

Kısmi Karaciğer Rezeksiyonu Sonrası Granülosit Makrofaj Koloni Stimülan Faktörün Kupffer Hücre Fonksiyonuna İn Vivo Etkisi

THE IN VIVO EFFECT OF GRANULOCYTE MACROPHAGE-COLONY STIMULATING FACTOR ON KUPFFER CELL FUNCTION AFTER PARTIAL HEPATECTOMY

Dr. Celal HATİBOĞLU,^a Dr. Ahmet ALYANAK,^a Dr. Bahadır ÇETİN,^a
Dr. Sebhattin ASLAN,^a Dr. Abdullah ÇETİN^a

^a1. Genel Cerrahi Kliniği, Ankara Onkoloji Hastanesi, ANKARA

Özet

Amaç: Bu deneysel çalışmada, sıçanlarda kısmi karaciğer rezeksiyonu yapıldıktan sonra uygulanacak granülosit makrofaj koloni stimülan faktör (GM-CSF)'ün Kupffer hücresi fagositik fonksiyonuna in vivo etkilerinin izole hepatik in situ perfüzyon yöntemiyle, Kupffer hücresi klirens kapasitesi (KHKK) ölçülerek incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler: Kırk erişkin Wistar cinsi Albino erkek sıçan 4 gruba ayrıldı. 1, Kontrol grubu: Sham operasyonu ve 7 gün boyunca 1 cc serum fizyolojik (SF) subkutan (SC) uygulandı (n= 8). 2, CSF-Kontrol grubu: Sham operasyonu ve 7 gün boyunca rHuGM-CSF (Leucomax[®]) 0.1 µg/gün sc uygulandı (n= 8). 3, Deney grubu: Kısmi karaciğer rezeksiyonu ve 7 gün boyunca 1 cc SF sc uygulandı (n= 12). 4, CSF-Deney grubu: Kısmi karaciğer rezeksiyonu ve 7 gün boyunca rHuGM-CSF 0.1 µg/gün sc uygulandı (n= 12). Grup 3 ve 4'ten 2'şer sıçan kaybedildi ve çalışma dışı kaldı. Süre sonunda laparotomi yapılarak bütün gruplarda izole hepatik in situ perfüzyon yapıldı. Perfüzyat yalnızca fagositotla uzaklaştırılabilen 1 µm çaplı floresan işaretli lateks parçacıklar içeriyordu. KHKK, giriş ve çıkış perfüzyat floresans farkından hesaplanıp yüzde olarak ifade edildi.

Bulgular: Kontrol grubunda ortalama KHKK %35.78 ± 6.56 ve CSF kontrol grubunda ise %38.45 ± 5.15 olarak hesaplandı ve aralarında anlamlı bir fark bulunmadı. Deney grubunda ortalama KHKK %25.76 ± 5.10 ve CSF deney grubunda ise %33.07 ± 6.38 olarak hesaplandı. Bu gruplar arasındaki fark anlamlı bulundu.

Sonuç: Bu çalışma, sıçanlarda kısmi karaciğer rezeksiyonu yapıldıktan sonra uygulanan rHuGM-CSF'in kupffer hücresinde in vivo fagositik kapasiteyi artırdığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer rezeksiyonu, karaciğer rejenerasyonu, Kupffer hücresi, GM-CSF

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2006, 26:56-61

Geliş Tarihi/Received: 11.03.2005 Kabul Tarihi/Accepted: 31.10.2005

XXI. Ulusal Çocuk Cerrahisi Kongresi'nde serbest bildiri olarak sunulmuştur (Şanlıurfa-2003).

Yazışma Adresi/Correspondence: Dr. Celal HATİBOĞLU
Ankara Onkoloji Hastanesi,
1. Genel Cerrahi Kliniği, Demetevler, ANKARA
celalhatiboglu@yahoo.com

Copyright © 2006 by Türkiye Klinikleri

Abstract

Objective: The purpose of this experimental study was to investigate the in vivo effect of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) on hepatic Kupffer cell phagocytic function by means of Kupffer cell clearance capacity (KCCC) determined by isolated hepatic in situ perfusion technique.

