DENEYSEL ÇALIŞMA

SİROLİMUS VE TAKROLİMUS'UN KARACİĞER YENİLENMESİNE ETKİSİ

THE EFFECTS OF SIROLIMUS AND TAKROLIMUS ON LIVER REGENERATION

Erkut KESKİN
Ömer Vedat ÜNALP
Alper UĞUZ
Mutlu ÜNVER
Şafak ÖZTÜRK
Halit Batuhan DEMİR
Murat SÖZBİLEN
Ahmet ÇOKER

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada parsiyel hepatektomi yapılan farelerde sirolimus ve takrolimusun, kortikosteroid uygulandığında ve uygulanmadığı durumda, karaciğer yenilenmesine olan etkileri araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada ağırlıkları 200-300 gr arasında değişen 40 adet erkek fare üzerinde gerçekleştirildi. Sirolimus ve takrolimusun, karaciğer yenilenmesine olan etkileri, korkikosteroidlerin ise bu etkiler üzerindeki yeri araştırılmıştır.Parsiyel hepatektomi sonrası 4 gün süreyle sirolimus ve takrolimus tek başına ya da kortikosteroid (prednisolon) ile birlikte verilerek intraperitoneal olarak uygulandı. 4 gün sonunda farelerin karaciğer dokuları tartıldı ve ağırlık indeksi oluşturuldu. Karaciğer dokuları hematoksilen eosin ile boyanıp mitoz açısından incelendi.

Bulgular: Bu çalışmada takrolimus uygulanan grup ile karşılaştırıldığında sirolimus uygulanan grupta mitotik indeks ve ağırlık indeksi açısından sirolimus aleyhine istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Sirolimus ile kontrol grubunun karşılaştırılmasında ise her iki indeks açısından da anlamlı fark saptanmazken sirolimus ve steroidin beraber kullanıldığı grubun verilerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda mitotik indeks açısından sirolimus ve steroid aleyhine istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.

Sonuç: Sirolimusun karaciğer yenilenmesini baskılayıcı etkisinin kortikosteroidler ile ne yönde değiştiği özellikle segmental greftlerle yapılan karaciğer transplantasyonu sonrasında önem kazanmaktadır. Karaciğerdeki yenilenmenin baskılanması küçük hacimli parsiyel nakillerde risk oluşturabilir. Öte yandan bu etkinin hepatosellüler kanser için yapılan transplantasyonlarda faydalı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Karaciğer Rejenerasyonu, Sirolimus, Takrolimus

Ege Üniversitesi Genel Cerrahi Kliniği, İzmir
(Prof. Dr. A. Çoker, Doç. Dr. M. Sözbilen, Op. Dr. Ö. V. Ünalp, Op. Dr. E. Keskin, Op. Dr. A. Uğuz, Dr. H.B. Demir)
Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği, İzmir
(Op. Dr. M. Ünver, Op. Dr. Ş. Öztürk)
Yazışma: Op. Dr. Mutlu Ünver

SUMMARY

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

Material and Methods: Forty-eight male Sprague-Dawley rats (approximately 200-300 g) were randomly assigned to five groups. Each one underwent partial hepatectomy. 4 days after partial hepatectomy, sirolimus or tacrolimus in combination with or without corticosteroids (prednisolone) was intraperitoneally injected The rats were sacrificed at the end of four days, remnnat liver tissues were weighed and the weight index was created. Remnant liver tissues that stained with hematoxylin and eosin, were examined under a light microscope in terms of mitosis.

Results: In the comparison of mitotic index and weight index, between the sirolimus group and tacrolimus group; sirolimus group had statistically significant effects. And between the sirolimus group and control group, there were no statiscally significant differences. But in the comparison of mitotic index and weight index, between the sirolimus+ steroids and control group, there were statitiscally significant differences.

Conclusion: Investigating the effects of sirolimus in combination with corticosteroids has become more important after liver segmental grafts transplantations. The suppression of regeneration could cause risks after liver transplantation especially in small volume grafts. On the other hand, this effect is thought to be useful in transplantations for hepatocellular carcinoma.

