hafta) takip edildikten sonra periferik dolaşımda ki immünolojik farklılıklar, tümör boyutu ve metastazlardaki değişimler değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser DNA hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasıdır. Kanserlerin çoğunu benign bir lezyondan in situ kanserlere ve invaziv kanserlere dönüştüğüne inanılmaktadır. Kanserli hücreler immün sistemimiz tarafından hergün taranır ve yok edilmeye çalışılır (1).

Hücre büyümesi ve çoğalması yakın kontrol altındadır. Kanser hücrelerinde bu kontrol mekanizması bozulur ve kanser hücreleri agresif bir şekilde büyümeye ve çoğalmaya başlar.

Kanser gelişiminin üç aşaması bulunmaktadır. Başlangıç (initiation), ilerleme (promotion) ve gelişme (progression).

Apoptozis kanser hücrelerinin hücre siklusunda programlı hücre ölümünü tarifler. Kanser hücreleri gelişmesi esnasında apoptozise girmezler ve bunu takiben kanser hücreleri çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve onkogenlerle invazyon, metastaz (yayılma) ve anjiyogenezis (tümörün büyüme ve metastaz yapabilmesi için damarlanması) özelliklerini kazanırlar (2).

2.2. Kanser İmmünolojisi

İmmün sistemin kansere karşı koruyucu etkisi olduğu bilinmektedir. Fakat bazı immünitesi düşük kanserlerin oluşumuna da katkısı olduğu öğrenilmektedir.

Kanser immünolojisi 3 başlık altında incelenebilir.

- 1-Kanser antijenleri
- 2-Efektör mekanizmalar
 - a.Humoral immünite
 - b.Hücrel immünite
- 3-Kanserin immüniteden kaçış mekanizmaları

2.2.1. Kanser Antijenleri

Antijen humoral ve hücrel immün oluşturabilen yabancı moleküllerdir. Tümör antijenlerini sınıflandıracak olursak;

A-Tümör bağlantılı antijenler (TAA)

Kanser hücrelerinde olduğu gibi normal hücrelerde de olabilen antijenlerdir. Onkofetal antijenler, CEA, AFP, MHC CLASS 1 VE CLAAS 2 antijenler bu gruptadır.

B-Tümör spesifik antijenler (TSA)

Normal hücrelerde görülmeyen kanser hücreleri spesifik kanser hücreleridir. Belli bir virüse ait kanser oluşturan antijenler örnek verilebilir.

C-Tümör spesifik antijenler (TSTA)

Konakta immün cevabı uyaran, tümör büyümesine karşı direncin ve tümör reaksiyonu ile sonuçlanan bir dizi reaksiyonun oluşmasına sebep olan antijenlerdir.

Tümör antijenlerinin modern sınıflandırılması ise antijen yapısı ve kaynağı ile ilgilidir (3,4,5).

- 1) Onkofetal antijenler (CEA, AFP)
- 2) Glikolipid ve glikoproteinler
- 3) Onkojenik virüs proteinleri (HPV, EBV)
- 4) Onkogen veya tümör supresör gen ürünleri (HER-2/neu)
- 5) Mutasyona uğramış konak proteinleri
- 6) Normal dokularda suskun olan gen ürünleri
- 7) Aşırı ekspresi olan gen ürünleri
- 8) Normalde dokunun köken aldığı hücrede bulunan diferansiyasyon antijenleri (PSA)

2.2.2. Effektor Mekanizmalar

2.2.2.1. Humoral İmmünite

A-Antikor bağımlı hücresel sitotoksite (ADCC) : NK hücreler, makrofajlar, granülositler gibi fagositer hücreler hücre lizisine aracılık ederler. Anti-tümör antikorlarla kaplanmış tümör hücreleri Fc bölgelerinden Fc reseptörleri bulunduran NK hücrelerine tutunurlar. NK hücreleri tümör hücrelerini lizis ile yok ederler. ADCC

mekanizması kompleman bağımlı sitotoksositeye kıyasla tümör eliminasyonunda daha etkili bir mekanizmadır(6).

B-Kompleman ile lizis : Tümör hücrelerindeki antijenlerin antikorlarla birleşmesi sonucu kompleman sistemi aktive olur. İn vitro çalışmalar bu mekanizmanın daha çok süspansiyon halindeki tümörlere etkili olduğunu solid tümörlerde lizis yapmadığını göstermiştir.

C-Hücre adezyonunun kaybı : Antikorların yüzey antijenlerine bağlanması tümör hücrelerinin adezyonu kaybı ile sonuçlanabilir. Böylece adezyon kaybı hücrenin malign klonlar oluşturmamasını engeller. Hücre adezyonu metastaz yapabilmesi için önce o organın endotelinin altındaki bazal membrana tutunması gerekir. Hücre yüzeyinin antikorlarla kaplı olması bu yapışmayı engeller.

2.2.2.2. Hücresel İmmünite

2.2.2.2.1. Sitotoksik T Lenfositler

Profesyonel APC'ler tarafından fagosit edilen tümör hücrelerine ait antijenler MHC sınıf I molekülleri ile CD8+ T lenfositlere sunulursa tümör spesifik CD8+ T Sitotoksik T lenfositler (CTL) proliferer olur ve tümör hücrelerini direkt olarak apoptoz ve lizis ile öldürürler. Yani immün sistem tümör antijeniyle karşılaştığında ilk olarak CTL tarafından tanınır. Bundan sonra sitolitik etkisini kullanabilmek için tümör antijeni MHC-1 tarafından tanınır.

2.2.2.2.2. Makrofajlar

Meme kanserinde makrofajlar tümör kitlesinden yarısından çoğunu oluşturabilirler. Makrofajlar tümör antijenlerini MHC-2 ile birleştirerek Th 1 hücrelerini uyarırlar. Th hücreleri B hücrelerini uyararak tümöre karşı savunma oluştururlar.

Makrofajlar kompleman reseptörleri ile antikorlar tarafından bağlanmış tümörleri tespit ederek sitotoksik etki ile de öldürürler.

Meme kanserinde makrofajların tümör hücrelerinin yayılma ve invazyon yapma riskini arttırdığından dolayı kötü prognoz olduğu kabul edilmiştir.

2.2.2.2.3. Naturel Killer Hücreleri (NK)

Proteinazlar, serbest oksijen radikalleri ile sitotoksik etkilerini gösteren bu hücreler immün olmamış ve özel antikorun yok olduğu durumlarda etkilidir (7).

2.2.2.2.4. Dentritik Hücreler

Olgun olmayan hücreler, tümörlerle karşılaşkıktan sonra aktifleşirler. MHC 1 ve 2 molekülleri ile tümörleri fagosite ederek, tümörü hem CD8+ hem de CD4+ T lenfositlere sunarlar (6).

2.2.3. Kanserin immun sistemden kaçış mekanizması

İmmün sistemden kaçmak için bazı tümörler antijen eksprese etmeyi durdururlar. Bu antijenini kaybetmiş varyant tümörler immun sistemden kaçarak büyümeye ve yayılmaya devam ederler.

- a) Tümör hücresi yüzeyindeki antijenik değişimler
Yüzeylerinde bulunan sialik asit sayesinde antijenlerini maskelerler. Yada yeteri kadar antijen eksprese etmezler.
- b) Antijen-antikor kompleksleri
MCH-1 ekspresyonunun durması ile gerekli CD8+ T hücre cevabı oluşamaz.
- c) Spesifik ve non-spesifik hücreler
Aktive makrofajlar t hücrelerini baskılayabilirler.
- d) Tümör tarafından oluşturulan süpresyon
Bazen salgılanan prostoglandinler immun cevabı baskılayabilirler, Ayrıca TNF alfa da immun sistemi baskılayabilir(6).
- e) Diğer faktörler.
AIDS gibi edinsel ve bazı genetik nedenler

2.3. Meme kanseri immünolojisi

2.3.1. Meme kanseri

Meme dokusu herbiri birkaç adet lobül içeren 15-20 adet lobdan oluşan, apokrin ter bezleri içeren epidermal bir dokudur. Meme 2. ve 7. kaburgalar arasında bulunur. Posterior yüzeyi pektoralis majör, serratus anterior, eksternal oblik kas fasyası ve rektus kılıfı üzerindedir. Meme epiteli bazal membran ile çevrilidir ve lanfatiklerce zengin kanal sistemi vardır.(8)

Kadınlarda en sık görülen kanser meme kanseridir ve tedaviye direnç gösterdiği için çeşitli tedavi modelleri günümüzde denenmektedir.

Meme kanseri lokal olarak deriyi ve arka tarafta kas fasyalarını invaze edebilir, lenfatikler ile aksilla ve intermammarian lenf nodlarını tutabilir, kan damararı ile uzak metastaz yapabilirler.

Moleküler olarak östrojen(ER), progesteron (PR) ve epitelyal büyüme hormonu (HER3) reseptörüne göre prognostik olarak değerlendirilebilir, tedavi planını değiştirebilirler.

2.3.2 Meme Kanseri ve Mikroçevre

Meme kanserinin başlangıç ve ilerleme evrelerinde somatik hücrelerde mutasyonlar oluşmaktadır.(9)

Fakat çoğu kanserde inflamasyonunda olduğu tespit edilmiştir.(10)

Meme kanserinin büyümesi, farklılaşması ve invazyon yapması fibroblast, miyofibroblast, lökositler, lenfasitler ve miyoepiteklyal hücreler tarafından gerçekleşmektedir.(11-12)

2.3.2.1 Hücre Dışı Matriks (HDM)

Hücrelerin arasındaki makromoleküler protein iplikleri ve fibröz dışı proteoglikanlardan oluşan ve tüm dokuların stromasında bulunan üç boyutlu ağ yapısıdır.

Fibronectin, tip 4 kollajen ve trombospondin -1 yapısal bütünlük ve birliklerine göre pro ve anti-anjiojenik sinyaller oluştururlar.(13)

İntegrin aracılı hücre dışı matriks malign transformasyona neden olur.(14-15)

Kanser hücreleri matriks metalloproteazları gibi proteolitik enzimler sentezleyerek kendilerine invaziv ortam sağlarlar ve bu metalloproteazlar invazivliğin belirleyicisidir.(16)

2.3.2.2. Fibroblastlar

TGF-B, tümör büyüme faktörü sitokini fibroblastlarda bulunur; karsinogeneizde ve metastaz da etkilidir.(17)

Karsinoma ilişkili fibroblastalar(CAF); vasküler endotelyal büyüme faktörü ve proteaz üreterek anjiogeneizde ilişkilidir.(16)

Fibroblastlar aktif stres durumunda hidrjen peroksit (H_2O_2) üretebilmek için miyofibroblastlara dönüşebilir ve DNA hasarına yol açabilirler.

2.3.2.3 Vasküler Sistem

Vasküler endotelyal büyüme hormonu (VEGF) anjiogenez için en önemli hormondur.

