

**T.C**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**İÇ HASTALIKLARI**  
**ANABİLİM DALI**

**RATLARDA SODYUM TAUROKOLAT İLE**  
**OLUŞTURULAN AKUT NEKROTİZAN**  
**PANKREATİTTE ETANERCEPT'İN ERKEN VE GEÇ**  
**ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. ŞENAY TOPSAKAL**

**TEZ DANIŞMANI**

**DOÇ.DR MUSTAFA YILMAZ**

**DENİZLİ-2008**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam sayın Prof. Dr. Ali KESKİN 'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımnda her zaman desteklerini gördüğüm tez hocam sayın Doç Dr Mustafa YILMAZ'a ve ayrıca hocalarım sayın Prof. Dr. Nadir YÖNETÇİ'ye, Doç. Prof. Dr. Murat ÇOLAKOĞLU'na, Dr. Veli ÇOBANKARA'ya, Doç. Dr. Arzu YAREN'e, Doç. Dr. Semin FENKÇİ'ye, Doç. Dr. Belda DURSUN'a, Yard. Doç. Dr. Fulya AKIN'a ve birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dr. Şenay TOPSAKAL

İş bu çalışma jürimiz tarafından İÇ HASTALIKLARI  
ANABİLİMDALI'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN:

ÜYE:

ÜYE:

ÜYE:

ÜYE:

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

.../.../20

DEKAN

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER .....	2
PANKREAS ANATOMİSİ .....	2
PANKREAS BÖLÜMLERİ .....	3
PANKREAS KANALLARI .....	4
PANKREAS FİZYOLOJİSİ VE HİSTOLOJİSİ .....	5
AKUT PANKREATİT .....	7
TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR- $\alpha$ .....	9
AKUT PANKREATİT VE OKSİDATİF STRES .....	10
PATOLOJİ.....	12
AKUT ÖDEMATÖZ PANKREATİT .....	13
AKUT NEKROTİZAN PANKREATİT .....	13
AKUT PANKREATİT TANISINDA LABORATUVAR YÖNTEMLERİ .....	14
ETANERCEPT - TANIM .....	15
KLİNİK FARMAKOLOJİ .....	16
FARMAKODİNAMİK .....	16
FARMAKOKİNETİK .....	17
GEREÇ VE YÖNTEM .....	18
SONUÇLAR .....	23
TARTIŞMA .....	33
ÖZET .....	37
İNGİLİZCE ÖZET .....	38
KAYNAKLAR .....	39

## KISALTMALAR

AP	:	Akut pankreatit
AS	:	Ankilozan Spondilit
ETA	:	Etanercept
HE	:	Hematoksilen eozin
JRA	:	Juvenil romatoid atrit
O <sub>2</sub>	:	Oksijen
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	:	Süperoksid anyon radikali
OH <sup>-</sup>	:	Hidroksil radikali
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	Hidrojen peroksid
IL	:	İnterleukin
MDA	:	Malondialdehid
MOY	:	Multiple organ yetmezliği
MPO	:	Miyeloperoksidz
PNL	:	Polimorfonükleer lökosit
SOD	:	Süperoksid dismutaz
SIRS	:	Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
RA	:	Romatoid artrit
TNF	:	Tümör nekrozis faktör
TNF- $\alpha$	:	Tümör nekrozis faktör alfa
TNFR	:	Tümör nekrozis faktör reseptörü
NF- $\kappa$ B	:	Nükleer faktör- $\kappa$ B

## RESİMLER ÇİZELGESİ

Sayfa No

Resim-1. Pankreas anatomisinin şematize edilmiş görüntüsü.....	2
Resim 2. Pankreas Langerhans adacıklarında glukagon pozitif alfa hücreleri (sol) ve insülin pozitif beta hücreleri (sağ), immunoperoksidaz boyama.....	4
Resim 3. Koledok kanalı.....	16
Resim 4. Taurokolat enjeksiyonu.....	16
Resim 5: Etanercept uygulaması.....	17
Resim 6. Akut pankreatit oluşumundan 24 saat sonra sakrifiye edilen kontrol grubundan bir ratın pankreasının görünümü, küçük nekrotik odaklar (ince oklar) ve kanama bölgesi (ok başı).....	19
Resim 7: AP oluşumundan 24 saat sonra sakrifiye edilen kontrol grubundan bir ratın pankreasındaki nekrozlar (beyaz bölgeler) ve karın boşluğunda hemorajik asit sıvısı.....	20
Resim 8: AP oluşumundan 2 gün sonra ölen bir ratın karın boşluğunda hemorajik asit sıvısı.....	20
Resim 9. Grup I'deki şiddetli akut pankreatit oluşmuş ratın pankreasının görüntüsü. Yaygın nekroz ve ödem (siyah oklar). İnflamatuar hücre infiltrasyonu (kırmızı oklar). HE. Bar= 400µm.....	22
Resim 10. Grup II'deki orta şiddetli akut pankreatit oluşmuş bir ratın pankreasının görüntüsü. Nekroz (ok başları ile sınırlı alan), hafif kanama (siyah ok). HE. Bar=100µm.....	23

Resim 11. Grup III'teki bir ratın pankreasında şiddetli kanama. Ödem ve fibrozis gelişimi. HE. Bar= 200µm.....	23
Resim 12. Grup III'teki bir ratta yaygın yağ nekrozu (oklar) ve orta şiddette fibrozis. HE. Bar=100µm.....	24
Resim 13. Grup IV'deki pankreas dokusunda kanal oluşumları (siyah oklar). Hafif ödem ve mononükleer hücre infiltrasyonları (kırmızı oklar). HE. Bar=200µm.....	24

## TABLÖLAR ÇİZELGESİ

Sayfa No

Tablo -1: Deney düzenindeki gruplar ve işlemler.....	15
Tablo- 2: Histopatolojik lezyon skorları.....	21
Tablo- 3: Histopatolojik kriterlerin gruplara göre dağılımı.....	25
Tablo-4 : Biyokimyasal ve histopatolojik bulguların istatistik analiz sonuçları....	25