Key words: Liver Regeneration, Sirolimus, Tacrolimus

GİRİŞ:

Klinik olarak karaciğer büyümesini en iyi gözlemlediğimiz örnekler canlıdan nakillerde verici ve alıcı karaciğerlerinin büyümesi, kısmi karaciğer transplantasyonu büyümesi, karaciğer hasarı veya kısmi hepatektomiden sonraki karaciğer büyümesidir.

Takrolimusun karaciğer yenilenmesi üzerine etkisi ile ilgili olarak çelişkili yayınlar bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda (1) takrolimusun karaciğer yenilenmesini artırdığı öne sürülürken diğerlerinde (2-3) takrolimus antiproliferatif ve sitotoksik olarak bulunmuştur. Kortikosteroidlerin karaciğer yenilenmesindeki etkileri ile ilgili olarak farklı sonuçlar bildirilmştir (1,2,3). Kullanılan kortikosteroidin tipi ve kullanım dozuna göre farklı sonuçlar yayınlanmıştır (4,5). Kortikostreoidlerin takrolimus ve sirolimus ile birlikte kullanımının karaciğer yenilenmesine etkileri ise henüz bilinmemektedir.

Karaciğer yenilenmesinin baskılanması küçük hacimli kısmi karaciğer nakli sonrası risk oluşturabilir. Öte yandan bu etkinin hepatosellüler kanser için yapılan transplantasyonlarda faydalı olacağı düşünülmektedir (6). Bu çalışma ile kısmi hepatektomi yapılan farelerde sirolimus ve takrolimusun kortikosteroid varlığında ve yokluğunda karaciğer yenilenmesi üzerine olan etkisi incelendi.

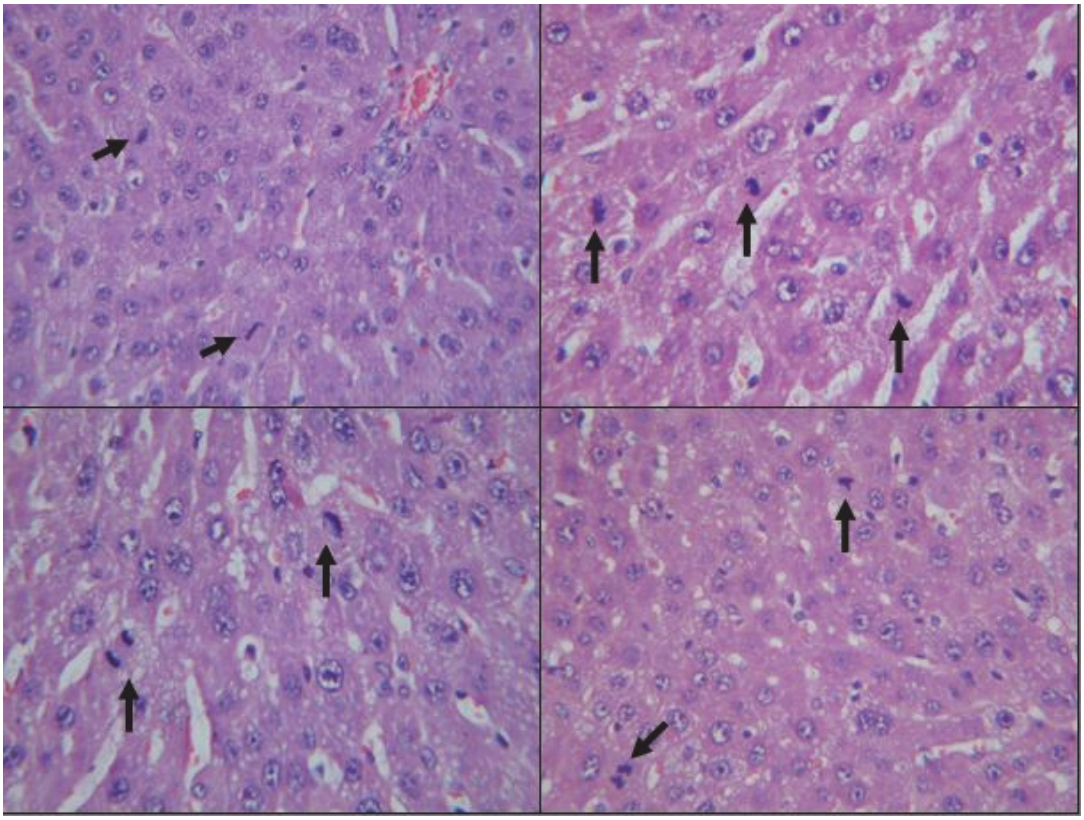
GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışmada, ağırlıkları 200-300 gram arasında değişen (ortalama ağırlık: 250 gram) 40 adet erkek İsviçre Albino faresi üzerinde gerçekleştirildi. Denekler Deneysel Cerrahi ve Araştırma Bilim Dalı laboratuvarlarında eşit ortam koşullarında YEMTA hayvan yemi ve su ile serbest olarak beslenip doğal gece-gündüz ışık-karanlık ortamında saklandılar. Bütün denekler operasyondan önceki gün saat 16:00'dan itibaren aç bırakıldı ancak su içmelerine izin verildi. Anestezi 10mg/kg ketamin ve 5mg/kg ksilazin injeksiyonu ile sağlandı. Fareler sırtüstü yatar konumda ve steril koşullarda 3cm'lik karın duvarı orta hat kesisi ile açıldı. Tüm gruplara % 40-70 kısmi hepatektomi uygulandı. Kısmi hepatektomi Higgins ve Anderson yöntemine göre sol ve orta lobların rezeksiyonu şeklinde uygulandı (7).