Anjiogenez: tümör hücrelerinin büyümesi, yayılması ve besin elde edebilmesi için yeni kan damarları ve lenf damarlarının oluşmasıdır.(18)

Anjiogenezin malign tümörlerde kalıcı olması VEGF reseptör-2 ün ekspresyonuna bağlıdır.(19). Eğer bu reseptör blokajı sağlanırsa anjiogenezde durma ve hücre dışı matriksde yeniden organizasyon başlar.(19)

2.3.2.4 İmmün Hücreler

İmmün hücreler normal meme stromasının önemli bileşenleri arasında değildir. Ancak edinsel ve doğal immün sistem hücreleri meme tümörü dokusunda belirgin düzeyde artış gösterir. İmmün hücre infiltrasyonu hem in situ hem de invaziv karsinomlarda gözlenmektedir. İmmün hücre artışı, memede tümörögenезisin ilerlemesi ile paralellik gösterir. Tümör mikroçevresinde hem doğal bağışıklık hücreleri, doğal öldürücü(natural killer, NK) hücreler, doğal öldürücü T (natural killer T) hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücreler (DC), hem de edinsel bağışıklık hücreleri, yardımcı T hücreleri, sitotoksik T hücreleri ve B hücreleri bulunur.

Doğal bağışıklık hücreleri dokunun tamirinde ve yeniden şekillendirilmesinde görev alır. Bu hücreler tarafından salgılanan faktörler genellikle tümör büyümesini destekler. Makrofajlar salgılanan proinflamatuvar sitokinlerin ana kaynağıdır. Neredeyse bütün tümörlerin mikroçevresinde makrofajlar bulunmaktadır. Klinik araştırmalarda meme kanserindeki makrofaj birikiminin kötü prognoza işaret ettiği gösterilmiştir. Ayrıca tümör mikroçevresindeki makrofajların tümör hücrelerinin invazyonunu ve metastazları

artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca makofajlar ürettikleri VEGF-A aracılığıyla tümörün invaziv ucunda anjiogeneze de yol açmaktadır. Bu hücreler genellikle tip 1 (M1) veya tip 2(M2) fenotipinde bulunurlar. M1; TNF-a, IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler üretirken M2; IL-4 ,IL-10, IL-13 gibi anti inflamatuvar sitokinleri salgılar. M1 lerden salgılanan IL-12, yardımcı T hücre 1 (Th1) gelişimine ve anti-tümör sitotoksik etkisine yardımcı olur. M2 ler immün baskılayıcı sitokinler salgılar ve tümör hücrelerinin büyümesini destekler. Tümör ilişkili makrofajlar (TAM) genellikle M 2 fenotipindedir. Bu hücrelerin infiltrasyonu pek çok kanserde kötü prognoz belirteçidir. TAM lar invazyon ve metastazı artıran pek çok proteaz salgılar. Salgıladıkları sitokinler tümöre özgül edinsel immün yanıtları inhibe eder ve anjiogenik faktörler de neovaskülarizasyonu artırır.

Nötrofiller de TGF-B varlığına göre tümörün destekleyicisi veya tümöre karşı olabilirler. Makrofajlar gibi N1 ve N2 gibi fenotiplerle sınıflandırılmıştır. N2 veya tümör ilişkili nötrofil (TAN) olarak adlandırılan fenotipe geçişte TGF-B rolü büyüktür. TGF-B nin ayrıca nötrofillerin tümöre infiltrasyonlarına ve tümör sitotoksitesine engel olduğu düşünülmektedir. N2 tipindeki nötrofillerin meme kanseri kaynaklı GM-CSF uyarımı ile IL-6 benzeri bir sitokin olan oncostatin M ürettikleri, bu sitokin de meme kanseri hücrelerinden VEGF salınımını artırarak anjiogenez ve invazivliği artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca nötrofiller MMP üreterek hücre dışı matriks bileşenlerini parçalar ve tümör invazyonunu kolaylaştırır.

Dentritik hücreler immün cevap düzenleyicisi ve antijen sunucu hücreler olarak görev yapar. Antijeni lenfoid dokulara taşıyarak hücreler immün yanıtı önemli katkıda bulunurlar. Meme kanseri hastalarında yapılan kesitsel çalışmalarda bu hücrelerin antijen sunum ve aktivasyon fonksiyonunu yitirdiği ayrıca tümör mikroçevresinde immün baskılayıcı sitokin salınımının arttığı bildirilmiştir.

Özetle kanserden salınan çeşitli faktörler ve inflamasyon, miyeloid kökenli hücre gruplarının tümör mikroçevresine toplanmasına ve burada doku yenilenmesi ve immün toleransı destekleyen fenotiplere dönüşmesine yol açmaktadır. Tümör mikro

çevresindeki miyeloid hücreler başlıca tümör anjiogenezine ve metastazına katkıda bulunur. Ayrıca tümörden salınan VEGF ve çeşitli büyüme hormonları kemik iliğinde üretilen miyeloid hücre miktarlarını arttırarak onların matürasyonlarını engellemektedir. Bu hücrelerin başında ise nötrofil,monosit ve dentritik hücrelerin öncülleri olan ve tam olgunluğa ulaşamamış miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC ler) gelmektedir.

2.3.3. Miyeloid Kökenli Hücreler

Kanser büyümesinde destek olan immün sistem hücrelerine miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (myeloid derived suppresor cells,MDSC) denir. Kemik iliği ve dalakta lenfoid cevapları baskıladıklarından dolayı doğal baskılayıcı (NS) denebilir.(20,21)

Bu hücrelerin gelişiminde, tümörden salınan granülosit-makrofaj koloni stimule edici hormonun (GM-CSF) önemli rolü olduğu bilinmektedir.(22,23)

Olgun olmayan miyeloid hücreler MHC -1 ile sunulan antijenlere güçlü bir baskılama yapar.(24)

Bu hücreler periferik kan,lenf nodu ve dalakta bulunurlar.(25,26)

Tümör mikroçevresinin oluşumunda ayrıca; nötrofiller, mast hücreleri ve eozinofillerde görev alırlar.(16)

2.3.4. Meme Kanserinde T Hücre Yanıtları

Proinflamatuvar çevre ve matür antijen sunucu hücreler arasındaki etkileşimler tümöre özel immun yanıtın oluşmasını sağlarlar.(27)

CD4+ T hücreleri; inflamasyonda en önemli hücrelerdir. T hücrelerinin çok farklı alt tipleri vardır ve hepsinin kendine özgül görevleri vardır.

Th 1 enfeksiyöz mikroorganizmaların ortadan kaldırılmasını sağlar. Kanseri gelişiminde anti-tümör immünite IFN aracılığı ile Th 1 yanıtlarını düzenler.(28)

Th 2 meme kanseri tarafından infiltre edilebilir. Meme kanseri IL -13 uyarımı ile STAT 6 ekspresyonu eder ve kanser hücrelerinde anti-apoptotik yolları aktive eder.

2.4. Deneysel Meme Kanseri Oluşturulması

Kimyasal karsinojenlerle ve 4T1 meme kanseri hücresi enjekte edilerek oluşturulmak üzere 2 farklı yol ile deneysel meme kanseri oluşturulabilmektedir.

N-Nitroz-N Metilüre(NMU) Sprague – Dawley cinsi dişi sıçanlarda meme adenokarsinomu oluşturmak için kullanılır.(29)

Transplante edilebilen 4T1 meme kanseri hücresi Fred Miller tarafından 1992 yılında tarif edilmiştir.(20)

Bu hücreler BALB/c ve doku kültüründe yaşayabilirler.

4T 1 meme kaseri hücrelerini tercih etme nedenlerimiz;

- 1) Kolay ekilebilir olması
- 2) İnsan meme kanserine benzer metastaz yapar
- 3) Metastaz bölgeleri benzerlik gösterir
- 4) Primer tümör rezeksiyonu sonrası metastatik bölgede çalışmalara devam edilebilir.

2.5. Dalak

Enkapsüle bir damar kitlesi ve lenfoid dokudan oluşan dalak vücuttaki en büyük retiküloendotelyal organdır. Dalak boyutu ve ağırlığı yaşa göre değişir. Ortalama erişkin dalağı ise 7-11 cm uzunluğunda, 150gr ağırlığındadır.

Splenik parankim iki ana elementten oluşur;kırmızı ve beyaz pulpa. Kırmızı ve beyaz pulpa arasındaki ara yüz dar marjinal zondur.

Kırmızı pulpa; dinamik bir filtrasyon sistemi gibi görev yapmaktadır. Makrofajlar, mikroorganizmalar, hücresel debris, antijen-antikor kompleksleri ve sertleşmiş eritrositleri dolaşımdan yok etmeyi sağlar.

Beyaz pulpa; T lenfositler ve aralıklı B lenfosit yığınları veya lenfoid foliküllerden oluşmaktadır. Antijenik olarak uyarıldığında, foliküller lenfosit proliferasyonuna merkez oluştururlar, uyarı veya neden olan enfeksiyon geçince germinal merkeze dönüşürler.

Marjinal zon ise kırmızı ve beyaz pulpanın birleşme yeridir. Kendine has iki makrofajı vardır; marjinal zon makrofajları ve metallofilik makrofajları.(30)

2.5.1. Dalağın Fonksiyonları ve İmmünolojisi

Yaşlanmış yada haraplanmış kırmızı kan hücreleri, anormal beyaz kan hücreleri ve plateletler kandan dalak tarafından temizlenir. İmmun mekanizmada dalağın, hem humoral hem de hücrel mekanizmada görevi vardır.

Antijenler lenfoid foliküller içindeki immün kompletan merkezlere sunulur. Bu immunglobullerin (özellikle IgM) hazırlanmasına yol açar, IgM yanıtı dalağın beyaz pulpasından opsonik antikorlar salınmasını sağlar. Daha sonra splenik ve hepatik retiküloendotelial sistem tarafından antijen temizliği olanaklı hale gelir.

Dalak aynı zamanda kompleman sisteminin alternatif yolunun başlamasında önemli olan properdin proteinin de kaynağıdır.

İnsan kanındaki hücrel elementlerin yaşam döngüleri çok çeşitlidir; nötrofillerin yarı ömrü 6 saat olmasına rağmen; plateletler 10 gün, eritrositler 120 gün yaşar.

Platelet havuzunun üçde biri dalakta sekestre edilir ve sekestreyonun %80 den fazla olması ise splenomegaliye neden olur.

Splenomegali; basit olarak dalağın anormal büyümesini tarif eder. Ayrıca dalağın ağırlığının 500 gr dan fazla olması, çapının 15 cm den fazla olması da diğer bir tanımlamadır.

Literatür splenomegaliyi; hafif, masif ve hiper diye gruplandırmıştır.

Masif splenomegali dalak ağırlığının 1000 gr'dan fazla olması, çapının ise 22 cm'den fazla olması olarak tarif edilmiştir.(30)

2.5.2 Splenektomi Endikasyonları

Splenektomi konaktaki çok sayıda durumda terapötiktir, bunlar kendi içinde geniş kategorilere ayrılabilirler.

- 1) Kırmızı kan hücresi hastalıkları(herediter sferositoz,orak hücreli anemi)
- 2) Trombosit bozuklukları(idiopatik trombositopenik purpura)
- 3) Beyaz kan hücre bozuklukları(miyelodisplastik hastalıklar)
- 4) Kemik iliği hastalıkları(lösemi, lenfma)
- 5) Splenik tümörler
- 6) Depo hastalıkları(gaucher, niemann-pick)
- 7) Splenik enfeksiyonlar,apseler,kistler

Toplamda splenektomi için en sık endikasyon eksternal travma veya iatrojenik yaralanmaya bağlı travmadır. En sık elektif endikasyon ise idiopatik trombositopenik purpura (ITP) dır.