Material and Methods: Forty male Wistar rats were divided into 4 groups: 1- Control n= 8, 2- CSF-control n= 8, 3- Experiment n= 12, 4- CSF-experiment n= 12. Controls and CSF-controls (groups 1-2) underwent laparotomy (Sham operation) and 70% partial hepatectomy was performed on the subjects of experimental groups 3-4. In the postoperative period, groups 1 and 3 received daily subcutaneous injections of saline whereas groups 2 and 4 were administered subcutaneous 0.1 µg/day GM-CSF (Leucomax[®]). Four rats died-2 in group 3 and another 2 in group 4-and were excluded from the study. After 7 days all subjects underwent re-laparotomy and isolated hepatic in situ perfusion. Perfusate introduced through the portal vein contained fluorescein-labeled latex spheres of 1 µm that could only be removed by phagocytosis. KCCC expressed as percentage was extrapolated from the difference in fluorescence between influent and effluent perfusates.

Findings: The mean KCCC was 35.78 ± 6.56% in the control group and 38.45 ± 5.15% in the CSF-control group; this difference was not statistically significant. KCCC was 25.76 ± 5.10% in the experiment group and 33.07 ± 6.38% in the CSF-experiment group. The difference between experimental groups was significant.

Results: It was concluded that the administration of GM-CSF to partially hepatectomized rats increased in vivo phagocytic function of Kupffer cells but no such effect was observed in rats with normal liver.

Key Words: Liver, liver regeneration, Kupffer cells, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

Karaciğerde bulunan Kupffer hücreleri mononükleer fagositik (retiküloendotelial) sistemin parçasıdır. İşlevlerinden biri fagositot olup tümör hücrelerinin yıkımında da rol oynarlar.¹⁻³ Karaciğer rezeksiyonları toplam Kupffer hücre sayısını da azaltır. Granülosit makrofaj kolo-

ni stimulan faktör (GM-CSF)'ün, deneysel çalışmalarda hepatik rejenerasyonu arttırdığı, Kupffer hücrelerinin diferansiyasyon ve proliferasyonunu hem normal deneklerde hem de kısmi hepatektomili deneklerde arttırdığı gösterilmiştir.⁴⁻⁷ Ayrıca sıçan Kupffer hücre kültürlerinde GM-CSF'in DNA sentezini ve fagositik aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir.⁸ Ancak GM-CSF'in Kupffer hücrelerinde fagositik fonksiyona etkileri deney hayvanlarında in vivo araştırılmamıştır.

Bu çalışmada, sıçanlarda kısmi karaciğer rezeksiyonu yapıldıktan sonra uygulanan GM-CSF'in Kupffer hücresi fagositik fonksiyonuna in vivo etkilerinin Clements'in tanımladığı yöntemle Kupffer hücresi klerens kapasitesi (KHKK) ölçülerek incelenmesi amaçlandı.^{1,2}

Gereç ve Yöntemler

Çalışma, Ankara Onkoloji Hastanesi'nde planlanıp, etik kurul onayını takiben Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışmada ağırlıkları 325 ± 35 gram olan, 40 erişkin Wistar cinsi albino erkek sıçan (*Rattus Norvegicus*) kullanıldı. Deney öncesi sıçanlar standart yem ve şehir suyu ile ad libitum beslendi. İşlem öncesi sıçanlar 12 saat aç bırakıldılar. Anestezi için, ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul) 60 mg/kg kas içine verildi. Steril koşullarda orta hat kesisi ile laparotomi yapıldı. Kontrol gruplarında sıçanların karın içi eksplere edildikten sonra (Sham operasyonu) karın ön duvarı enblok 3/0 ipek dikişlerle tek tek kapatıldı. Deney gruplarında kısmi karaciğer rezeksiyonu için sıçanların karaciğerlerinin sol lateral ve median lobları (yaklaşık %70) 3/0 ipek ile bağlanarak rezeke edildi ve karın aynı şekilde kapatıldı. İşlem sırasında deneklere profilaksi amaçlı 5 mg/kg kas içi tek doz amikasin (Amikozit, Eczacıbaşı, İstanbul) verildi. Sıçanlarda GM-CSF'in rejenerasyondaki karaciğerde KHKK'ye etkisini araştırmak amacıyla bir deney grubuna ve ilaç kontrol grubuna 7 gün süreyle rHuGM-CSF (Leucomax, Molgramostim, Novartis/Schering-Plough Brinny, İrlanda) 0.1 µg/gün derialtı subkutan (sc) uygulandı.