## GRAFİK ÇİZELGESİ

Sayfa No

Grafik 1. Serum amilaz düzeylerinin grup ortalamalarına göre grafiği.....	26
Grafik 2. Serum lipaz düzeylerinin grup ortalamalarına göre grafiği.....	26
Grafik 3. Pankreatik doku MPO düzeylerinin grup ortalamalarına göre grafiği.....	27
Grafik 4. Pankreatik doku MDA düzeylerinin grup ortalamalarına göre grafiği.....	27
Grafik 5. Histopatolojik skorların grup ortalamalarına göre grafiği.....	28

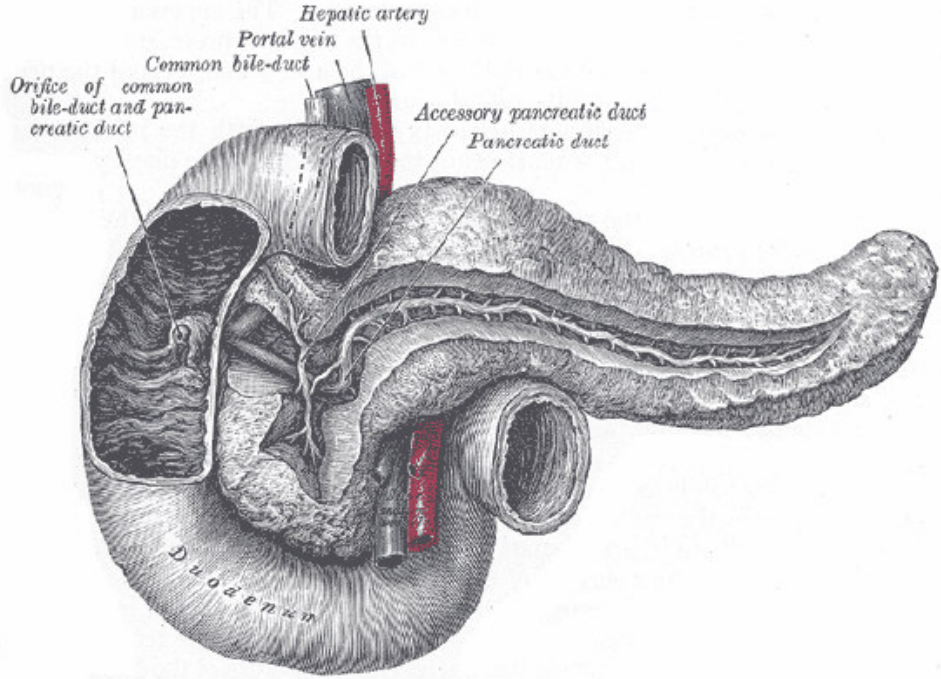
# GİRİŞ

Akut pankreatit (AP) henüz kesinleşmiş spesifik bir tedavisi bulunamamasına rağmen öldürücü olabilen şiddetli bir pankreas hastalığıdır. Akut pankreatit tipik olarak karın ağrısı ile başlayan ve genellikle pankreasın inflamatuvar hastalığı sonucu kan ve idrarda pankreas enzimlerinin yüksekliği ile birlikte seyreden akut bir klinik tablodur. Erken ölümlerin nedenleri şok, respiratuvar ve hepatik yetmezlik olabilmektedir. Akut pankreatitin hayatı tehdit eden geç komplikasyonları genellikle enfekte pankreatik nekroz ve multiorgan yetmezliği ile ilişkilidir. Hastalık esnasında pankreasta ciddi patolojik değişiklikler oluşmaktadır. Akut pankreatit sindirim enzimlerinin pankreatik interstisyum ile sistemik sirkülasyona, salınımı ve aynı zamanda artmış sitokin üretimi ile salınımı sonucunda lokal ve sistemik etkilerin oluşumuna neden olan multifaktöryel bir hastalıktır. Tanıda en sık kullanılan pankreas enzimleri amilaz ve lipazdır (1–3). Aktive pankreatik makrofajlardan salınan IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin AP'nin lokal ve sistemik etkilerinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu sitokinler lokal olarak AP'yi şiddetlendirirken, sistemik olarak da artmış kapiller permeabilite ile lökosit adherensine ve ekstrasvazyona neden olarak multiple organ yetmezliği gelişiminde rol oynamaktadır (4–11). TNF- $\alpha$  romatoid artrit, inflamatuvar barsak hastalıkları ve AP gibi çeşitli hastalıklarda inflamasyon gelişiminde önemli role sahiptir. Akut pankreatit ve sistemik komplikasyonların gelişiminde sitokinlerin özellikle TNF- $\alpha$ 'nın ana rolü oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Deneysel AP modellerinde TNF- $\alpha$  poliklonal antikorunu (İnfliximab) kullanılarak olumlu etkiler saptandığı bildirilmiştir (12). Bu çalışmada Etanercept (TNF- $\alpha$ :Fc), TNF- $\alpha$  reseptör tip II füzyon proteini kullanılacaktır. ENBREL (Etanercept- ETA) 75 kilodalton (p75) tumor necrosis factor receptor'un (TNFR) ekstrasellüler ligand bağlayıcı bölümünü içeren insan IgG 1 nin fc bölümüne bağlı bir dimerik füzyon proteinidir. ETA spesifik olarak TNF ve onun hücre yüzeyindeki TNF reseptörlerine etkisini bloke eder, ETA hem dolaşan hem de bağlı TNF- $\alpha$ 'yı inhibe etmektedir. Bu çalışmanın amacı ratlardaki akut nekrotizan pankreatit modelinde anti TNF tedavinin kısa ve uzun süreli etkinliğini değerlendirmek ve akut pankreatit tedavisine yeni yaklaşımlara katkıda bulunmaktır.

# GENEL BİLGİLER

## PANKREAS ANATOMİSİ

Pankreas loplul, gri-pembe renkli bir bezdir. Karın arka duvarında 1. ve 2. lomber vertebra hizasında, çoğunlukla hareketsiz, retroperitoneal yerleşimli bir organdır. Karın boşluğunun ön ve üstünde büyük kesimi orta çizginin sağında, küçük bir parçası da sol tarafta bulunur. Duodenum'dan dalağa kadar, enlemesine uzanır. Erişkin bir insanda pankreas bezi 80-90 gr ağırlığında, ortalama 15-20 cm uzunluğunda, 3 cm eninde ve 1-1.5 cm kalınlığındadır. Pankreas, sağda duodenum, solda dalak arasında retroperitoneal olarak transvers şekilde uzanır. Üstte bursa omentalis, önde transvers mezokolon ve aşağıda omentum majus ile ilişkilidir (Resim 1).