2.5.3 Splenektomi Teknikleri

Elektif splenektomi uygulanacak hastalar ameliyattan en az 1 hafta öncesinde polivalan pnömokok, meningokok ve hemofilus aşıları ile aşılanmalıdır.

- 1) Açık splenektomi
- 2) Laparoskopik splenektomi
- 3) Parsiyel splenektomi(açık veya laparoskopik)

Geçen birkaç on yıl içinde parsiyel splenektomi uygulaması daha fazla gündeme gelmektedir. İlk olarak 18.yy da bildirilen bu teknik özellikle çocuklardaki postsplenektomi sepsis riskini en aza indirmek için endikedir. Splenomegaliye yol açan belli lipid depo hastalıkları ve bazı travmatik dalak yaralanmalarında ve çocuklardaki sferositoz parsiyel splenektomi ile tedavi edilebilirler.

Parsiyel splenektomide hem açık hem de laparoskopik yaklaşımlar çok iyi tarif edilmiş durumdadırlar.

2.5.4 Splenektomi Komplikasyonları

- 1) Pulmoner (sol altlob atelektazisi,pevral efüzyon,pnömoni)
- 2) Hemorajik (intraoperatif kanama,hematom)
- 3) İnfeksiyöz (subfrenik apse,yara yeri enfeksiyonu)
- 4) Pankreatik (pankreatit, psödokist, pankreatik fistül)
- 5) Tromboembolik (derin ven trombozu)
- 6) Ciddi postsplenektomik enfeksiyon (CPSE)

Splenektomili hastaların büyük çoğunluğunda dalak yokluğu hiçbir kötü sonuca yol açmamasına rağmen, CPSE' nin potansiyel katastrofik sonuçları açısından hayat boyu uyanık olup uygun önlemler ve önleyici tedbirler alınmalıdır.

CPSE %1-5 oranında görülür ve CPSE riskinin tek ve en önemli belirleyicisi splenektominin gerekçesidir. Ayrıca yaş ve dalağın çıkarılmasından itibaren geçen sürede önemlidir.

En sık ajanlar S.pnömoni, N.menenjitis, H.influenza...

Koruyucu aşılar ameliyattan 7-14 gün önce veya ameliyattan sonra 24 saat içinde yapılmalıdır.

Pnömonokok aşısı 5-6 yılda bir,influenza aşısı her yıl tekrarlanmalıdır. Asplenik çocuklar için iki yıl boyunca günlük tek doz penisilin veya amoksisilin önerilir.

2.6 Splenektomi İmmünolojisi

Dalağın organizmayı enfeksiyonlara karşı korumada ciddi bir nemi vardır. Bunu hem humoral hem de hücrel immünitede olan görevleri ile gerçekleştirir. Kompleman sistemini aktive etmesi, spesifik antikor üretimi, lenfositlerin olgunlaştırılması, fagositoz gibi immünolojik rolleri vardır.(31,32)

Splenektomili hastalarda Ig düzeylerinin değişmesi (IgG, IgA düzeyinde artış, IgM düzeyinde azalma),komplemanın alternatif yolunda azalma, opsonizasyonun kaybolması septik komplikasyonların ortaya çıkmasında öne çıkan nedenlerdir.(33,34)

3. MATERYAL METOD

3.1. Deney Hayvanları ve Protokolü

Çalışma için Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 28.08.2014 tarih, 2014/48 kayıt ve 2014/48 – 05 karar numaralı izni alındı.

Deneyler Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Onkoloji İmmünoloji Ünitesi Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Helsinki deklarasyonu hayvan deneyleri ile ilgili etik yasa uyarınca; deney hayvanları laboratuvarında yetiştirilen, ağırlıkları 18-22 gr arasında değişen, standart laboratuvar yemi ile beslenen ve normal musluk suyu verilen, 38 adet altı haftalık Balb-c cinsi dişi fare kullanılmıştır. Deney hayvanları oda sıcaklığında tutulmuş ve kafeslerde takip edilmiştir.

Çalışmaya toplam 28 adet, altı haftalık Balb-c cinsi dişi fare dahil edildi. Hayvanlar; kontrol meme kanseri grubu, meme kanseri + splenektomi, meme kanseri + parsiyel splenektomi, G-CSF enjeksiyonu+splenektomi, G-CSF enjeksiyonu+parsiyel splenektomi ve 6 hafta G-CSF enjeksiyonu alan kontrol grubu olmak üzere 6 gruba ayrıldı. Çalışmamızda 4T1 meme kanseri hücresi ve G-CSF enjeksiyonu sonrası total veya parsiyel splenektomi uygulanmayan iki kontrol grubu bulunmaktadır.

3.2. Çalışma Grupları

Çalışmaya toplam 6 grup dahil edildi.

1) **Kontrol meme kanseri grubu (G1):** (5 adet Balb-c fare) Splenektomi yapılmayan kontrol meme kanseri grubunda cerrahi işlemin etkisini yaratmak üzere orta hat kesisi ile cilt, cilt altı ve periton açılarak iç organlara dokunulmaksızın

hayvanlar yeniden kapatıldı. Ameliyat sonrası komplikasyon gözlenmeyen farelere 1 hafta sonra meme yağ dokusuna sc. PBS(fosfat tamponlanmış çözelti) verildi.

2) **Meme kanseri+splenektomi grubu (G2) :**(5 adet Balb-c fare) Tümörlerin en büyük çapının yaklaşık 0,5 cm ulaşması ile cilt, cilt altı ve periton kesilerek laparotomi yapıldı. Sonrasında dalak explore edildi. Mide ve barsaklardan disseke edildikten sonra splenik damarlar 5-0 poly glycolide (%90) co-lactide (%10) (Pegelak, Doğsan) ile bağlanıp, dalak çıkarıldı. Katlar 5-0 poly glycolide (%90) co-lactide (%10) (Pegelak, Doğsan) ile anatomik kapatılarak işleme son verildi.

3) **Meme kanseri+parsiyel Splenektomi grubu (G3) :** (5 adet Balb/C fareye) Tümörlerin en büyük apının yaklaşık 0.5 cm e ulaşması ile cilt, cilt altı dokular periton kesilerek laparotomi uygulandı. Dalak explore edildi. Splenik damar 5-0 poly glycolide (%90) co-lactide (%10) (Pegelak, Doğsan) ile bağlandıktan sonra dalağın %90 lık kısmı eksize edilecek şekilde gastrik breves damarlar korunarak dalak kranialinde %10 lık kısmı kalcak şekilde rezeksiyon yapıldı.

4) **G-CSF enjeksiyonu + splenektomi grubu (G4):** (5 adet Balb-c fare) 3 hafta boyunca G-CSF enjeksiyonu alan farelere 3.haftanın sonunda cilt, cilt altı ve periton kesilerek laparotomi yapıldı. Sonrasında dalak explore edildi. Mide ve barsaklardan disseke edildikten sonra splenik damarlar 5-0 poly glycolide (%90) co-lactide (%10) (Pegelak, Doğsan) ile bağlanıp, dalak çıkarıldı. Katlar 5-0 poly glycolide (%90) co-lactide (%10) (Pegelak, Doğsan) ile anatomik kapatılarak işleme son verildi.

5) **G-CSF enjeksiyonu + parsiyel splenektomi grubu (G5):** (5 adet Balb-c fare) 3 hafta boyunca G-CSF enjeksiyonu alan farelere 3.haftanın sonunda cilt, cilt alt ve periton kesilerek laparotomi yapıldı. Splenik damar 5-0 poly glycolide (%90) co-lactide (%10) (Pegelak, Doğsan) ile bağlandıktan sonra dalağın %90 lık kısmı eksize edilecek

şekilde gastrik breves damarlar korunarak dalak kranialinde %10 lık kısmı kalcak şekilde rezeksiyon yapıldı.

6) **G-CSF Kontrol grubu (G6):** (3 adet Balb-c fare) 6 hafta boyunca G-CSF enjekte edildi.

Haftada 2 kez inokülasyon bölgesi palpe edilerek tümör gelişimi ve tümör çapı ölçüldü. Tüm gruplarda vücut ağırlığı kaydedildi. Hayvanların genel sağlık durumları, su ve besin alımları göz önünde bulunduruldu.

Tümör çapının en çok 2 cm'ye ve en az 0,5 cm'ye ulaşması ile deneyler sonlandırıldı. Her hayvandan serum toplandı ve çıkarılan organlar immünolojik analizler için PBS içerisine alındı.

3.3. Anestezi

Tüm gruplar için genel anestezi, 5 mg/kg xylasine (Alfazyne- %2) ve 150 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar- %5) karışımı intraperitoneal verilerek sağlanmıştır.

3.4. Cerrahi Teknik

3.4.1 Total Splenketomi

Balb/C türü deney hayvanlarına anestezi olarak 150 mg/kg dan kg ketamin hidroklorür (Ketalar- %5) ve 5 mg/kg dan xylasine (Alfazyne- %2) dilüe edilerek sağ karın bölgesi sc.enjekte edildi. Daha sonra supin pozisyonda sabitlenen hayvanların

ameliyat yerleri batikon ile temizlendikten sonra, 11 numara bistürü ile orta kat kesi ile cilt cilt altı ve periton kesilerek laparotomi yapıldı. Penset ile dalak hafifçe tutulup mide, pankreas ve barsaklardan künt olarak disseke edildikten sonra splenik damar 5-0 poly glycolide (%90) co-lactide (%10) (Pegelak, Doğsan) ile bağlanıp splenektomi gerçekleştirildi. Kanama kontrolü takiben periton ve cilt 5-0 vikril ile continue kapatılarak ameliyat sonlandırıldı.

3.4.2 Parsiyel Splenektomi

Balb/C türü deney hayvanlarına anestezik olarak 150 mg/kg dan kg ketamin hidroklorür (Ketalar- %5) ve 5 mg/kg dan xylasine (Alfazyne- %2) dilüe edilerek sağ karın bölgesine enjekte edildi. Daha sonra supin pozisyonda sabitlenen hayvanların ameliyat yerleri batikon ile temizlendikten sonra, 11 numara bistürü ile orta kat kesi ile cilt cilt altı ve periton kesilerek laparotomi yapıldı. Penset ile dalak hafifçe tutulup pankreas ve barsaklardan künt olarak disseke edildikten sonra splenik damar 5-0 poly glycolide (%90) co-lactide (%10) (Pegelak, Doğsan) ile bağlanıp, gastrik breves damarlar korunarak dalağın %10 kranial kısmı kalacak şekilde parsiyel splenektomi gerçekleştirildi. Kanama kontrolü takiben periton ve cilt 5-0 poly glycolide (%90) co-lactide (%10) (Pegelak, Doğsan) ile continue kapatılarak ameliyat sonlandırıldı.

Deney sonlandırılan hayvanlarda, eter ile sedasyon sonrası, dekapitasyon sonrası kan örneği alındı. Sonrasında cilt cilt altı kesilen hayvanlarda peritoneal tümör implantları çıkarıldı. Ardından karın ve göğüs bölgeleri açılan hayvanlarda tüm organlar, tümör odakları eksplere edildi.