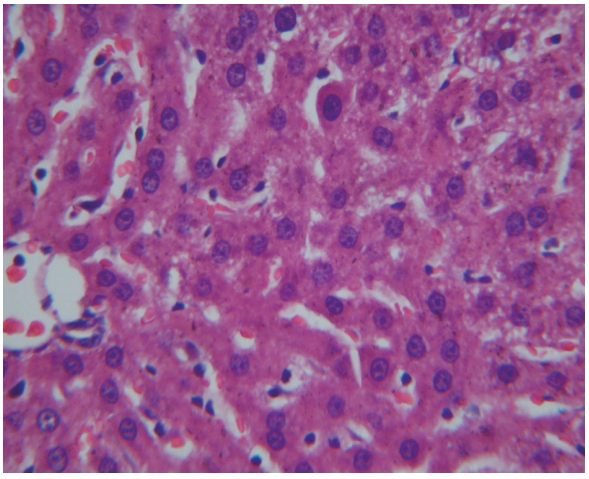
Grup 1 kontrol grubu olarak hazırlandı ve ilaç verilmedi. Hepatektomi sonrası grup 2 ve 3'e sirolimus 0,5mg/kg/gün; grup 4 ve 5'e takrolimus 1mg/kg/gün dozunda peroperatif intraperitoneal olarak uygulandı. Grup 3 ve 5'e ek olarak peroperatif 100mg/kg, postoperatif 1. günde 50mg/kg/gün; postoperatif 2.günde 30mg/kg/gün ve postoperatif 3. günde 20mg/kg/gün kortikosteroid (prednisolon) intraperitoneal olarak uygulandı. Fareler 4.ncü gün uyutuldular. Karın açılıp kalan karaciğer dokuları çıkarılarak tartıldı. Rezeke edilen karaciğer parçasının ağırlığı ile uyutulma sonrasındaki karaciğerin ağırlıkları karşılaştırılarak ağırlık indeksi oluşturuldu.