Denekler 4 gruba ayrıldı:

1. Kontrol grubu: Sham operasyonu ve 7 gün boyunca 1 cc serum fizyolojik (SF) sc uygulandı (8 sıçan).
2. CSF-Kontrol grubu: Sham operasyonu ve 7 gün boyunca rHuGM-CSF 0.1 µg/gün sc uygulandı (8 sıçan).
3. Deney grubu: Kısmi karaciğer rezeksiyonu ve 7 gün boyunca 1 cc SF sc uygulandı (12 sıçan).
4. CSF-Deney grubu: Kısmi karaciğer rezeksiyonu ve 7 gün boyunca rHuGM-CSF 0.1 µg/gün sc uygulandı (12 sıçan).

Süre sonunda laparotomi yapılarak bütün gruplarda KHKK ölçüldü.

KHKK ölçümü, kupffer hücresinin fagositoz fonksiyonunu belirlemek için kullanıldı. Clements'in tanımladığı in situ izole hepatik perfüzyon tekniği kullanıldı.^{1,2} Önce karaciğer Hems'in tanımladığı şekilde cerrahi olarak izole edildi.⁹ İzole karaciğer perfüzyon tekniğinde, karaciğer yeterli süre canlılığını ve sellüler yapısını koruduğundan karaciğere ait fonksiyonların fizyolojik ortamda çalışılması mümkün olmaktadır.

Yedi günlük süreden sonra bütün deneklerin batınları orta hat eski insizyondan açıldı. Mezenterik ven dallarından uygun genişlikte olan birinden 100 IU heparin verildi. Daha sonra torakotomi (anterolateral) yapıldı. Hepatik arter ve abdominal vena kava inferior bağlandı. Portal vena mezenterik ven yoluyla ve vena kava inferiorun torasik kısmına sağ atriyum yoluyla 18 veya 20 G kanül yerleştirilerek karaciğer izole edildi. Karaciğer portal vena yerleştirilen kanül aracılığıyla perfüze edilmeye başlandı.

Perfüzyon sıvısı hazırlanırken pH değeri 7.2-7.4 olan Krebs-Henseleit bikarbonat tamponu temel alındı (NaCl 6.92 g/l, KCL 0.35 g/l, MgSO₄ 0.29 g/l, KH₂PO₄ 0.16 g/l, NaHCO₃ 2.1 g/l, glukoz 2.2 g/l, CaCl₂ 0.371 g/l). Solüsyon, içerisine yerleştirilen set aracılığıyla 10 dk. süreyle oksijen gazı verildikten sonra %0.5 glukoz ve %0.5 albumin eklendi ve perfüze hazırlandı.

Hazırlanan perfüze bir kısmı boş perfüzyon için kullanıldı, kalan kısma ise Kupffer hücreleri

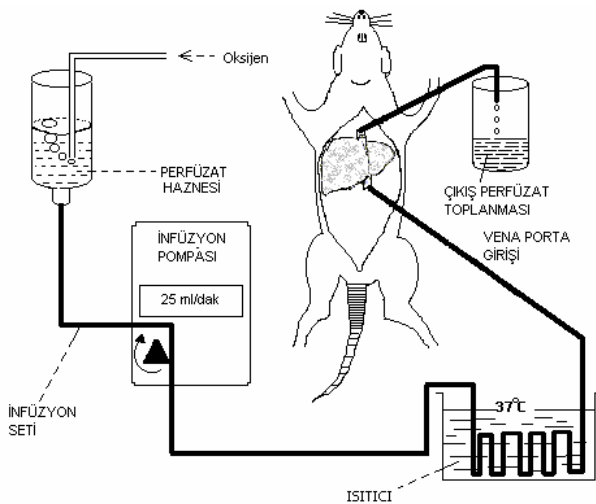
tarafından fagositoz yoluyla alınacak olan 1 µm çaplı ve floresan madde ile işaretli lateks partiküllerinden (Sigma-Aldrich, Almanya) 10⁵/mL konsantrasyonda olacak şekilde eklenerek süspansiyon hazırlandı.