3.5. Değerlendirme Parametreleri

1- Hayvan ağırlıkları: Tüm gruplarda hayvanlar haftada 2 kez olmak üzere toplam 7 kez tartılarak 3 hafta boyunca takip edildi.

2- Dalak boyut ve ağırlığı: Tüm gruplarda deneyler sonlandırıldıktan sonra organlar ağırlık ve boyutları ölçülerek değerlendirildi.

3- Tümör ağırlık ve çapları: Tümör oluşturulmuş gruplarda (grup 1, 2, 3) haftada 2 kez tümör çapları ölçüldü. Deneyler sonlandırıldıktan sonra tüm tümör implantları tek tek ağırlık ve boyut olarak ölçülüp değerlendirildi.

4- Miyeloid kökenli hücre sayıları ve dağılımları: Tüm gruplarda deney sonlandırıldıktan sonra alınan kan örnekleri akım sitometri cihazı ile miyeloid hücre sayı ve dağılımları açısından analiz edildi.

5- Periferik kanda lökositoz: Tüm gruplarda deneyler sonlandırıldıktan sonra alınan kan örneğinde akım sitometri cihazı ile lökosit sayısı(monositik ve granülositik) analiz edildi.

Akım sitometri: Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra elde edilen tümör ve dalak dokuları PBS tamponu bulunan steril bir petri kabına alınarak mekanik işlemlerle süspansiyon haline getirildi ve 70 µm açıklığı bulunan filtrelerden süzüldü. Süzüntü, Ficoll yoğunluk gradienti ile fraksiyonlarına ayrıldı ve mononükleer immün hücrece zengin olan faz toplanarak ilgili antikörlerle işaretlendi. Miyeloid kökenli hücrelerin dağılımı anti-Gr 1, anti- 4/7, anti CD 11b antikörleri ile belirlendi. Analizler FACS Aria-II akım sitometri cihazıyla (Becton-Dickinson, ABD) ile yapıldı. Pozitif hücre yüzdesi uygun izotip kontrol antikoru ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

Meme tümörü içeren gruplarda tümör dokusunun makroskopik özellikleri ve karın duvarı periton invazyonu gözle değerlendirildi. Makroskopik olarak intraabdominal ve intratorasik yaygın tümör varlığı, gözle görülen büyüklükte meme tümörü metastazı varlığı değerlendirildi.

3.6. İstatistiksel Analizler

Deneyisel gruplardan elde edilen veriler için Excell Office programı 2013 versiyonu kullanıldı. Elde edilen veriler SPSS programı kullanılarak Mann Whitney U testi ile analize edildi ve değerlendirildi. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Resim.1: G-CSF enjeksiyonu yapılmış tümörsüz farenin laparotomi öncesi



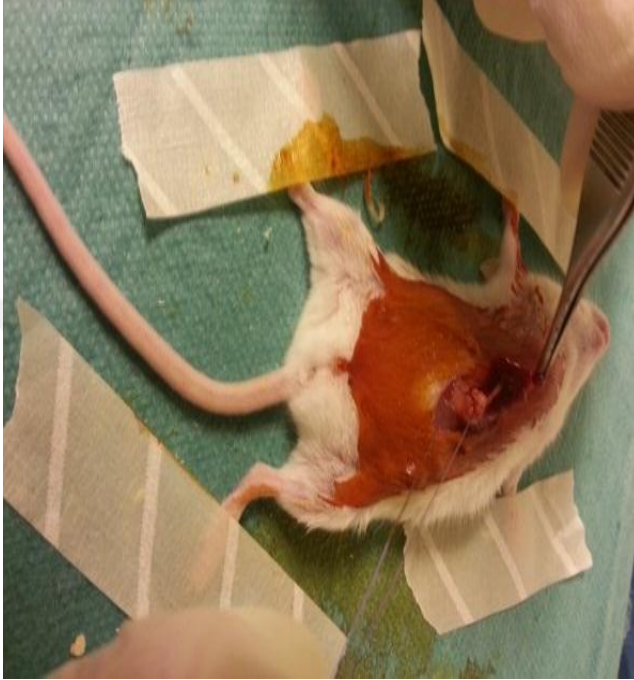
Resim. 2: 4T1 meme kanseri hücresi enjekte edilmiş farede laparotomi öncesi. Sol alt kadrındaki tümöral kitle net bir şekilde seçilebilmektedir.



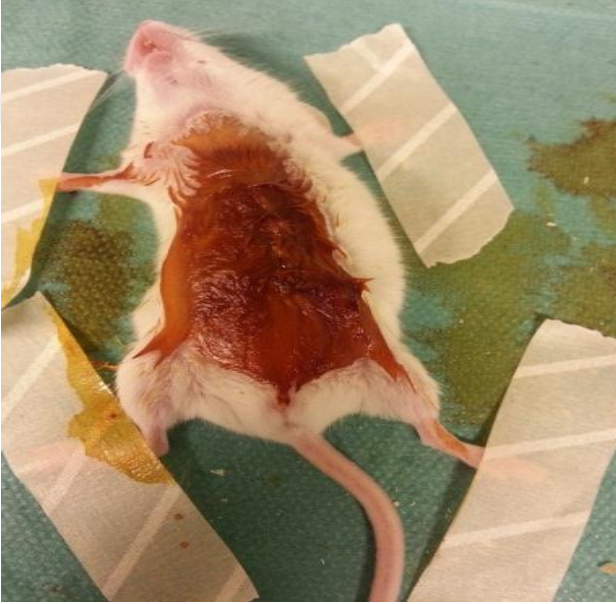
Resim.1: Orta hat lapartomi insizyonu ile karın içine girilmesi.



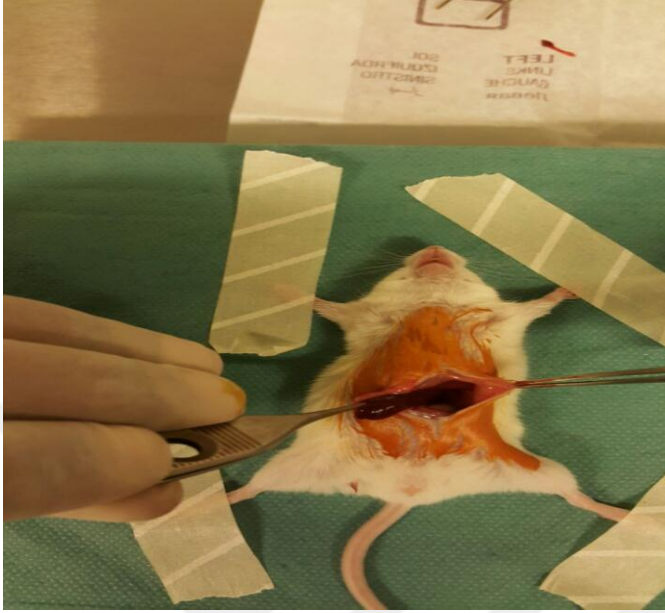
Resim. 2: G-CSF enjeksiyonu sonrası laparotomide splenomegali görüntüsü.



Resim. 3: G-CSF sonrası splenomegali görülen dalakta total splenektomi.



Resim. 4: Laparotomi ve splenektomi sonrası katların anatomik olarak kapatılması sonrası.



Resim. 5: 4T1 meme kanseri hücresi enjeksiyonu sonrası görülen splenomegali.

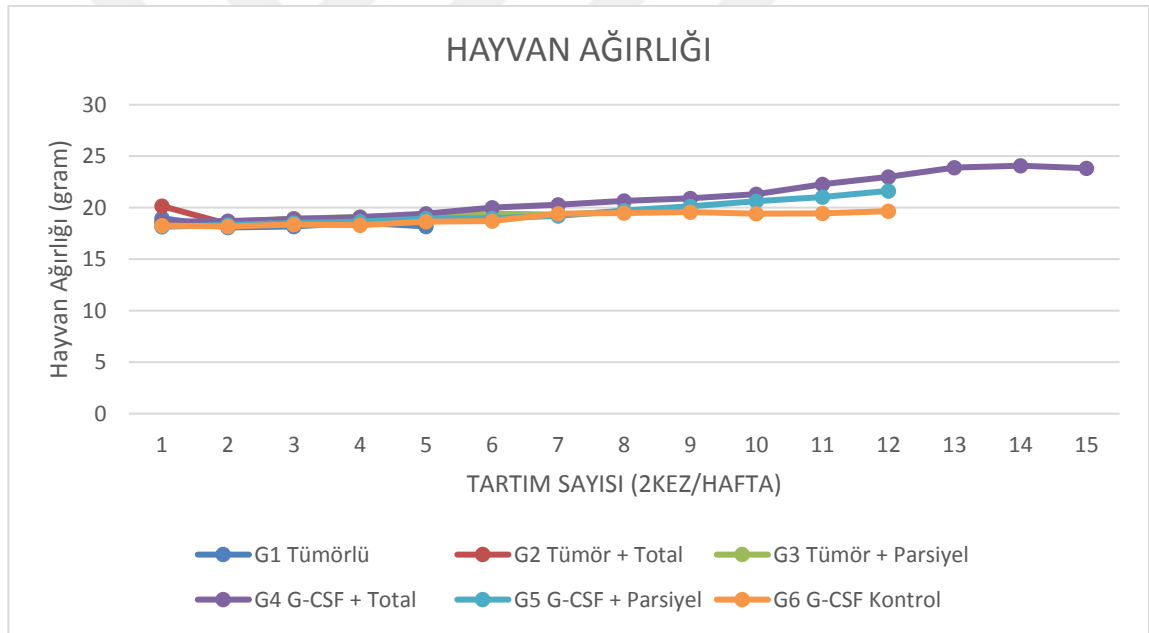


Resim. 6: Parsiyel splenektomi sonrası kalan dalak dokusunun görüntüsü.

4. BULGULAR

Hayvanlarda değerlendirme parametreleri olarak tümör çapları, organ boyut ve ağırlıkları, lökositöz, MKH düzeyleri ve dağılımları, genel sağlık durumlarının analizleri yapıldı.