Histopatolojik inceleme amacıyla kalan karaciğer lobları ayrı ayrı olarak %10'luk formol solüsyonunda bir gece bekletildi. Rutin geleneksel yöntemle doku takibinden geçirildikten sonra parafin bloklar halinde gö-

müldü. Hematoksilen-Eosin ile boyandı. Elde edilen kesitler standart ışık mikroskobunda (Olympus) 40'lık objektifte 10 farklı alanda mitoz aşamasındaki hepatositlerin sayılması şeklinde değerlendirildi ve 10 değişik alanın toplam mitoz sayısı mitotik indeks olarak belirlendi (Resim 1-2).



Resim 1. FK grubunda farkli büyütme alanlarında mitozun fakli asamalarindaki hepatositler okla isaretli (Hematoksilen-eozin)



Resim 2. Rapamisin verilen grupta karaciğer dokusunda hepatositler, mitoz izlenmemekte. (Hematoksilen-eozin, x40)

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bulunan tüm değerler SPSS 11.0 versiyonu kullanılarak analiz edildi. Beş gruba her grup için ayrı ayrı Kruskal-Wallis testi uygulandı. Grupların kendi aralarındaki mitotik indeks ve ağırlık indeksi karşılaştırmaları Mann-Whitney U testi ile yapıldı. P değerinin <0,05 olması halinde sonuçlar istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

SONUÇLAR

Beş grupta Kruskal-Wallis testi uygulandığında, mitoz bakımından gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlendi ($p<0,05$).

Rezeke edilen karaciğer bölümü ağırlıkları gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlendi ($p\geq0,05$).

Uyutma sonrası kalan karaciğer dokularının ağırlıkları gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlendi ($p<0,05$).

Grup 1 ve 2 kendi aralarında mitotik indeks ve ağırlık indeksi açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değer saptanmadı (mitotik indeks için $p\geq0,05$, ağırlık indeksi için $p\geq0,05$).

Grup 1 ve 3 kendi aralarında mitotik indeks açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değer saptandı ($p<0,05$). Grup 1'de mitotik indeksin Grup 3'e oranla daha yüksek olduğu saptandı. Grup 1 ve 3 kendi aralarında ağırlık indeksi açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değer saptanmadı ($p\geq0,05$).

Grup 1 ve 4 kendi aralarında mitotik indeks ve ağırlık indeksi açısından karşılaştırıldığında grup 4 lehine istatistiksel olarak anlamlı değer saptandı (mitotik indeks için $p<0,05$, ağırlık indeksi için $p<0,05$).

Grup 1 ile 5 kendi aralarında mitotik indeksi açısından karşılaştırıldığında grup 5 lehine istatistiksel olarak anlamlı değer saptandı ($p<0,05$). Aynı grupların kendi aralarında ağırlık indeksi açısından karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p\geq0,05$).

Grup 2 ve 3 kendi aralarında mitotik indeks ve ağırlık indeksi açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (mitotik indeks için $p\geq0,05$; ağırlık indeksi için $p\geq0,05$).

Grup 2 ve 4 kendi aralarında mitoitik indeks ve ağırlık indeksi açısından karşılaştırıldığında gerek mitotik gerekse de ağırlık indeksi açısından grup 4'ün lehine istatisiksel olarak anlamlı fark saptandı (mitotik indeks için $p<0,05$; ağırlık indeksi için $p<0,05$).

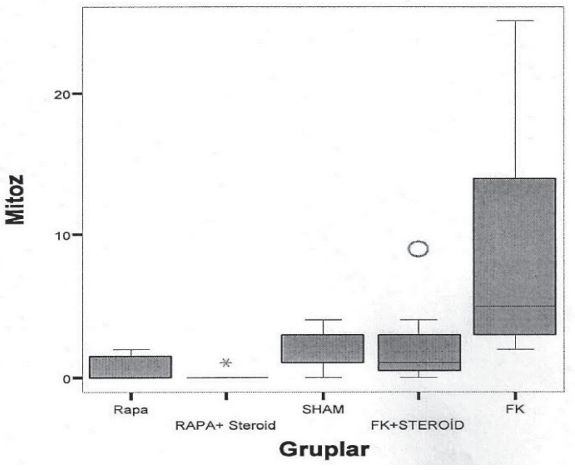
Grup 2 ve 5 kendi aralarında ağırlık indeksi açısından karşılaştırıldığında grup 5 lehine istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). Aynı grupların mitotik indeks için karşılaştırılması sonucunda ortaya çıkan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değere ulaşamadı ($p\geq0,05$).