**Resim-1.** Pankreas anatomisinin şematize edilmiş görüntüsü, Atlas der Anatomie des menschen, Sobotta, (13).

## PANKREASIN BÖLÜMLERİ

Pankreas anatomik olarak 5 ayrı bölümde incelenir bunlar; baş, uncinata process, boyun, gövde ve kuyruk bölümleridir.

**Baş:** Bu bölüm duodenum kavsi içinde, 2. lomber vertebranın hemen sağında yerleşmiş şekildedir. Karaciğerden gelen duktus koledokusun son kısmı genellikle pankreas başının içinden geçer. Pankreas başının arkasında distal koledok, sağ böbreğin damarları, vena kava inferior yer alır. Yukarıda vena portadan, aşağıda vena mezenterikaya uzanan hayali bir plan pankreas baş kısmı ile boyun kısmını birbirinden ayırır.

**Processus uncinatus:** Vena porta ve superior mezenterik damarların arkasında, aort ve vena kava inferiorun önünde yer alır. Sagittal kesitte uncinata process superior mezenterik arter ile aort arasında, sol renal venin üzerinde, duodenumun 3. ve 4. parçasının altındadır. Uncinata process her insanda olmayabilir veya superior mezenterik damarları tamamen çevreleyebilir.

**Boyun:** Pankreasın nispeten daralmış bir kısmı olup, üstte pilor ve duodenum birinci kısmı, altta vena porta, vena mezenterika superior ve vena splenika bulunur. Genişliği ortalama 2 cm kadardır.

**Gövde:** Pankreasın gövdesi superior mezenterik damarların solunda yerleşmiştir ve duodenumun 4. kıtası, Treitz ligamanı, bazı jejunal anslar, transvers kolonun sol tarafı ile komşudur. Gövdenin üst kenarı sağda çöliak aks ve hepatik arter, solda splenik damarlarla komşudur. Gövdenin ön yüzü omental bursanın arka duvarının pankreas ve mide yüzeyini ayıran çift peritoneal tabakası ile örtülüdür. Bu tabakanın aynı zamanda transvers mezokolon ile de komşuluğu vardır ve iki tabakaya ayrılır; bir yaprağı ön yüzü, diğeri inferior yüzü kaplar. Arka yüzeyi aort, arteria mezenterica superior çıkışı, diafragmanın sol krusu, sol adrenal, perirenal fasya, sol böbrek damarları, sol böbrek ve vena splenika ile komşudur.

**Kuyruk:** Splenorenal ligamanın içinde yer alır. Dalak hilusuna kadar uzanır ve nispeten hareketlidir (13, 14).

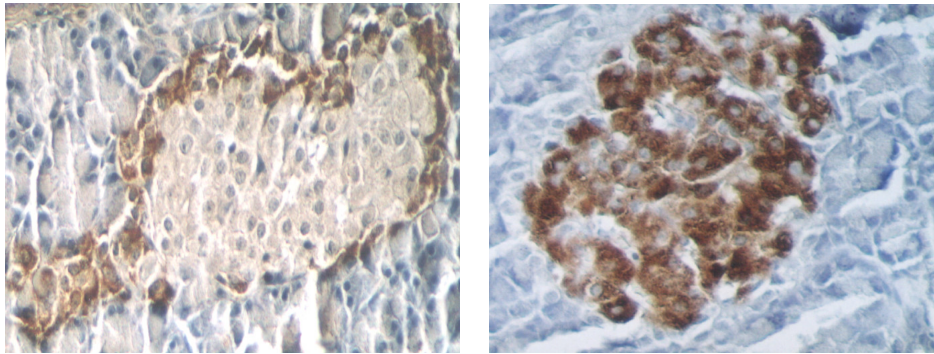
## PANKREAS KANALLARI

Pankreasın ana kanalı olan Wirsung, organın kuyruk kısmından başlayıp, sağa doğru gövde, boyun ve baş kısmını geçerek Papilla Vateri'ye ulaşır. Yaklaşık 15-20 cm uzunluğunda 3-3.5 mm çapındadır ve 15-20 kanalcık, bu kanala açılır.

Santorini olarak isimlendirilen aksesuar kanal ise baş kısmını drene eder ve daha kısadır, % 60 vakada her iki kanal duodenuma açılır. Sadece % 30 vakada Wirsung kanalı tüm sekresyonları taşır ve Santorini kör uçla sonlanır, % 10 vakada Santorini tüm sekresyonları taşır, Wirsung küçük veya yoktur (14).

## PANKREAS FİZYOLOJİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Pankreas hem ekzokrin, hemde endokrin salgı yapan bir bezdir. Organın endokrin sekresyonu (insülin, glukagon ve somatostatin) yaşamın devam etmesi için gerekli olup Langerhans adacıklarından salgılanır. Adacıklar morfoloji ve boyanma özellikleriyle birbirinden ayrılan üç tip hücreden oluşur. Beta hücreleri, adacıkların % 60-80'ini oluşturur ve insülin salgılar. Alfa hücreleri, adacıkların %10-20'sini oluşturur ve glukagon salgılar (Resim 2). Delta hücreleri adacıkların yaklaşık %10'unu oluşturur ve somatostatin salgılar (15).



**Resim 2.** Pankreas Langerhans adacıklarında glukagon pozitif alfa hücreleri (sol) ve insülin pozitif beta hücreleri (sağ), immunoperoxidaz boyama (16).

Pankreasın temel ekzokrin salgı ünitesi asinüstür ve günde ortalama 1500-2000 ml berrak, izotonik ve alkali ( pH: 8.0- 8.3) ekzokrin salgısı vardır. Bu salgı 20'den çok sindirim enzimini içinde bulundurur. Ekzokrin salgıdaki başlıca katyonlar Na ve K olup plazma konsantrasyonlarıyla aynıdır. Başlıca anyonlar ise Cl ve Mg'dur.