4.1. Hayvan Ağırlıkları

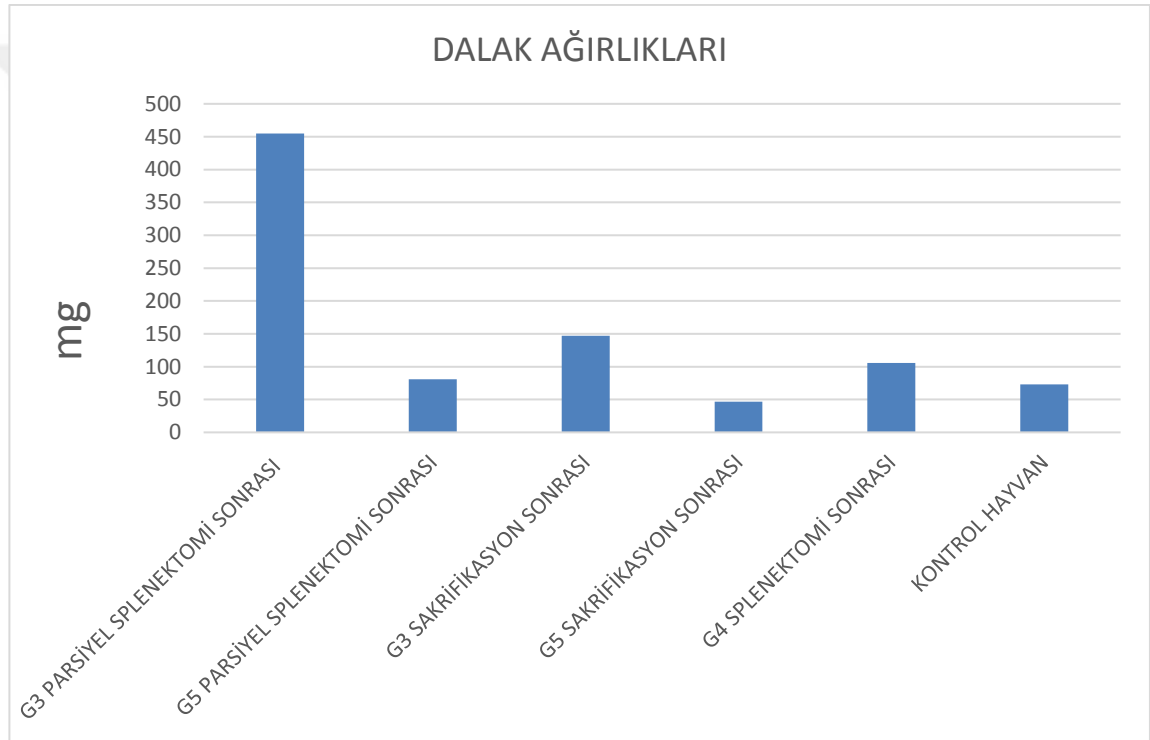


Şekil.4.1. 1: Hayvan ağırlıkları

G-CSF' nin insanlarda ACTH bağımsız olarak kilo aldrığı bilinmektedir. Bizim çalışmamızda özellikle G-CSF + total splenektomi uygulanan hayvanlarda olmak üzere G-CSF + parsiyel splenektomide de kilo artışı korele olarak gözlenmiştir.

4.2. Dalak Boyut ve Ağırlıkları

Özellikle meme kanserinde olmak üzere yüksek düzeyde G-CSF eksprese eden tümörlerde splenomegali ortaya çıkmaktadır.

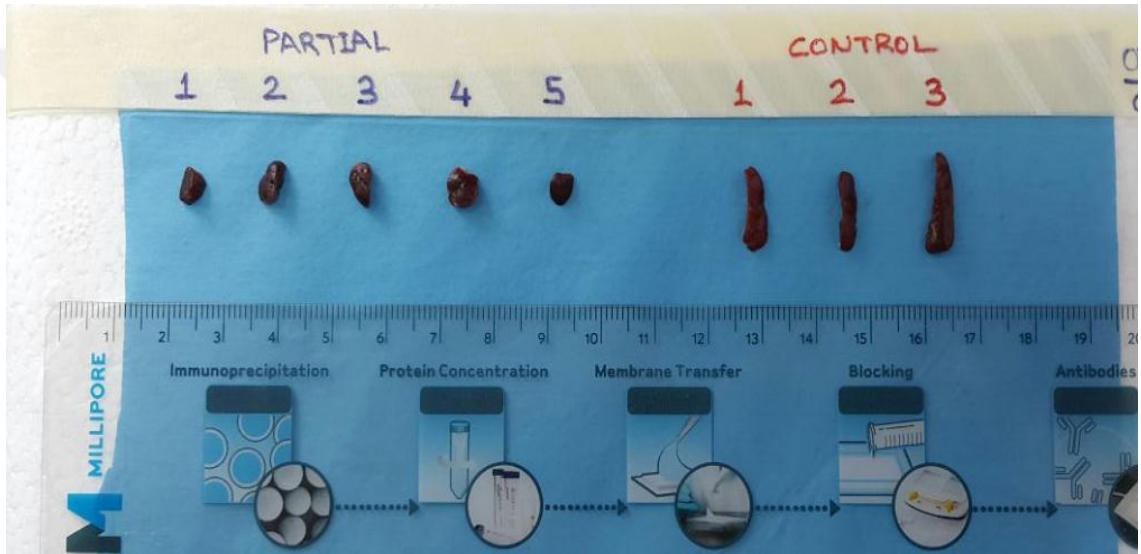


Şekil.4.2. 1: Dalak ağırlıkları

En yüksek dalak ağırlığı 4T1 meme kanseri hücresi enjeksiyonu sonrası parsiyel splenektomi uygulanan grupta (G3) görülmüştür.

Sakrifikasyon sonrası dalak ağırlığı yine meme kanseri hücresi enjekte edilen grupta yüksek bulunmuştur.

G-CSF enjeksiyonu sonrası da dalak ağırlığında artma gözlenmiştir.



Resim. 9: G-CSF sonrası kontrol grubu ve parsiyel splenektomi uygulanan farelerin sakrifikasyon sonrası dalak görüntüleri.

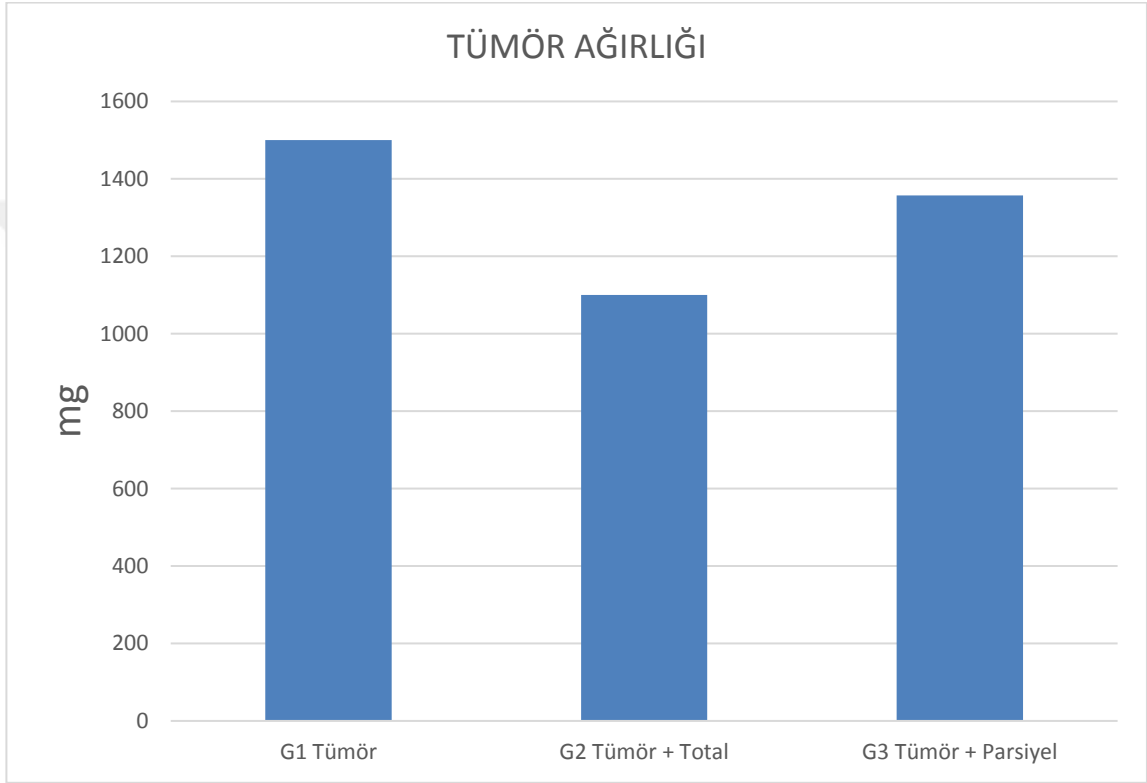


Resim. 10: 4T1 meme kanseri hücresi enjeksiyonu sonrası parsiyel splenektomi uygulanan farelerin sakrifikasyon sonrası çıkarılan dalak ve tümörleri



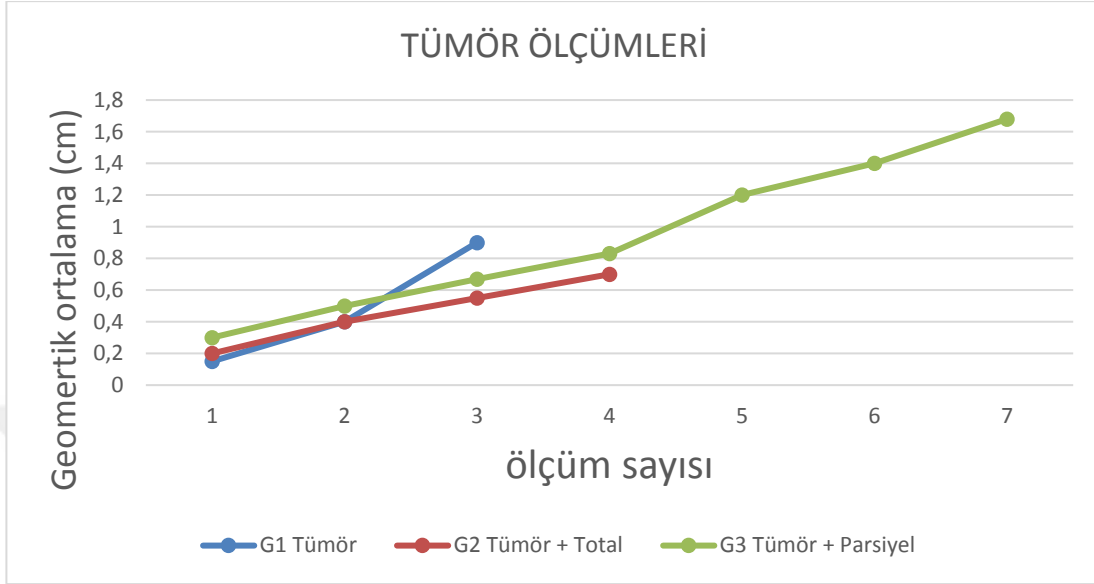
Resim. 11: Total splenektomi sonrası çıkan dalak spesmenlerinin görüntüsü

4.3. Tümör Ağırlık ve Çapları

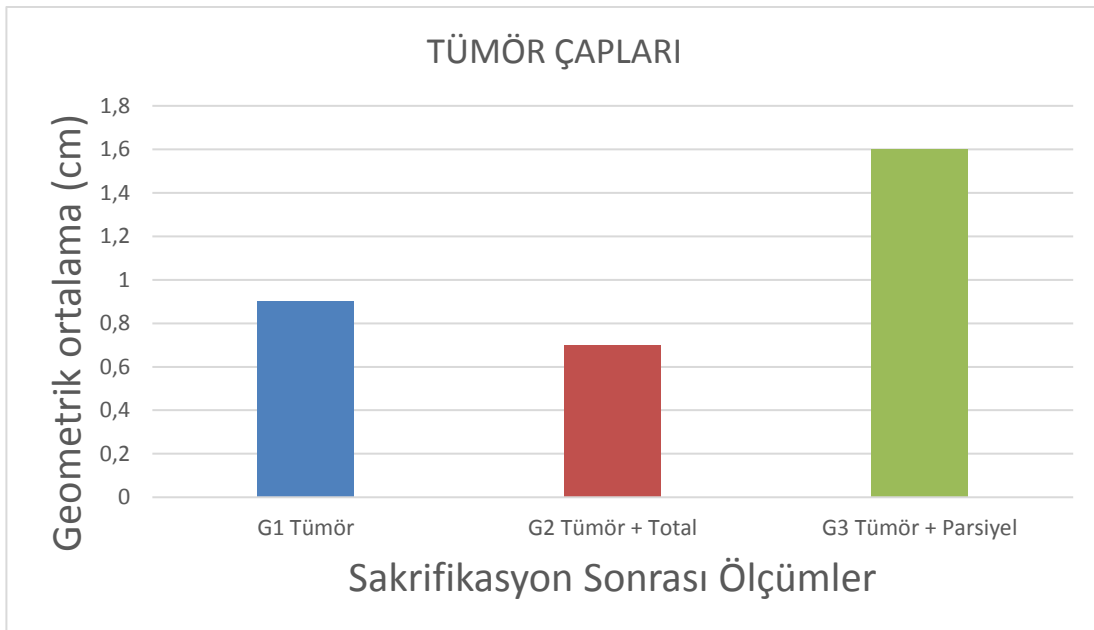


Şekil.4.3.1: Tümör ağırlık değişimleri

Tümör ağırlıklarına bakıldığı zaman meme kanser + total splenektomi yapılan grubun kontrol meme kanseri grubundan daha az bulunması splenektomi yapılanca tümör hacminin küçüldüğünü, parsiyelde tümör ağırlığının daha az değiştiğini göstermektedir.