Grup 3 ve 4 kendi aralarında ağırlık indeksi ve mitotik indeks açısından karşılaştırıldığında grup 4 lehine istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (mitotik indeks için $p<0,05$; ağırlık indeksi için $p<0,05$).

Grup 3 ve 5 kendi aralarında karşılaştırıldığında mitotik indeks açısından grup 5 lehine istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). Ağırlık indeksi açısından anlamlı fark saptanmadı ($p\geq0,05$).

Grup 4 ve 5 kendi aralarında karşılaştırıldığında mitotik indeks açısından grup 4 lehine istatistiksel olarak anlamlı fark saptanırken ($p<0,05$), ağırlık indeksi açısından anlamlı fark saptanmadı ($p\geq0,05$).

Gruplarda saptanan mitoz sayıları Grafik 1'de gösterilmiştir.



Grafik 1. Gruplarda gözlenen mitoz sayıları

SONUÇ

Yirminci yüzyılın ikinci yarısından itibaren kompleks yapıdaki karaciğer segment anatomisinin ve biliyer sistem anatomisinin cerrahlar tarafından daha iyi öğrenilmesi ile birlikte karaciğer rezeksiyonları daha yaygın olarak uygulanmaya başlamıştır. Bu teknik gelişmelere ek olarak yeni geliştirilen imünbaskılayıcı

ilaçların kullanıma girmesi ile beraber karaciğer nakli daha yaygın ve güvenli bir şekilde uygulama alanı bulmuştur.

Kısmi greftlerin karaciğer naklinde kullanılması, giderek daha geniş hepatik rezeksiyonların uygulanmaya başlanması ile birlikte karaciğer yenilenmesinin fizyopatolojisi giderek daha fazla tartışılır hale gelmiştir. Bu nedenle son dönemde bu alanda etkili olabileceği düşünülen pekçok farmakolojik ajan deneysel modeller ve klinik çalışmalarla araştırılmıştır. Bu deneysel çalışmalarda glukoz, dallı zincirli aminoasitler, glutamin, lipid emülsiyonları, N-Asetil sistein, takrolimus, sirolimus, siklosporin-A gibi imünbaskılayıcı ajanlar kullanılmıştır (8,9).

Biz bu çalışmada parsiyel hepatektomi yapılan farelerde sirolimus ve takrolimusun kortikosteroid varlığında ve yokluğunda karaciğer yenilenmesi üzerine olan etkisini araştırmayı amaçladık.

Sirolimusun normal sinyal transdüksiyon sürecini bozmak sureti ile hepatik yenilenmeyi baskıladığına dair çalışmalar bulunmaktadır (9,10). Çalışmamızda sirolimus uygulanan grubun kontrol grubu ile karşılaştırmasında anlamlı fark saptanmadı.

Literatürde takrolimusun hepatotrofik etkisi olduğuna dair yayınlar (1) bulunmakla birlikte, karaciğer üzerinde antiproliferatif ve sitotoksik etkilerinin olduğunu söyleyen çalışmalar da vardır (1-3). Bizim çalışmamızda takrolimus uygulanan grup ile kontrol grubu arasında mitotik indeks ve ağırlık indeksi açısından takrolimus lehine anlamlı fark saptadık. Sirolimus ve takrolimusun karşılaştırılmasında ise takrolimus lehine anlamlı fark saptadık.

Kortikosteroidlerin karaciğer yenilenmesindeki etkileri ile ilgili olarak farklı sonuçlar bildirilmştir. Kullanılan kortikosteroidin tipi ve kullanım dozuna göre değişen sonuçlar yayınlanmıştır. Hidrokortizonun düşük dozlarda yenilenmeyi artırdığı (4) , deksametazonun ise dozdan bağımsız olarak baskılandığı bildirilmiştir (5).