Ekzokrin salgının akım hızı artıkça bikarbonat ( $\text{HCO}_3$ ) konsantrasyonu artarken, Cl azalır. Pankreastan salgılanan bu ekzokrin salgıdaki bikarbonat iyonları, mideden duodenuma boşalan asitli kimusun nötralize edilmesinde de önemli rol oynar. Ekzokrin pankreas salgısı bazal koşullarda 0.3 mg/ml protein içerir. Bu proteinlerin % 90'ını enzimler ve proenzimler oluşturur. Pankreas ekzokrin salgısı üç temel besin maddesinin (protein, karbonhidrat, yağ) sindirimini sağlayan enzimleri içerir. Proteolitik enzimler; tripsin, kimotripsin, karboksipolipeptidaz, ribonükleaz ve deoksiribonükleaz'dan ibarettir. Bunların içinde en fazla miktarda olan tripsindir. Tripsin ve kimotripsin proteinleri peptidlere parçalar. Karboksipolipeptidaz peptidleri karboksi ucundan ayırarak aminoasitlere parçalar. Nükleazlar ise nükleik asitleri parçalar. Karbonhidratları parçalayan enzim amilazdır. Bu enzim karbonhidratları parçalayarak disakkaritleri ve az miktarda trisakkaritleri oluşturur. Pankreasın yağ sindiriminden sorumlu enzimler ise lipaz, kolesterol esteraz ve fosfolipazdır. Proteolitik enzimler pankreas hücrelerinde sentez edildiklerinde inaktif formdadır. Bunlar intestinal kanala salgılandıktan sonra aktif duruma geçerler. Pankreas salgılarındaki proteolitik enzimlerin bağırsağa dökülünceye kadar aktif duruma geçmemeleri önemlidir. Çünkü tripsin ve diğer enzimler pankreasın kendisini sindirebilir. Pankreas asinuslarına proteolitik enzimleri sekrete eden hücreler aynı zamanda tripsin inhibitörü adı verilen maddeyi de salgırlar. Öteki proteolitik enzimlerinde aktivasyonu tripsinle olduğu için, tripsin inhibitörü tümünün aktivasyonunu engeller. Bununla beraber pankreas ağır şekilde hasara uğrar veya kanalı tıkanır, pankreasın hasarlanan kısmında çok miktarda enzim birikir. Bu durumda tripsin inhibitörü yetersiz kalır ve pankreas salgısı aktive olup, birkaç saat içinde tüm pankreası sindirebilir, sonuçta akut pankreatit gelişir (15).

### **AKUT PANKREATİT**

Pankreatit hafif kendini sınırlayan pankreatik inflamasyondan hayatı tehdit eden pankreatik nekroza kadar değişik ağırlıkta seyredebilir. Amerika'da her yıl akut pankreatit gelişen hastaların 185,000'den fazlası ağırlıklı olarak, belirgin organ disfonksiyonu olmadan hafif parankimal ödemle sınırlı ve olaysız iyileşen hastalık süreci şeklinde görülür (17). Akut pankreatitin mortalite oranının % 2-10 olmasına rağmen, bu öncelikle hastalığın şiddeti ile ilişkilidir. Hastaların yaklaşık % 10-30'unda pankreatik inflamasyonun pankreatik ve peripankreatik nekroza ilerlediği ağır

hastalık gelişir. Lokal yanıtın ağırlığı sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) ve önemli morbidite ve mortalitesi olan multiorgan yetmezliği gelişmesine yol açabilir (18).

Bu hastaların tedavisi hastalık patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasıyla hızla gelişmiştir. Hastalık patofizyolojisi interstisyumdaki pankreatik enzimlerin salınımını ve aktivasyonunu, pankreasın otodigestiyonunu, sistemik sirkülasyona salınmalarının ardından gelişen multiple organ disfonksiyonunu içerir. Rinderknecht, 1988 yılında ilk defa sitokinlerin pankreatitte önemli bir rol oynayabileceği hipotezini öne sürdü ve immün sistemin uygunsuz aktivasyonu ile lokal hastalık ve sistemik komplikasyon şiddetinin artabileceğini bildirmiştir (19). Birkaç yıl sonra, proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin sentez ve salınımının lokal yıkımlanma ve inflamasyonun sistemik dağılımından sorumlu olabileceğine dair anlamlı kanıtlar toplanmış, böylece gland içinde oluşan inflamatuvar mediatörler pankreatik zedelenmeyi artırarak sorumlu organlara yayılmakta olduğu ve lokal inflamasyonun ağır sistemik hastalığa dönüşmesine neden olduğu saptanmıştır (20).

### **TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR ALFA (TNF- $\alpha$ )**

Pek çok hücre TNF- $\alpha$  sentezlemesine rağmen, bu sitokin genel olarak aktive makrofajlarda üretilir. TNF- $\alpha$  ilk olarak çeşitli solid tümörlerde nekroza neden olabilen bir serum faktörü olarak saptanmıştır, fakat daha sonra başka etkilerinin de olduğu anlaşılmıştır. Matür formu 157 aminoaside sahiptir. Pek çok hücre yüzeyinde p55 ve p75 olarak iki adet reseptörü bulunur (21). TNF- $\alpha$  reseptörüne bağlanma hidrolize ve ekstrasellüler parçanın salınımına neden olur. Dolaşan reseptör seviyesinin artışının endotoksemiye oluşturduğu gösterilmiştir (22). Soluble tümör nekrozis faktör reseptörünün (TNFR) periferik dolaşıma salınımı sellüler cevap verebilirliği azaltan bir mekanizmaya yol açabileceği bildirilmiştir (23). Aktive nötrofil ve lenfositlerde aynı zamanda soluble TNF reseptörlerini salmakta ve bu aşırı TNF aktivitesinin nötralize edilmesinin bir yolunu oluşturmaktadır (24). TNF- $\alpha$ 'nın deney hayvanlarına injeksiyonu septik şoka benzer bir sendroma neden olur. TNF- $\alpha$ 'nın şokun bir ana mediyatörü olduğu, dolaşan düzeylerinin içlerinde akut pankreatitinde olduğu çeşitli hastalıklarda arttığı ve şoka neden olduğu düşünülmektedir. Çeşitli klinik ve deneysel çalışmada düzeyleri sonuçlarla korele