Şekil.4.3.2: Tümör boyut değişimleri



Şekil.4.3.3: Sakrifikasyon sonrası tümör boyut değişimleri

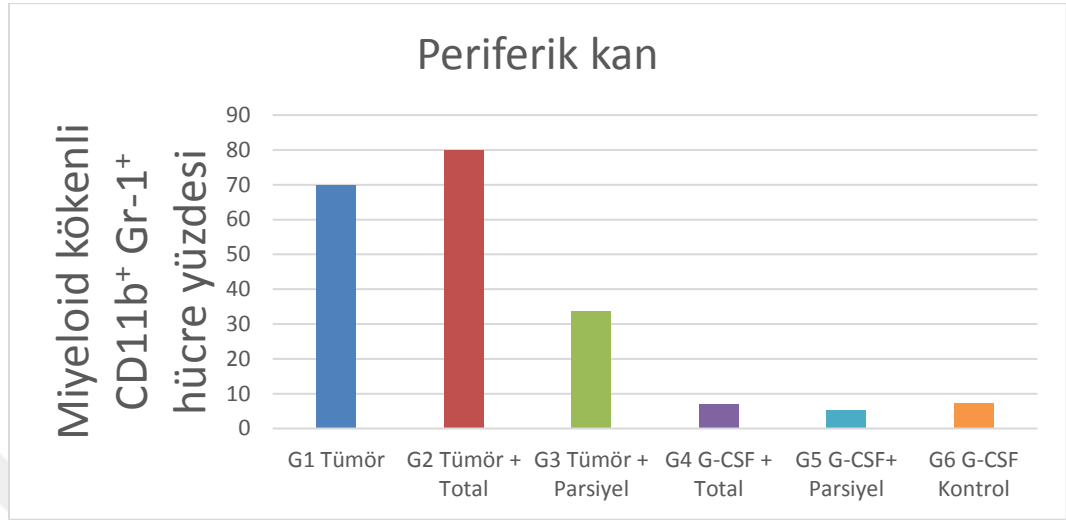
Tümör boyutu parsiyel splenektomi uygulanan grupta en yüksek bulunmuştur. En düşük ise total splenektomi uygulanan grupta tespit edilmiştir.

4.4. Myeloid Kökenli Hücre Sayı ve Dağılımları

4.4.1. Periferik kanda myeloid kökenli hücreler

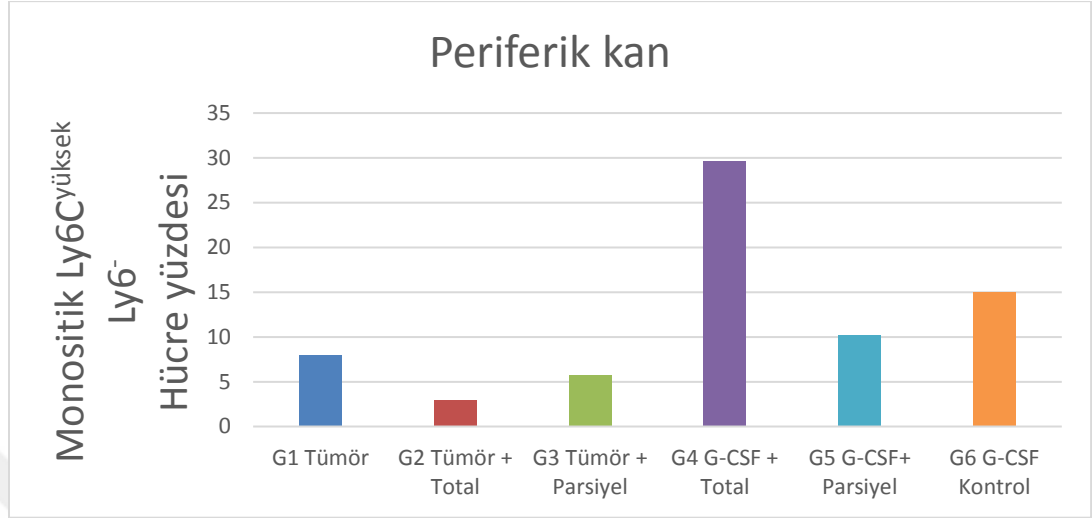
Splenektomi lökositoya neden olur çünkü ekstramedüller hematopoez yapılan bir organ çıkartıldığında kemik iliğinden çıkan bütün hücreler dolaşımda birikmektedir. Bu durum özellikle kanser gruplarında görülmektedir. Bunun nedeni ise kanser kemik iliğindeki hematopoezi hızlandırarak birçok faktör salgılanmasına ve dolaşıma geçmesine neden olmaktadır.

Bu immatür hücreler özellikle granülosit ve monosit olmak üzere olmak üzere iki tipe ayrılmışlardır.(35) Tümör modellerinde her iki grupta sayısal artış gözlnmiş olup, granülositik hücreler monositik olanlardan daha fazla birikim göstermektedirler. Tümörlerde başlıca birikim gösteren granülositlerin proliferasyon yetenekleri yoktur, buna rağmen az sayıda görülen monositlerin proliferasyon yetenekleri vardır.(36)



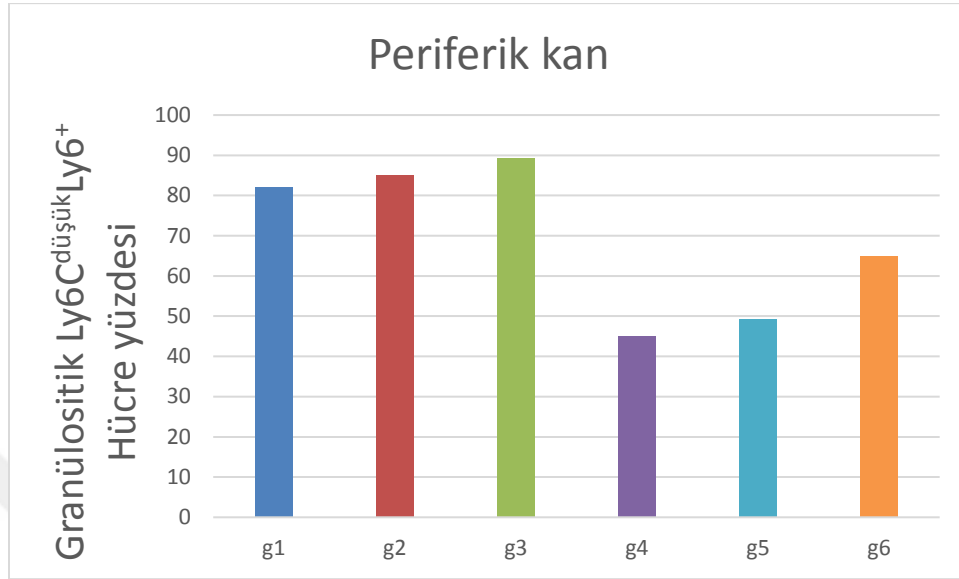
Şekil.4.4.1. 1: Periferik kanda myeloid kökenli hücre sayı ve dağılımları

Miyelid kökenli hücre sayısı tümör enjekte edilen gupta özellikle de total splenektomi uygulanan meme kanseri grubunda çok fazla artmıştır. Parsiyel splenektomi uygulanan meme kanseri grubunda ise kontrol meme kanseri grubuna göre daha düşük bulunmuştur.



Şekil.4.4.1. 2: Periferik kanda monositik hücre dağılımları

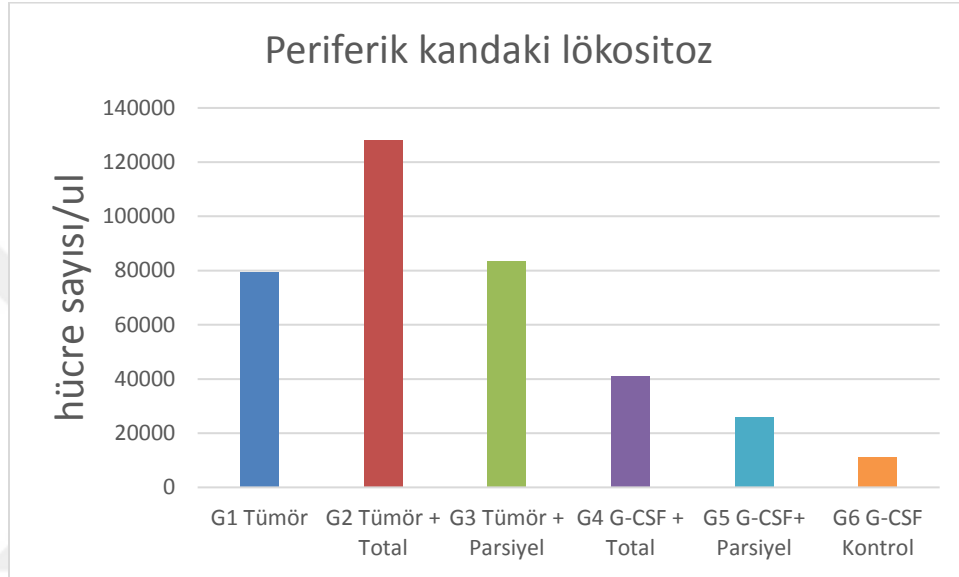
G-CSF enjekte edilen gruplarda monositik hücre hakimiyeti görülmektedir.



Şekil.4.4.1. 3: Periferik kanda granülositik hücre dağılımları

Granülositik hücre hakimiyeti meme kanseri oluşturulan guplarda yüksek olmakla birlikte G-CSF alan gruplarda da yükselmiştir.