Boş ve floresan işaretli perfüzetler 25 ml/dk. sabit hızla (yaklaşık 10 cm-su basıncı ile) portal venden infüzyon pompası aracılığı ile verildi. Perfüzet karaciğere girmeden, sıvı seti içerisinde Benn Marrie usulüyle 37°C'ye ısıtıldı (Şekil 1).

Deneklerin karaciğeri önce boş perfüzet ile berrak gelinceye kadar (yaklaşık 5-6 dk.) perfüze edildi. Ardından floresan işaretli lateks partikül içeren perfüzet ile 10 dk. perfüze edildi. Giriş ve çıkış perfüzetlerinin spektrofotometre ile floresansı okundu. Aradaki farkın giriş floresans değerine yüzde olarak oranı KHKK gösterdi. Hesaplamalarda "KHKK= (Giriş floresansı-Çıkış floresansı)/Giriş floresansı x 100" formülü kullanıldı ve sonuçlar yüzde olarak ifade edildi.

Clements'in orijinal çalışmasında KHKK değerleri operasyon yapılmayan grupta %34.6 ± 1.9 olarak bildirilmiştir.¹

Bağımsız değişkenlerden oluşan gruplar parametrik tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile çoklu karşılaştırıldı. Grupların ikili karşılaştırmalarında ise (Post Hoc tests) Tukey testi kullanıldı.



Şekil 1. Karaciğer izole in situ perfüzyon düzeneğinin şematik çizimi (Sıçan karaciğeri, insan karaciğeri şeklinde çizilmiştir).

Fark, p değeri 0.05'ten küçük olduğunda anlamlı kabul edildi.

Bulgular

İlk operasyon sonrasında 3. ve 4. gruptan 2'şer denek kaybedildi ve çalışma dışı bırakıldı. KHKK ölçümü için relaparotomi yapıldığında hepatik rezeksiyon yapılan 3 denekte batın içerisinde minimal asit ve 8 denekte batın içerisinde yapışıklıklar izlendi. Rezeksiyon yapılanların tümünde rezidü karaciğer dokusunda makroskopik hacim olarak önceki karaciğer boyutuna yakın rejenerasyon gözlemlendi.

Kontrol grubunda KHKK değerleri ortalaması %35.78 ± 6.56, CSF-kontrol grubunda ise %38.45 ± 5.15 olarak hesaplandı. Kontrol ve CSF-kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p= 0.798). Deney grubunda KHKK değerleri ortalaması %25.76 ± 5,10 bulunurken CSF-deney grubunda ise %33.07 ± 6.38 olarak belirlendi. Deney grubunda hesaplanan KHKK değerlerinin, kontrol gruplarından düşük ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. CSF-deney grubunda bulunan KHKK değerlerinin deney grubundan anlamlı yüksek olduğu (p< 0.05) saptandı.

Tüm grupların ortalama KHKK değerleri (%) ve standart sapmaları Tablo 1'de ve grafik olarak Şekil 2'de gösterilmektedir.

Tartışma

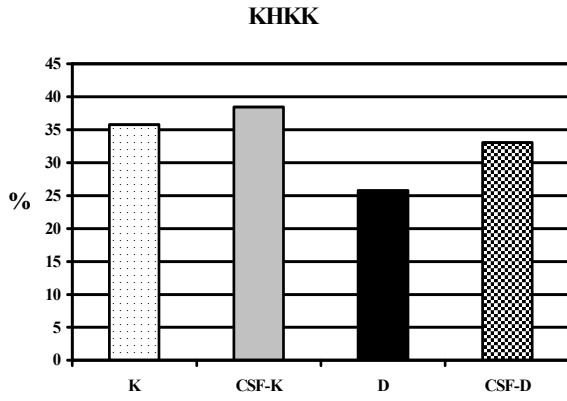
Kısmi karaciğer rezeksiyon, en zor abdominal cerrahi operasyonlardandır. Günümüzde %20-25 oranını geçmeyen seçilmiş olgularda karaciğer tümörlerinin tedavisinde ilk seçenektir ve kür sağlayabilmektedir.¹⁰ Hayati bir organda yapılmış bu denli büyük ameliyatlar beraberinde önemli oranda mortalite ve morbiditeyi de getirmektedir. Sağlam cerrahi sınırlarla tümörün çıkarılması ve anatomik yapıya uygun rezeksiyon sınırının belirlenmesi ilk aşamada rezidü karaciğer dokusunun azalmasına ve komplikasyonlara neden olmaktadır. Malignite ve beraberindeki beslenme bozukluğu ise immüniteyi olumsuz etkilemektedir.¹¹