bulunmuştur (25). İntrapancreatik ve serum TNF- $\alpha$  düzeyi pankreatit indüksiyonundan 1 saat sonra tespit edilebilir ve takip eden 6 saat boyunca hızla artar. İmmunohistokimyasal çalışmalar TNF- $\alpha$  için güçlü bir gösterge olan makrofajların pankreasa infiltre olduklarını göstermiştir. Serum ve dokudaki tüm TNF- $\alpha$  konsantrasyon artışlarının pankreatik hasar derecesi ve inflamasyonla direkt korelasyon gösterdiği bulunmuştur (26). TNF- $\alpha$ 'nın p55 ve p75 reseptörlerinin her ikisi de pankreasta exprese edilir. Bu reseptörlerin kültüre pankreatik hücrelerde TNF- $\alpha$  ya yanıt olarak üretildiği ve salındığı gösterilmiştir (27). Akut pankreatitte TNF- $\alpha$  üretimi primer cevaptır ve endotokseminin sonucu değildir çünkü germ-free ratlarda da aynı değişiklikler görülebilir (28).

TNF- $\alpha$  üretimi uzak bölgelerde de görülür, fakat daha geçtir (29). Dolaşan TNF- $\alpha$  düzeyleri hastalık şiddetinin güvenilir bir belirleyicisi değildir. Çünkü, karaciğer, TNF'yi genel dolaşıma ulaşmadan hızla temizlemektedir ve bu serumda neden TNF'nin saptanmasının zor olduğunu açıklar (30). Sirkülasyonda soluble TNF reseptörü varlığında hastalık şiddetinin daha iyi bir belirleyicisidir ve bir çalışmada TNF düzeylerinin saptanamadığı zaman bile organ yetmezliğinin belirleyicisi olduğu bildirilmektedir (31).

### **AKUT PANKREATİT VE OKSİDATİF STRES**

Serbest radikaller, en dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulduran ve bu yüzden de oldukça reaktif kimyasal parçalardır. Solunan oksijen ( $O_2$ ) canlılarda hayatı idame ettirmekle birlikte, alınan miktarın % 5'inin serbest oksijen radikallerine dönüşümü sonucu, antioksidan defans zayıflığı durumlarında zararlı da olabilmektedir. Tek bir elektronun ( $O_2$ )'ye ilave olmasıyla süperoksit anyon radikal ( $O_2^-$ ) oluşmaktadır. Oksijen ise vücutta süperoksit dismutaz (SOD) ile hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) dönüştürülmektedir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilmekte ve daha önemlisi en toksik oksijen radikali olan hidroksil radikali ( $OH^-$ ) dönüşebilmekte ve hücrelerde hasar oluşturabilmektedir. Lipid peroksidasyonu, serbest oksijen radikalleri tarafından başlatılan ve zar yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olaydır. Bu kimyasal olay organizmada oluşan kuvvetli oksitleyici bir radikalın zar yapısındaki doymamış yağ asidi zincirindeki  $\alpha$ -metilen gruplarındaki



hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu serbest radikalın süperoksit anyonu ve hidroksil radikali olduğu, bununla birlikte lipid peroksidasyonunun uyarılmasında asıl etkili radikalın hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaştırılması yağ asidi zincirinin radikal niteliği kazanmasına neden olur. Lipid peroksidasyonunun; zar lipid yapısındaki değişiklikler nedeniyle zar işlevinin bozulması, oluşan serbest radikallerin enzimler ve diğer hücre bileşenleri üzerine etkisi, son ürünler olan aldehidlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden olduğu kabul edilmektedir (32).

Oksijen serbest radikallerinin akut pankreatitin patogenezi ve progresyonunda önemli bir faktör olduğu saptanmıştır (33). Bu yüksek reaktif biyokimyasal parçalar, biyolojik membranlarda lipid ve proteinleri direk olarak etkileyerek patofizyolojik etkilerini yaparlar ve fonksiyon bozukluğuna neden olurlar (34). Dolaylı olarak ise, iki ayrı mekanizmayla araziidonik asit kaskadında rol oynarlar. Bunlardan ilkinde, güçlü platelet agregasyonu ve vazokonstriktör etkileriyle doku sirkülasyonunu azaltan tromboksan artışına neden olurlar. İkincisinde ise lökositlerin aktivasyonunu ve lizozomal enzimlerin salınımını destekleyen, Lökotrien B4 üretimini artırır. Bu değişiklikler ileri hücre hasarına destek olur. Pek çok deneysel ve klinik çalışma oksijen serbest radikallerinin akut pankreatitdeki rolüne dikkat çekmektedir (34-36). Bu yayınların çoğunda serbest radikal temizleyicileri anlamlı düzelme sağlamış fakat akut pankreatitdeki karakteristik değişiklikleri inhibe edememiştir. Böylece oksijen serbest radikallerinin bu hastalıkta önemli mediyatörler olduğu düşünülmüştür. İnvitro çalışmalarda pankreatik asiner hücrelerin oksidatif strese duyarlı olduğu konusunda açık kanıtlar vardır. Çeşitli oksijen radikalleri doz ve zaman bağımlı olarak ağır asiner hücre hasarı oluşturur. Bu da oksijen serbest radikallerinin akut pankreatitdeki patofizyolojik değişiklikleri başlatan ana etken olduğu tartışmasına neden olmuştur. Sonuç olarak; oksijen serbest radikallerinin in vivo koşullarda akut pankreatitdeki mediyatör mü? başlatıcı faktör mü? olduğu sorusu halen tartışma konusudur (37).

Malondialdehid (MDA), oksidatif stress sonucu gelişen lipidlerin peroksidasyon hasarının son ürünü olup luminal oksidatif stresin hücre stoplazma düzeyi göstergesi olarak kullanılmaktadır (15).