4.5. Periferik Kanda Lökositoz

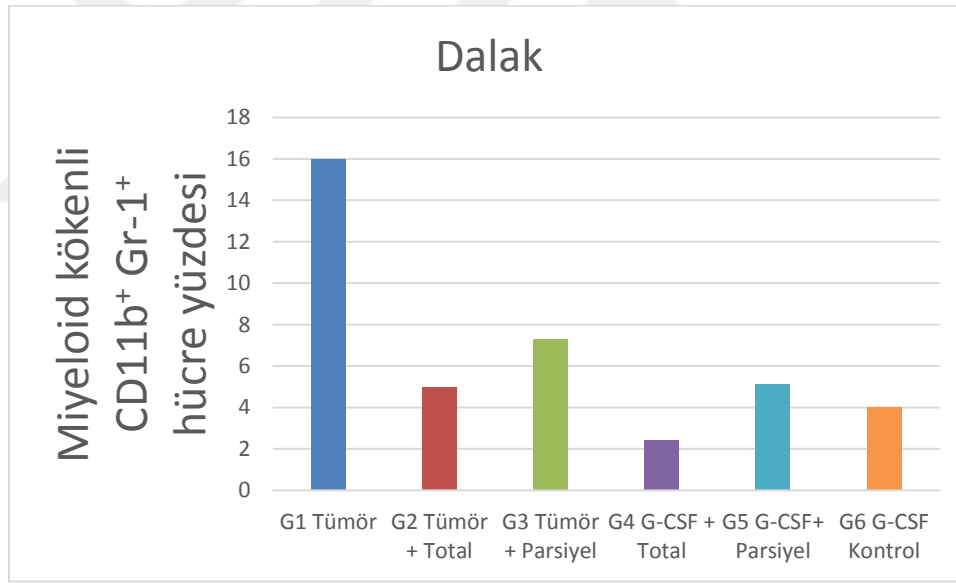


Şekil.4.5.1: Periferik kanda lökositoz

G-CSF enjekte edildikten sonra splenektomi yapılan grupta minimal lökositoz gözlenmiştir. Asıl tümör + splenektomi uygulanan farelerde lökositoz belirgin bir şekilde gözlenmektedir.

4.6. Dalakta Myeloid kökenli hücreler

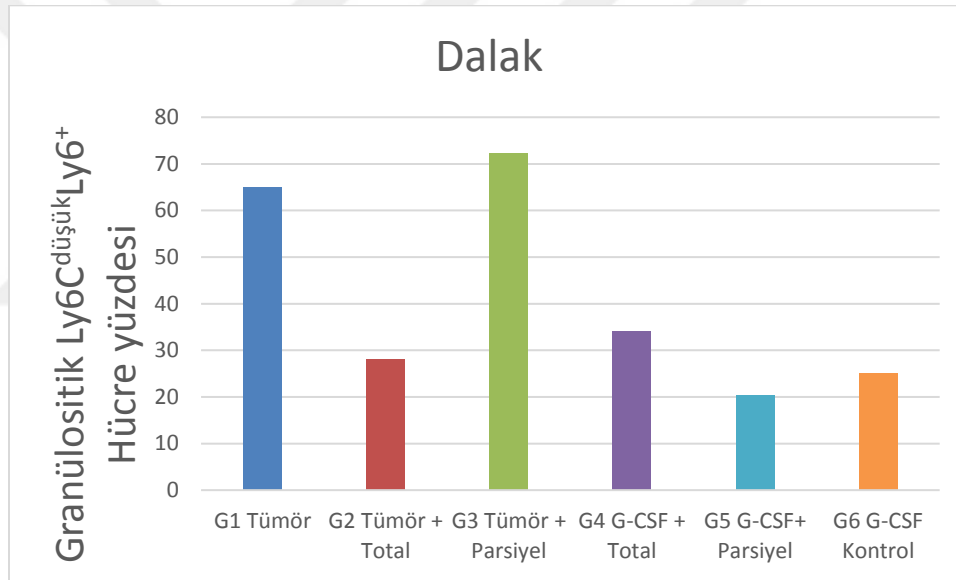
MDSC ler tümörler ile birlikte kemik iliğinden çıkar, periferik kana geçer ve ilk olarak hemopoetik organ olan karaciğer ve dalakta birikirler. Bizim çalışmamızda tümör enjeksiyonu ile beraber miyeloid hücreler anlamlı olarak dalakta birikmiştir ve splenomegaliye neden olmuştur.



Şekil.4.6. 1: Dalakta total miyeloid kökenli hücre yüzdeleri

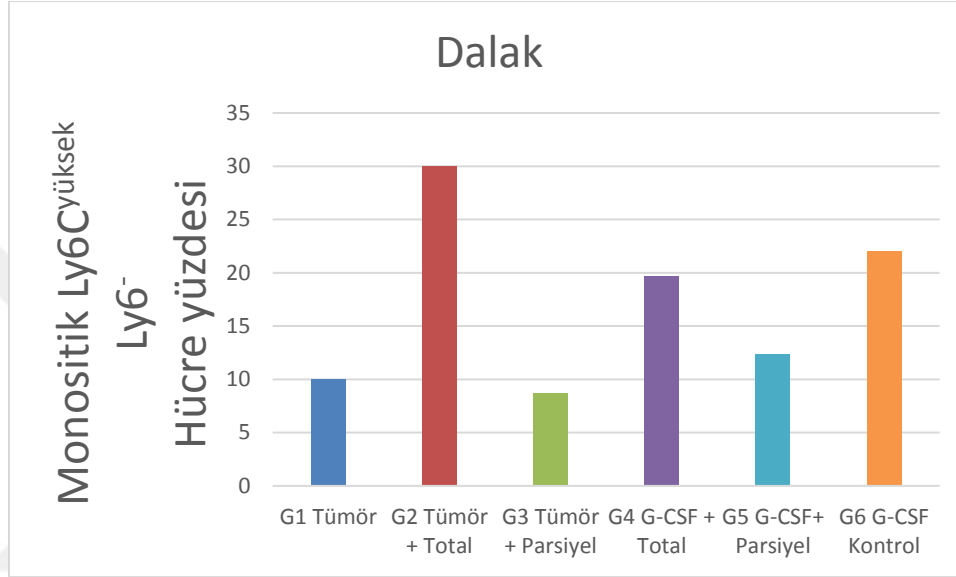
Tümörle beraber ilk olarak monositik kökenli hücreler artış gösterip, tümörün ilerleyen evrelerinde bu hücrelerin yerini granülosit kökenli hücelere bıraktığı gözlenmiştir.

G-CSF periferik kandaki gibi dalakta da monositik kökenli hücreleri artırmıştır. Splenektomi yapıldıktan sonra bu hücreler granülosit kökenli hücelere dönüşmüşlerdir.



Şekil.4.6. 2: Dalakta granülositik hücre sayıları

G-CSF ile beraber dalakta miyeloid hücre artışı yine gözlenmekte olup tümör kadar yüksek değildir. Bunun nedeni de G-CSF' nin tek başına miyeloid kökenli baskılayıcı hücreleri uyaramamasından kaynaklanmaktadır



Şekil.4.6.3: Dalakta monositik hücre sayıları

G-CSF periferik kandaki gibi dalakta da monositik kökenli hücreleri artırmıştır. Splenektomi yapıldıktan sonra bu hücreler granülosit kökenli hücrelere dönüşmüşlerdir. Dalakta da monositik hücre p değeri 0,035 ile anlamlı bulunmuştur.

TARTIŞMA

Kadınlarda en sık görülen kanser meme kanseridir. Meme kanserinin tanı ve tedavisindeki gelişmelere rağmen çoğu hastada tedaviye direnç görülmektedir. Meme kanseri tedavisinde yeni tedavi prensiplerinin geliştirilmesi bu hastalıkta kür elde etmek için önemlidir. Meme kanseri direk invazyon, lenfatik ve kan aracılığı ile metastaz yapmaktadır. Hematojen yol ile en sık akciğer, kemik ve karaciğere metastaz yapmaktadır.(37) İmmün sistemin kansere karşı konağı koruyucu etkisinin yanı sıra immünitesi düşük tümörlerin oluşumuna da katkı sağladığı günümüzde yapılan fare deneylerinde gösterilmiştir.(38)

Kanserlerin mikroçevresinde makrofajlar bulunmaktadır ve çalışmalar göstermiştir ki makrofaj birikimi kötü prognoza işaret etmektedir.(39)

MDSC' ler miyeloid hücrelerin tam olarak tanımlanmış bir alt grubu olmaktan ziyade matür hücrelere farklılaşmaları engellenmiş aktiv immatür hücrelerin oluşturduğu heterojen bir topluluktur. MDSC' lerin ortadan kaldırılması hastalıkta çok iyi bir iyileşme hatta anti-tümör etki bile yaratabilir. MDSC' ler ayrıca tümör hücresi invazyonu, angiogenez ve metastaza destek olabilirler.(29)

G-CSF'nin solid tümörlerde hem tümörojenik hemde anti tümörojenik rolleri olduğu bilinmektedir. G-CSF'nin tümörojenik olduğu kanserler; malign melanom, kolorektal kanserler ve meme kanseridir. Kemik metastazı olan meme kanserlerinde G-CSF'nin korele olarak yüksek seyrettiği gösterilmiştir.(40)

Çalışmamızda 4T 1 meme kaseri hücrelerini tercih etme nedenlerimiz;

- 1) Kolay ekilebilir olması
- 2) İnsan meme kanserine benzer metastaz yapması
- 3) Metastaz bölgeleri benzerlik göstermesi
- 4) Primer tümör rezeksiyonu sonrası metastatik bölgede çalışmalara devam edilebilir olmasıdır.

Meme kanseri modelinde total ve parsiyel splenektominin immünolojik etkileri ile ilgili olarak çalışmamızda hayvan ağırlıkları bakımından G-CSF enjekte edilen ve total splenektomi uygulanan farelerde anlamlı kilo artışı izlenmiştir. Dalak ağırlığı tümör enjeksiyonu sonrası çarpıcı bir şekilde artmıştır, bunun nedeni ise tümörün G-CSF dışında splenomegaliye neden olabilecek başka faktörlerin salgılanabiliyor olması veya tümörün büyümesi ile beraber kanda G-CSF sekresyonunun artması olabilir. O yüzden diğer faktörlerin de araştırılması ayrı bir konu başlığı olabilir.

Hem total, hem de parsiyel splenektomi uygulanan farelerde MDSC' ler artmıştır. Dalakta; total splenektomi sonrası monositik hücre daha fazla artmış, periferik kanda granülosit ve monositik hücreler eşit miktarda artmıştır. Bu durum monositik hücrelerin proliferasyon yetenekleri de göz önünde tutulduğunda dalağı çıkarılan farelerde primer tümörün daha yavaş büyüyeceğini açıklayabilir. Fakat yapılan çalışmalarda primer tümörün yavaş büyümesine rağmen metastaz sayısı artmıştır. Bu tezat şu an çözülememiştir. (41)

Çalışmamızda tümör enjeksiyonu + total splenektomi uygulanan grupta belirgin lökositoz izlenmiştir. Bunun nedeni ise hem tümörün kemik iliğini çalıştırması, hem de kemik iliğinden kana geçen immatür karakterde olan miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler olabilirler. Lökositozun nedenini açıklamak için kemik iliği araştırması ayrı bir çalışma olabilir.