Karaciğer dokusunun en önemli adaptasyon özelliği rejenerasyon göstermesidir. Kısmi karaci-

Tablo 1. Gruplarda ortalama KHKK (%) değerleri ve standart sapmalar. K ve D grupları arasında $p=0.761$ fark anlamlı, CSF-K ve D grupları arasında $p<0.001$ fark anlamlı, D ve CSF-D grupları arasında $p=0.041$ fark anlamlı bulunmuştur.

GRUPLAR			
K	CSF-K	D	CSF-D
35.78 ± 6.56	38.45 ± 5.15	25.76 ± 5.10	33.07 ± 6.38

K= Kontrol, CSF-K= CSF kontrol, D= Deney, CSF-D= CSF deney.



Şekil 2. Gruplarda ortalama KHKK'nin (%) grafik olarak gösterilişi. K= Kontrol, CSF-K= CSF kontrol, D= Deney, CSF-D= CSF deney.

ğer rezeksiyonu ile ilgili pek çok deneysel çalışma öncelikle hepatositlerde rejenerasyonu arttıran faktörleri ortaya koymaya yönelik olmuştur.¹² Vücudun savunma sistemlerinden biri mononükleer fagositik sistemdir ve bir parçası da karaciğer sinozoidlerinde yerleşen monosit kökenli fagositik Kupffer hücreleridir. Kupffer hücrelerinin tümör hücresi yıkımında rol aldığı iyi bilinmektedir.³ Ayrıca bazı çalışmalar karaciğer rejenerasyonunda da etkisi olduğunu göstermektedir.^{3,12}

Son yıllarda özellikle onkolojik tedavilerin başarısını arttıran bir gelişme de hematopoietik koloni stimulan faktörlerin izole edilip rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmesi olmuştur. Bu faktörlerden ilk izole edilen ve en çok kullanılan granülositer seri ve makrofajlar üzerinde etkili olan GM-CSF'dir. GM-CSF'in pek çok işlevinin olduğu

yapılan deney ve çalışmalarda gösterilmiştir. Bazı çalışmalar ise GM-CSF'in tümör büyümesini inhibe ettiğini ortaya koymaktadır.¹³