## **PATOLOJİ**

Akut pankreatit gelişme sürecinde ilk gözlenen değişiklikler, pankreasın interstisyel septumu boyunca yer alan yağ dokusunda nekroz ve az miktarda PNL infiltrasyonu şeklindedir. Asiner hücreler genellikle sağlamdır, interstisyumda ödem ve hücre infiltrasyonu ile karakterize histopatolojik değişiklikler oluşur. Bu tablo ödematöz pankreatit olarak adlandırılır. Olguların % 70-80'inde patoloji bu haliyle sınırlı kalma eğilimi gösterir. Olaya glandüler hücreler ve yağ dokusunun koagülasyon nekrozu eklenirse nekrotizan pankreatit tablosu gelişir. Nekroz pankreasın tümünü uniform olarak tutmayabilir. Nekrotik alanlar arasındaki sağlam bölgeler pankreasa benekli bir görünüm kazandırır. Damar duvarlarının aktive elastaz nedeniyle tahrip olması sonucu hemorajik pankreatit gelişir. Hemoraji dokuları diseksiyonla cilt altına kadar ulaşabilir. Ölü dokular, pankreatik sıvı, kan ve yağ damlacıkları pankreas içinde veya kenarında birikerek psödokistlere neden olur. Bu psödokistler retroperitoneal olarak büyüyebildikleri gibi, komşu organlara bası yapacak şekilde herhangi bir yönde büyüyebilirler. Aktive olmuş pankreas enzimleri ve inflamatuvar hücrelerin peritona irritatif etkileri sonucu sıvı kolleksiyonu gelişebilir. Bu sıvı sıklıkla omentum minusta olmak üzere intraperitoneal (asit), diyafragmatik lenfatikler yoluyla intraplevral (plevral efüzyon) olabilir. Nekrotik materyal ve pankreas sıvısı içeren kolleksiyonların enfekte olması sonucu pankreas apseleri meydana gelebilir. Pankreas apseleri, enfekte psödokistler ve enfekte nekrozu ayrı histopatolojik durumları temsil ederler. Pankreatit seyrinde uzak organ ve doku lezyonları da gelişebilir. Bunlar subkutan ve intramedüller osseoz, yağ nekrozu, aseptik epifizyel nekroz veya eklem sinoviasını içeren lezyonlardır ve bunların aktive olmuş pankreatik lipaza bağlı olduğu, deneysel olarak gösterilmiştir. Akut pankreatite neden olan olay ne olursa olsun tablo aynıdır.

Akut pankreatit, patogenezi halen kesin olarak aydınlatılamamıştır. Günümüzde en çok kabul gören görüş, pankreas içindeki inaktif proenzimlerin, aktif hale geçmeleri ve bezin kendi kendini sindirmesi olayıdır. Doku kaybı proteolizis,

lipoliz ve damarların zayıflamasına bağlıdır (37). Patolojik lezyonlar tanımlanırken iki gruba ayrılarak incelenmektedir (38).

### **AKUT ÖDEMATÖZ PANKREATİT**

Makroskopik olarak, gland büyük, çevredeki mezenter ve omentumda beyazımsı gri renkli, sertçe yağ nekrozu alanları dikkati çeker. Ancak; ödematöz pankreatitte yağ nekrozu fazla değildir ve çok defa mikroskopik düzeyde kalır. Genellikle karın içinde açık pembe renkli bir sıvı vardır ve nekroz görülmez. Mikroskopik olarak pankreas lobülleri buzlu cam gibi bir görünüm almıştır ve içleri inflamatuvar hücrelerle, özellikle PNL'ler ile doludur. Asiner hücreler genellikle bozulmamıştır. Ultrastrüktürel incelemede asini hücrelerinin lümen kenarındaki mikrovillilerinin kaybolduğu, endoplazmik retikulum ve mitokondrilerinin bozulduğu görülür. Enzimleri depolayan zimojen granüllerin membranları sağlam olup büyüklük ve dansiteleri normaldir. Kapiller ve lenfatikler genişlemiş olabilir, ancak tromboz görülmez (39).

### **AKUT NEKROTİZAN PANKREATİT**

Akut nekrotizan pankreatitte morfoloji pankreasa salınan aktif pankreas enzinlerinin etkisine direkt olarak bağlıdır. Makroskopik olarak gland şişmiş ve büyümüştür. Retroperitoneal alanda, duodenum, kolon ve mide gibi komşu organlarda belirgin ödem vardır. Karın üst bölümünde yaygın yağ nekrozları saptanır. Pankreatitin ağırlığına paralel olarak pankreas boşluğunda kirli kahverengi-siyah renkli bir sıvı bulunur. Retroperitoneal bölgede, ağır olgularda kolon mezosunda ve dalak pedikülünde kanamalar saptanır. Mikroskopik olarak pankreasın tümü nekroze olabileceği gibi, yer yer normal ve nekroze pankreas yanyana da görülebilir. Nekroz için sabit bir bulgu, asini lobüllerini besleyen kapiller arteriol ve venüllerdeki tıkanmalardır. Prelobüler damarların tıkanmaları, nekroz için tipiktir. Nekroz alanlarının yanında, ödemli, mononükleer hücre infiltrasyonu alanları da görülür (39).

### **AKUT PANKREATİT TANISINDA LABORATUAR YÖNTEMLERİ**

Akut pankreatit tanısında kullanılan çok sayıda biyokimyasal parametre mevcuttur, bunlar arasında en fazla kullanılanlar enzim düzeylerinin incelenmesidir.

## AMİLAZ

Pankreatitli hastaların 3/4'ünde başlangıçta yükselerek 7-10 gün süreyle yüksek kalır. Zirve değerine 12-72 saat arasında ulaşır. Sensitivitesi % 75-92 ve spesifitesi % 20-60'dir. Akut ataktan 10 gün sonra devam eden yüksek amilaz düzeyi psödokist veya apse oluşumunu düşündürmelidir. Amilaz erken dönemde normale dönmesi, hastalığın düzelmekte olduğunu gösterebileceği gibi ağır pankreas hasarının belirtisi de olabilir (40). Amilaz düzeyi ile hastalığın prognozu arasında bir ilişki yoktur. Alkole bağlı formlarda amilaz düzeyi normal olabileceği gibi hipertrigliseridemili hastalarda normal ya da düşük bulunabilir. Amilaz tayini ucuz ve pratik bir teknik olmasına rağmen pankreas dokusuna özgünlüğü zayıftır. Pankreas dışında tükrük bezi, over, meme, akciğer, karaciğer ve ince barsak gibi organlarda da amilaz bulunmaktadır. Akut pankreatit dışında hiperamilazemiye neden olan birçok hastalık vardır. Bunlar arasında kronik böbrek hastalığı, tükrük bezi hastalıkları (enfeksiyon, alkolizm, radyasyon, kanser), kronik karaciğer hastalığı, sindirim sistemi hastalıkları (koledok taşı, akut kolesistit, ülser perforasyonu, intestinal obstruksiyon, akut apandisit, Crohn hastalığı, mezenter emboli), diyabetik ketoasidoz, akciğer hastalıkları (pnömoni, pulmoner emboli, kanser), jinekolojik hastalıklar (ektopik gebelik, over tümörleri), prostat kanseri, kafa travmaları ve makroamilazemi sayılabilir.