Çalışmamız kortikosteroidlerin imünbaskılayıcı ajanlarla birlikte kullanılmasının karaciğer yenilenmesi üzerine etkilerini değerlendiren ilk çalışmadır. Karaciğer nakli sonrasında sirolimus ve takrolimus, kortikosteroidler ile birlikte verildiği çalışmamız, klinik uygulamaları etkileyebilecek bazı sonuçlar vermiştir..

Takrolimus kullanılan grup ile takrolimus ve kortikosteroid kullanılan grup karşılaştırıldığında, mitotik indeks açısından sadece takrolimus kullanılan grup lehine istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Kortikosteroidle birlikte kullanımın, takrolimusun hepatotrofik etkisini kısmen azaltsa da tam olarak baskılamadığı sonucuna varılmıştır.

Sirolimus kullanılan grubun sirolimus ve kortikosteroid uygulanan grubun karşılaştırılmasında ise fark saptanmamıştır. Kortikosteroidle birlikte kullanılan sirolimusun kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda ise yenilenmenin baskılandığı belirlenmiştir.

Literatürde bildirilen Sirolimusun karaciğer yenilenmesini baskılayıcı ve takrolimusun uyarıcı etkilerinin kortikosteroidler ile birlikte verilmesi özellikle segmental greftlerle yapılan karaciğer nakli sonrasında önem kazanmaktadır. Yenilenmenin baskılanması küçük volümlü greftlerle yapılan karaciğer transplantasyonu sonrası risk oluşturabilirken, uyarılması ise faydalı olabilir. Ayrıca yenilenmedeki baskılanmanın hepatosellüler kanser için yapılan nakillerde faydalı olabileği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Chavez R, Jamieson N, Takamori S, Nivatvongs S, Pino G, Metcalfe ,et al.. Hepatotrophic effect of cyclosporine and FK 506 is not mimicked by rapamycin. Transplantation Proceedings 1999;2429:31.
2. Loreal O, Fautrel A, Meunier B, Guyomard C, Guillouzo A, Launois B. FK 506 is less cytotoxic than cyclosporine to human and rat hepatocytes in vitro. Transplant Proc 1991; 23: 2825-8.
3. Blanc P, Etienne H, Daujat M, Fabre I, Pichard L, Domergue J,et al. Antiproliferative effect of FK 506 and cyclosporine on adult human hepatocytes in culture. Transplant Proc 1991; 23: 2821-4.
4. Nadal C.Dose-related opposite effects of hydrocortisone on hepatocyte proliferation in the rat. Liver 1995;15:63–9
5. Nagy P, Kiss A, Schnur J, Thorgeirsson SS. Dexamethasone inhibits the proliferation of hepatocytes and oval cells but not bile duct cells in rat liver. Hepatology 1998;28:423–9.
6. Hwang, S.G. Lee, C.S. Ahn, K.H. Kim, D.B. Moon, T.Y. Ha, K.M,et al. Small-Sized liver graft does not increase the risk of hepatocellular carcinoma recurrence after living donor liver transplantation. Transplantation Proceedings, 2007;39:1526–9.

7. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Arch Pathol 1931;12:186–202.

8. Ito A, Higashiguchi T. Effects of glutamine administration on liver regeneration folllowing hepatectomy; Nutrition 1999 Jan;15(1):23-8.

9. Francavilla A, Carr BI, Starzl TE, Azzarone A, Carrieri G, Zeng QH. Effects of rapamycin on cultured hepatocyte proliferation and gene expression. Hepatology 1992;15:871-7.

10. Francavilla A, Starzl TE, Scotti C, Carrieri G, Azzarone A, Zeng QH,et al. Inhibition of liver, kidney and intestine regeneration by rapamycin. Transplantation 1992, 53(2):496-8.

İLETİŞİM:
Op. Dr. Mutlu Ünver,
Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Genel Cerrahi Kliniği, Yenişehir, İzmir
e-posta: mutluunver@gmail.com
Tel: 0505 829 89 66