Kupffer hücreleri özelleşmiş doku makrofajları oldukları için M-CSF ve GM-CSF'in etkileri detaylı araştırılmıştır. Urano ve ark. sıçan Kupffer hücre kültürlerinde M-CSF kullandıklarında DNA sentezinin, fagositik aktivitenin ve hücre lipopolisakkarid alımının arttığını göstermişlerdir.⁸ Schuurman ve ark. kolon kanserli hastaların karaciğerden elde ettikleri insan Kupffer hücrelerini hGM-CSF bulunan ortamda kolon kanser hücreleri ile karşılaştırdıklarında tümör lizisinin arttığını ve bunun ana mekanizmasının TNF- α ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir.⁶ Hashimoto ve ark. in vitro çalışmalarında farelerden elde ettikleri Kupffer hücrelerinin M-CSF ve GM-CSF uygulamasıyla sayılarının 7 günde 4-6 kat arttığını, fonksiyonlarının olgunlaştığını belirtmişlerdir.⁴ Held ve ark. farelerde çeşitli dozlarda M-CSF uygulayarak akciğer alveolu, dalak ve karaciğerde makrofaj sayısının arttığını bildirmişlerdir.¹⁴ Schuurman ve ark. diğer bir çalışmalarında rmGM-CSF uygulamasıyla sıçanlarda Kupffer hücre sayısının arttığını ve in vivo tümör gelişiminin engellendiğini göstermişlerdir.¹⁵ Miyakawa ve ark. farelerde M-CSF uygulandığında Kupffer hücrelerinde proliferatif kapasitenin arttığını ancak hücrelerin süresinin değişmediğini göstermişlerdir.⁵ Ayrıca Theocharis ve ark. iki farklı çalışmalarında G-CSF kullanarak sıçanlarda kısmi karaciğer rezeksiyonu sonrası veya tioasetamid ile kimyasal travma sonrası karaciğer rejeneratif kapasitesinin arttığını bildirmişlerdir.^{7,16} Diğer taraftan ise Demirer ve ark. çalışmasında kolon anastomozu örneğinde GM-CSF'in yara iyileşmesine olumlu etkisinin bulunmadığı göstermişlerdir.¹⁷ Bütün bu çalışmalar GM-CSF veya M-CSF'in Kupffer hücre proliferasyonunu uyardığını göstermektedir. Ancak yapılan literatür taramalarında bu hücrelerin in vivo fagositik fonksiyonlarını araştırmanın bir çalışmaya rastlanılmadı. Bu deneysel çalışmada, karaciğer kısmi rezeksiyon modelinde GM-CSF'in KHKK'ye yani fagositik fonksiyona etkileri incelendi.

Rejenerasyon çalışmalarının pek çoğu Higgins ve Anderson'ın 1931 de yayınladığı sıçan modelini

temel almaktadır.¹⁸ Karaciğer anatomisi, %70 kısmi hepatektomi ve rejenerasyon çalışmalarına son derece uygundur. Bu çalışmada da aynı model kullanıldı.

Deney grubu büyüklüğü belirlenirken Higgins'in orijinal çalışmasında %25 civarında bildirilen mortalite ve deney hayvanı etik kuralları gözönüne alındı. Kontrol grupları daha sınırlı tutulup ve çalışma gruplarında denek sayısı beklenen mortaliteyle güvenilir istatistiksel çalışmaya imkan sağlaması için 12'şer olarak belirlendi. Mortalite kısmi hepatektomili deneklerde %16.6 olarak hesaplandı.

İn vitro çalışmalarda M-CSF ve GM-CSF'in 10^5 IU/mL üzeri yüksek dozlarda sıçan Kupffer hücrelerinde fagositik aktiviteyi arttırdığı bildirilmektedir.⁸ Hashimoto ve ark. in vitro çalışmalarında yüksek dozda kullanılan GM-CSF'in Kupffer hücreleri üzerindeki M-CSF reseptörlerini azalttığını (Down regulation) göstermişlerdir.⁴ Ayrıca Held ve ark. farelerde yaptıkları çalışmada günlük küçük dozda M-CSF kullandıklarında (10-50-100 ng) Kupffer hücre sayısının arttığını, nispeten yüksek dozlarda (500 ng= 0.5 µg) bu artışın gözlenmediğini bildirmişlerdir.¹³ Bu çalışmada 0.1 µg günlük doz tercih edildi.

Çalışmada rHuGM-CSF 7 gün süre ile uygulandı. Yayınlar ortalama Kupffer hücre ömrünün 3.8 gün olduğunu göstermektedir.² Ayrıca sıçan karaciğerinde 7 günde büyük ölçüde rejenerasyon gözlenmektedir.¹² Abdominal cerrahi girişimler için 7 gün iyi bir nekahat dönemi olarak bilinmektedir. Böylelikle hem belirgin hepatik rejenerasyon sağlanması hem de en az bir kez hücre yenilenmesinin 7 günde tamamlanması amaçlandı.

Çalışmada normal karaciğerli Sham operasyonlu sıçanlarda bazal KHKK değerleri ortalama 35.78 ± 6.56 olarak bulundu. Bazal değerler Clements'in çalışmasında %33.5 ve Dağlar'ın çalışmasında %38.8 olarak bildirilmiştir. Sonuçlar aynı tekniği kullanan yayınlara paraleldir.^{1,2}

Kontrol gruplarında KHKK karşılaştırıldığında, GM-CSF uygulanan CSF-K grubunda değerler SF uygulanan K grubuna göre daha yüksek olmakla birlikte anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$).