Akut pankreatitli hastalarda serum amilazında önce yükselen idrar amilazı, 10 güne kadar yüksek kalabildiğinden değerli bir bulgudur. Daha hassas ve spesifik belirleyiciler araştırıldığında idrar amilazı ve amilaz klirensinin serum klirensine oranı bu seçeneklerden birisi olarak gündeme gelmiştir. Hastaların periton ve plevral sıvılarında amilaz değeri seruma göre 4-5 kat yüksek olabilir (40).

## LİPAZ

Trigliseritleri digliseritlere ve yağ asitlerine parçalayan sadece pankreastan değil karaciğer ve mideden de salgılanan bir enzimdir. Moleküler ağırlığı amilaza yakındır. Glomerüler filtrasyondan sonra tamamen emilir ve idrarda görülmez. Pankreatik lipaz ekzokrin asiner hücreler tarafından salgılanır, salgılandığı anda aktive olur. Akut pankreatitli olgularda serum lipaz düzeyi olguların % 87'sinde yüksek bulunur. Amilazdan daha spesifiktir. Ancak akut kolesistit, peptik ülser

perforasyonu ve mezenter emboli gibi hastalıklarda da yükselebilir. Serum lipaz yüksekliği amilaz yüksekliğinden daha uzun süre devam ettiği için klinik tanısı geç konan hastalarda daha yararlı bir parametredir.

Lipaz/Amilaz oranının yüksek olması alkolik pankreatit tanısında kullanılabilir. Lipaz, alkolik pankreatitte biliyer pankreatite oranla, amilazdan daha fazla artış göstermektedir (40).

### **ETANERCEPT**

Etanercept insan 75 kilodalton (p75) TNF reseptörünün ekstraselüler ligand bağlayıcı bölümünü içeren insan IgG1'inin fc bölümüne bağlı bir dimerik füzyon proteinidir. Etanerceptin Fc komponenti CH2 ve CH3 domaini ve menteşe bölgesi içerir, fakat IgG1'in CH1 domainini içermez. Etanercept bir Çin hamster ovaryumundan memeli hücre ekspresyon sistemi ile recombinant DNA teknolojisi yoluyla üretilmiştir, 934 amino asit içermektedir ve yaklaşık 150 kilo dalton moleküler ağırlığa sahiptir.

### **KLİNİK FARMAKOLOJİ**

#### **FARMAKODİNAMİK**

Etanercept spesifik olarak TNF ve onun hücre yüzeyindeki TNF reseptörlerine etkisini bloke eder. TNF inflamatuvar ve immun yanıtta doğal olarak oluşan bir sitokindir. Rheumatoid Artrit (RA), polyarticular- Juvenile Romatoid Artrit (JRA), ve Ankilozan Spondilitin (AS) inflamatuvar süreçlerinde önemli bir rol oynar (41,42). Artan TNF düzeylerinin eklem patolojisine neden olduğu RA, AS, Psöriatik artritli hastaların dokularında ve sıvılarında tespit edilmiştir (43). TNF'nin iki farklı reseptörü (TNFRs), 55 kilodalton protein (p55) ve 75 kilodalton protein (p75), hücre membranları üzerine monomerik moleküller ve soluble formlar doğal olarak mevcuttur (27,44). TNF'nin etkisi hücre yüzeylerindeki reseptöre bağlanması ile oluşur. Etanercept iki TNF molekülüne de bağlanabilen p75 TNF reseptörün dimerik soluble formudur. TNF'nin aktivitesini invitro olarak inhibe eder, murin kollagen ile tetiklenen artritleri de içeren inflamasyonun çeşitli hayvan modellerinde etki göstermiştir (45,46). Etanercept hem TNFa hem de TNFb (lymphotoxin alpha (LTaJ) hücre yüzeyindeki TNF reseptörlerine bağlanmasını inhibe eder, TNF'yi biyolojik

olarak inaktif hale getirir. Enbrel ile bağlanan TNF komplemanın varlığında da yokluğunda da inaktif hale gelir. Etanercept aynı zamanda TNF tarafından regüle edilen yada uyarılan aralarında lökosit migrasyonuna adezyon molekülünü, sitokinlerin serum düzeyini ve matriks metalloproteinaz -3'ün serum düzeyini ayarlar (46).

### **FARMAKOKİNETİK**

Romatoid Artrit'li 3 hastaya Enbrel 25 mg'ın tek SC injeksiyonundan sonra ortalama yarı ömrü 115 saat (98-300 saat arasında) olarak klirensi 89 ml/saat (52 mL/saat/m<sup>2</sup>) bulunmuş. Maksimum serum konsantrasyonu (Cmax) 1,2 mcg/mL (0,6-1,5 mcg/mL) Cmax a ulaşma süresi 72 (48-96 saat arasında) saptanmıştır. Yapılan çalışmalar ile RA'lı hastaların (n=25) 6 ay boyunca hafta 2 kez Enbrel ile devam eden dozlarından sonra median düzey 3,0 mcg/mL (1.7-5.6 mcg/mL) olarak bulunmuştur. Range temelli mevcut datalara göre hastalarda bireysel olarak tekrarlayan dozlarda serum düzeyinde 2-5 kat artış saptanmıştır. Romatoid artritli hastaların serum konsantrasyonlarında 6 ayı geçen sürede dozun periyodları ölçülmemiştir. Farmakokinetik parametreler kadın ve erkek arasında farklı olmamış, adultlarda yaşla farklılık görülmemiştir. Metotreksat ile kullanımda renal veya hepatik hasarı veya etkileşimi gösteren farmakokinetik çalışmalar yoktur.