Bizim çalışmamızda G-CSF ile birlikte dalak ağırlığında artış gözlemlendi, fakat en göze çarpıcı sonuç tümör enjeksiyonu sonrası hayvanların dalak ağırlığındaki artıştır. Bunun sebebi de tümörde G-CSF' nin dışında splenomegaliye neden olabilecek başka faktörlerin salgılanabiliyor olması veya tümörün büyümesi ile beraber kanda G-CSF ekspresyonunun artmasındandır. Bu nedenden dolayı splenomegali ve dalak ağırlığı artışına neden olabilecek diğer faktörlerin araştırılması konuyu daha net bir hale getirebilir.

Sadece G-CSF alan farelerin kanlarında tümördekilere göre daha yüksek monositik kökenli hücre bulunmuştur. Fakat tümör enjekte edilen farelerde granülositik kökenli hücreler daha yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni olarak da kanserden salgılanan hematopoez uyarıcı karışık faktörlerin temelde granülositik kökenli hücreleri uyardığı düşünülebilir.

Parsiyel splenektomi uygulanan meme kanseri grubu ile total splenektomi uygulanan meme kanseri grubunda kan ve dalak miyeloid hücre parametrelerinin korele seyrettiği gözlemlenmiştir. Total splenektomi sonrası tümör metastazının arttığı bilinmektedir. Miyeloid hücrelere bakılarak parsiyel splenektomi de metastazların total splenektomiye göre daha az olması bizim çalışmamızda beklenmektedir; fakat bunun net olarak söylenmesi için histopatolojik çalışma yapılması gerekmektedir.

Parsiyel splenektomi sonrası özellikle çocuklarda post splenektomi sepsis oranının anlamlı ölçüde azaldığı daha önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır. Bu yüzden çocuklardaki hematolojik hastalıklarda ve fokal tümörlerde parsiyel splenektomi önerilmektedir.(44)

Bu çalışmaya ek olarak kemik iliği araştırılması, histopatolojik çalışma ve klinik araştırmalar ile dalağın immünite ve kanser immünolojisindeki yeri daha da aydınlatılabilir.

6. SONUÇ

- 1) G-CSF kilo alımını belirgin bir şekilde desteklemektedir.
- 2) Splenektomi yapılan hayvanlarda da G-CSF ile sinerjik olması ile beraber kilo artışı gözlemlenmiştir.
- 3) G-CSF splenomegaliyi desteklemiştir, fakat esas splenomegali G-CSF' e ek olarak tümörden salgılanan faktörlerle belirgin hale gelmiştir.
- 4) Splenektomili farelerde tümör ağırlıklarının düşük bulunması dalağın; tümör koruyucu etkisinin olacağını gösterebilir.
- 5) G-CSF tek başına monositik hücrelerin artışına neden olurken, (p değeri 0,035) tümörün erken evresinde monositik kökenli hücreler artış gösterip, ileri evrelerde bu hücreler yerini granülositik hücrelere bırakmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- 1) Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A.(2012). CA: A Cancer Journal for Clinicians, 62(1),10-29.
- 2) Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A.(2012). CA: A Cancer Journal for Clinicians, 62(1),10-29.
- 3) Srivastava P.K. Kansere Karşı İmmunite. In: Male D, Brostoff J, Roth D.B, Roitt I (Ed.). İmir T. (Ceviri Ed.). İmmunoloji. İstanbul: Palme Yayıncılık, 2008; 401- 419.
- 4) Rosenberg SA. Progress in human tumor immunology and immunotherapy. Nature, 2001; 411: 380-384.
- 5) Bergers, G., Benjamin, L.E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 3 (6), 401-410.
- 6) Skobe, M., Rockwell, P., Goldstein, N., Vosseler, S.,Fusenig, N.E. (1997) Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell ,nvasion. *Nat Med*, 3 (11), 1222-1227.
- 7) Desmend, C., Haibe-Kains, B., Wirapati, P., Buyse, M., Larsimont, D., Bontempi, G. Ve diğerleri. (2008) Biological processes associated with breast

cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. Clin Cancer Res, 14(16), 5158-5165.

- 8) Teschendorff, A.R., Miremadi, A., Pinder, S.E., Ellis, I.O., Caldas, C.(2007) An immune response gene expression moduler identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. Genome Biol, 8(8), R157.
- 9) Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. Cell, 100(1), 57-70.
- 10) Balkwill, F., Mantovani, A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet, 357(9255), 539-545.
- 11) DeCosse, J.J., Gossens, C., Kuzma, J.F., Unsworth, B.R. (1975) Embryonic inductive tissues that cause histologic differentiation of murine mammary carcinoma in vitro J Natl Cancer Inst, 54(4), 913-922
- 12) Tlsty, T.D. (2001) Stromal cells can contribute oncogenic signals. Semin Cancer Biol, 11 (2), 97-104.
- 13) Kalluri, R. (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. Nat Rev Cancer, 3(6), 422-433.
- 14) Andriani, F., Garfield, J., Fusenig, N.E., Garlick, J.A. (2004) Basement membrane proteins promote progression of intraepithelial neoplasia in 3-dimensional models of human stratified epithelium. Int J Cancer , 108(3), 348-357.
- 15) Roskelley, C.D., Bissell, M.J. (2002) The dominance of the microenvironment in breast and ovarian cancer. Semin Cancer Biol, 12(2), 97-104.

- 16) Mueller, M.M., Fusenig, N.E. (2004) Friends or foes- bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*, 4(11), 839-849.
- 17) Weeks, B.H., He, W., Olson, K.L., Wang, X.J. (2001) Inducible expression of transforming growth factor beta I in papillomas causes rapid metastasis. *Cancer Res*, 61(20), 7435-7443.
- 18) Bergers, G., Benjamin, L.E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 3 (6), 401-410.
- 19) Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H. ve diğ erleri. (1998) CD8+ T cells infiltrated with, n cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res*, 58(16) 3491-3494
- 20) Angulo, I., Rodriguez, R., Garcia, B., Medina, M., Navarro, J., Subiza, J.L. (1995). Involvement of nitric oxide in bone marrow-derived natural suppressor activity. Its dependence on IFN-gamma. *J Immunol*, 155(1), 15-26.
- 21) Young, M.R., Wright, M.A., Pandit, R. (1997) Myeloid differentiation treatment to diminish the presence of immune-suppressive CD34+ cells within human head and neck squamous cell carcinomas. *J Immunol*, 159(2), 990-996.
- 22) Jaffe, M. L., Arai, H., Nabel, G. J. (1996). Mechanisms of tumor-induced immunosuppression: evidence for contact-dependent T cell suppression by monocytes. *Mol Med*, 2(6), 692-701..
- 23) Gabrilovich, D.I., Velders, M.P., Sotomayor, E.M., Kast, W.M. (2001). Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J Immunol*, 166(9), 5398-5406.

- 24) Kan,J.,Ko,E.C.,Einstein,S.,Sikora,A.G.,Fu,S.,Chen,S.H.(2011).Targeting immune suppressing myeloid-derived suppressor cells in oncology.Crit Rev Oncol Hematol,77(1),12-19..
- 25) Youn,J.I.,Gabrilovich,D.I.(2010)The biology of myeloid-derived suppressor cells:the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity.Ew J Immunol,40(11),2969-2975
- 26) Johansson,M.,D.G.Denardo,and L.M.Coessens,Polarized immune responses differentially regulate cancer development.Immunol Rev,2008.222:p. 145-54.
- 27) Dunn ,G.P.,ve ark.,A critical function for type I interferons in cancer immunoediting.Nat Immunol,2005.6(7):p. 722-9
- 28) Aspod,C. ve ark., Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. J Exp Med, 2007.204 (5):p.1037-47
- 29) Yang, L., Debusk, L. M., Fukuda, K., Fingleton, B., Gren-Jarvis, B., Shyr, Y. ve diğerleri. (2004). Expantion of myeloid immune supressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis.Cancer Cell,6(4),409-421.
- 30) F. Charles Brunicardi, Dana Anderson, David Dunn, John Hunter, Raphael Pollock. Schwartz's principles of surgery. Tenth edition.
- 31) Ergüven S. Dalağın enfeksiyon ve bağışıklıktaki rolü. Türk Hij Den Biyol Derg 1984; 1: 311-4.

- 32) Girgin S. Gedik E., Baç B, Taçyıldız Hİ. Benign hematolojik hastalıklarda splenektomi sonuçlarımız. Akademik Acil Tıp Derg 2008; 7: 42-5.
- 33) Akçay MN, Polat KY, Yıldırğan MI ve ark. Splenektomi sonrası gelişen enfeksiyonlar. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg 1995; 1: 67-70..
- 34) Arda B, Demirağ K, Işıkgöz Taşbakan M, Yamazhan T, Serter D. Splenektomiden 46 yıl sonra sepsis gelişen bir olgu nedeni ile splenektomi sonrası sepsis: Korunma ve öneriler. AKEM Derg 2004; 18: 180-3.
- 35) Youn,J,I.,Nagaraj, S., Collazo, M.,Gabrilovich, D.J. Subsets of myleoid-derived suppressor cells in tumor-brearing mice.J Immunol.2008;181 (8),5791-5802.
- 36) Youn, J.I.,Kumar,V.,Collazo,M., Nefodova, Y., Condamine,T.,Cheng, P. Ve diğerleri. Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation oh myleoid cells in canser. Nat Immunol 2013;14(3), 211-210.
- 37) Hart,I. (1982) ‘Seed and soil’ revisited: mechanisms of site-spesific metastasis. Cancer and Metastasis Rewiews, 1(1),5-16.
- 38) Dunn, G.P., Old, I, J., Schreiber, R. D. (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting.Immunity, 21(2)137-148
- 39) Pollard, J.W.(2008)Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. J Leukoc Biol,84(3),623-630.
- 40) Alexander M. Aliper, Victoria P. Frienden-Korovkina, Anton Buzdin , Sergey A. Roumiantsev / Alex Zhavoronkov. A role for G-CSF and GM-CSF in nonmyeloid cansers. Canser Medicine ,2014; 3(4):737-746.

- 41) Sevmiş M. Deneysel meme kanseri modelinde splenektominin immünolojik etkisi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi, ANKARA 2015.
- 42) Park, B. K. H. Zhang, Q. Zeng, J. Dai, E.T. Keller, T.Giordano, et al. NF-kappab in breast cancer cells promotes osteolytic bone metastasis by inducing osteoclastogenesis via CM-CSF.2004; Nat. Med.,13:62-69.
- 43) Dai,J,Y. Lu, C. Yu, J. M. Keller, A. Mizokami, J. Zhang. Reversal of chemotherapy-indyced leukopenia using granulocyte macrophage colony-stimulating factor promotes bone metastasis that can be bloked with osteoclast inhibitors. Canser Res. 2010; 70:5014-5023.
- 44) Geraldine Hery, François Becmeur, Laure Mefat, David Kalfa, Patrick Lutz, Jean-Michel Guys, Pascal de Lagausie. Laparoscopic Partial Splenectomy: Indications and results of a multicenter retrospective study.Surg Endosc, 2008; 22:45-49.