Normal karaciğerde GM-CSF uygulanan dozda KHKK'ye anlamlı bir etki yapmadığı gözlemlendi. Karaciğerde yapılmış benzer çalışma olmadığından bu sonuçlar karşılaştırılamadı. Yayınlar Kupffer hücre proliferasyonu ve fonksiyonlarının GM-CSF dışında çok sayıda sitokin tarafından düzenlendiğini göstermektedir.³

Çalışmada %70 kısmi hepatektomi yapıldıktan sonra 7 gün içerisinde makroskopik olarak karaciğerde belirgin rejenerasyon ve rezidü doku hacminde artış gözlenmiştir ancak karaciğer ağırlığı veya immünohistokimya yardımıyla DNA sentezi gibi rejenerasyon parametrelerine, asıl amacın dışına çıkacağından bakılmadı. Bu konuda çok sayıda yayın sıçanlarda 7 günde karaciğerde büyük ölçüde rejenerasyon gerçekleştiğini göstermektedir.¹² Kısmi rezeksiyon yapıp 7 gün boyunca SF uygulanan deney grubunda KHKK ortalama 25.7 ± 5.10 olarak bulundu. Bazal değerlerden yaklaşık %28 daha düşüktür ve fark anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Buradan, sıçan karaciğerinde kısmi rezeksiyon yapıldıktan 7 gün sonra, makroskopik rejenerasyona rağmen Kupffer hücresi fagositik fonksiyonlarında bir kaybın söz konusu olduğu görülmektedir.

Kısmi karaciğer rezeksiyonu sonrası 7 gün süre ile 0.1 µg rHuGM-CSF uygulanan CSF-deney grubunda ortalama 33.07 ± 6.38 olarak belirlenen KHKK, değeri deney grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı artış olduğu gösterildi ($p < 0.05$). Bu bulgular in vitro çalışmalarda gösterilen GM-CSF etkilerini destekler mahiyettedir. Kupffer hücrelerine ait toplam fagositik kapasitenin arttığı gözlemlendi.

Çalışmada rejenerasyon sürecindeki karaciğerde GM-CSF ile sağlanan KHKK artışın öncelikle hücre proliferasyonunun uyarılmasına bağlı olarak geliştiği düşünüldü. Aynı etkinin CSF-kontrol grubunda gözlenmemiş olması ise rezeksiyona cevap olarak başlayan karaciğer rejenerasyonunun kompleks mekanizması içerisinde yer alan başka faktörlerin GM-CSF ile Kupffer hücre proliferasyonu ve fagositik fonksiyonu üzerinde sinerjistik etki oluşturduğunu düşündürmektedir.

Fagositik fonksiyonların Clements'in tanımladığı KHKK yöntemi ile değerlendirilmesi tercih

edildi.¹ Bunun dışında floresan mikroskopi ile histopatolojik inceleme yapılabilirdi. Ancak KHKK ölçümünün daha kantitatif verilere dayanması, tekniğin nispeten kolay olması ve düşük maliyet tercihte belirleyici olmuştur. Perfüzyonda orijinal çalışmada olduğu gibi floresan işaretli lateks partiküller kullanıldı. Benzer şekilde radyoaktif işaretli lateks partiküller kullanılıp gama kamera ile gerek çıkan perfüzyon gerekse doğrudan karaciğer dokusunun radyoaktivitesi ölçülerek KHKK hesaplanabilirdi.

Clements'in orijinal çalışmasında olduğu gibi elektron mikroskobu ile hücre içine alınan lateks partiküller ve dolayısıyla hücre canlılığı gösterilmek istendi ancak elektron mikroskopi imkanı sağlanamadı. Ayrıca farklı dozlar kullanılan karşılaştırmalı gruplar oluşturma isteği maliyet artışı nedeniyle gerçekleştirilemedi.

Sonuç

Bu çalışma, sıçanlarda kısmi karaciğer rezeksiyonu yapıldıktan sonra uygulanan düşük doz rHuGM-CSF'in Kupffer hücrelerinde in vivo fagositik kapasiteyi arttırdığını göstermektedir. Bu sonuç, klinikte rHuGM-CSF'in karaciğer rezeksiyonu yapılan hastalarda iyileşme sürecine, vücudun savunma sistemlerinin parçası olan Kupffer hücrelerinin etkisini güçlendirerek, katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Sonuçların farklı doz ve yöntemlerle yapılacak yeni çalışmalarla desteklenmesine ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Clements WD, Halliday MI, McCaigue MD, Barclay RG, Rowlands BJ. Effects of extrahepatic obstructive jaundice on Kupffer cell clearance capacity. *Arch Surg* 1993;128:200-4.
- Daglar GO, Kama NA, Atli M, et al. Effect of 5-lipoxygenase inhibition on Kupffer cell clearance capacity in obstructive jaundiced rats. *J Surg Res* 2001;96:158-62.
- Naito M, Hasegawa G, Takahashi K. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc Res Tech* 1997;39:350-64.
- Hashimoto S, Yamada M, Yanai N, Kawashima T, Motoyoshi K. Phenotypic change and proliferation of murine Kupffer cells by colony-stimulating factors. *J Interferon Cytokine Res* 1996;16:237-43.
- Miyakawa K, Myint YY, Takahashi K. Effects of recombinant human macrophage colony-stimulating factor on proliferation, differentiation and survival of Kupffer cells in the liver of adult mice. *Anal Quant Cytol Histol* 1999;21:329-35.
- Schuurman B, Heuff G, Beelen RH, Meyer S. Enhanced killing capacity of human Kupffer cells after activation with human granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor and interferon gamma. *Cancer Immunol Immunother* 1994;39:179-84.
- Theocharis SE, Agapitos EB, Margeli AP, Goutas ND, Kittas CN, Davaris PS. Effects of two forms of granulocyte-colony-stimulating factor on hepatic regeneration after 70% partial hepatectomy in rats. *Clin Sci* 1997;92:315-20.
- Urano F, Imoto M, Fukuda Y, Koyama K, Nakano I. Effects of macrophage colony-stimulating factor on the proliferation and the function of Kupffer cells. *Arzneimittelforschung* 1993;43:804-7.
- Hems R, Ross BD, Berry Mn, Krebs HA. Gluconeogenesis in the perfused rat liver. *Biochem J* 1966;101:284-92.
- Myers WC, Chari RS, Schaffer BK, Darling CE, Yang P. Liver neoplasms. In: Townsend CM, ed. *Sabis Textbook of Surgery*. 16th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2001. p.1020-33.
- Blumgard LH. Liver resection, liver and biliary tumours. *Surgery of Liver and Biliary Tract*. 2nd ed. Londra: Churchill Livingstone; 1994. p.1495-537.
- Michalopoulos GK, DeFranses MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-6.
- Hill AD, Redmond HP, Naama HA, Bouchier-Hayes D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inhibits tumor growth during the postoperative period. *Surgery* 1996;119:178-85.
- Held TK, Mielke ME, Unger M, Trautmann M, Cross AS. Kinetics and dose dependence of macrophage colony-stimulating factor-induced proliferation and activation of murine mononuclear phagocytes in situ: Differences between lungs, liver, and spleen. *J Interferon Cytokine Res* 1996;16:159-68.
- Schuurman B, Koenen HJ, Beelen RH, Meyer S. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor pretreatment induces an increase of rat Kupffer cells with enhanced cytotoxicity in vitro and prevention of tumor outgrowth in vivo. *Anticancer Drugs* 1997;8:269-75.
- Theocharis SE, Margeli AP, Kittas CN. Effect of granulocyte-colony-stimulating factor administration on tissue regeneration due to thioacetamide induced liver injury in rats. *Dig Dis Sci* 1999;44:1990-6.
- Demirer S, Şengül N, İnan A, Eroğlu A, Bumin C, Kuterdem E. Effect of recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on the healing of colonic anastomosis in rats. *J Invest Surg* 2001;14:221-5.
- Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver: Restorations of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931;12:186-202.