Akut pankreatit ve komplikasyonlarının spesifik bir tedavisi henüz geliştirilememiştir ve bu konuda çoğunluğu deneysel olmak üzere çalışmalar devam etmektedir. İnsanlar üzerinde sınırlı şekilde tedavi denemeleri yapılabilmektedir bu nedenle deneysel hayvan çalışmaları bu hastalık için özel bir öneme sahiptir. Bununla beraber tedavi çalışmalarının insanlar üzerinde denenmeden önce hayvanlar üzerinde denenerek herhangi bir yan etkisinin bulunup bulunmadığı da incelenmelidir (47). Bu çalışmanın amacı deneysel olarak oluşturulan pankreatitte Etanercept'in iyileştirici etkisinin değerlendirilmesidir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu (2007/002) tarafından onaylanmış olup, Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Ünitesinde gerçekleştirilmiştir.

### HAYVANLAR

Çalışmada 150–180 gr ağırlığında, 28 adet dişi, Wistar albino rat kullanıldı. Ratlar rasgele 7 hayvandan oluşan 4 gruba ayrıldı. Hayvanlara deney süresince standart rat yemi ve ad libitum olarak su verildi ve ısı kontrollü ortamda bakıldı. Ratlar işlemden önce 24 saat aç bırakıldı.

### DENEY DÜZENİ

Akut pankreatit oluşturmak için pankreatik kanala, retrograd ductal injeksiyon modeline göre % 3 sodyum (Na) taurokolat (0.1ml/100g) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) verildi (48-50).

Rasgele olarak 7 hayvanlık 4 gruba ayrılan hayvanlardan 2' şer deney 2' şer de kontrol grubu oluşturuldu. Deney gruplarına (Grup II ve IV) 1 ml/kg dozda serum fizyolojik içerisinde çözdürülmüş % 3 sodyum taurokolat (Sigma, T-9034) solüsyonuyla akut pankreatit oluşturuldu (51) ve Etanercept ile tedaviye alındı. Gruplar aşağıdaki gibi düzenlendi ve tablo 1'de verildi.

Grup I: Pankreatik kanala % 3 sodyum taurokolat verilerek akut pankreatit oluşturuldu ve 24 saat sonra yüksek doz anestezi ile sakrifiye edildi.

Grup II: Pankreatik kanala % 3 sodyum taurokolat verilerek akut pankreatit oluşturuldu, eş zamanlı olarak 50 mg/kg dozda intraperitoneal (IP) olarak Etanercept (Enbrel®, Wheyt, UK) verildi ve 24 saat sonra yüksek doz anestezi ile sakrifiye edildi.

Grup III: Pankreatik kanala % 3 sodyum taurocholate verilerek akut pankreatit oluşturuldu ve 5 gün sonra yüksek doz anestezi ile sakrifiye edildi.

Grup IV: Pankreatik kanala % 3 sodyum taurokolat verilerek akut pankreatit oluşturuldu, eş zamanlı olarak 50 mg/kg dozda intraperitoneal (IP) olarak Etanercept (Enbrel®, Wyeth, UK) verildi ve 5 gün sonra yüksek doz anestezi ile sakrifiye edildi.

**Tablo 1:** Deney düzenindeki gruplar ve işlemler

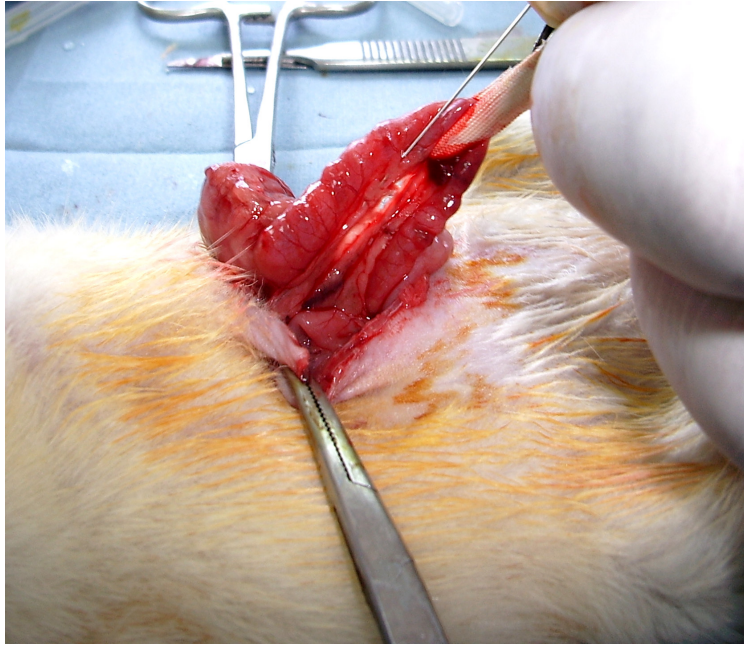
<b>GRUP</b>	<b>YAPILAN İŞLEM</b>
Grup-I	Pankreatit + 24 saat sonra inceleme
Grup-II	Pankreatit + anti-TNF+ 24 saat sonra inceleme
Grup-III	Pankreatit + 5 gün sonra inceleme
Grup-IV	Pankreatit + anti-TNF+ 5 gün sonra inceleme

Bütün ratlara Xylazine Hidroklorid'in (Rhompun®, Bayer, İstanbul) 10 mg/kg ve 50 mg/kg dozda Ketamin (Ketalar®, Eczacıbaşı Warner-Lambert, İstanbul) anestezisi altında steril koşullarda laparotomi uygulandı. Abdomen midline insizyonla açıldı duodenum bulunarak biliopankreatik kanal yoluyla manuplasyon gerçekleştirildi. Bu amaçla duodenum seromusküler tabakası, anti mezenterik bölgede bilier kanal girişinden 2–3 mm uzağından, 27-gouge iğne (introcan-w, Braun; inner diameter 7 mm) ile delindi. Doudenum biliyer kanalın doudenuma perfore olmamasına dikkat edilerek iğne yerleştirildi. Steril % 3 sodyum taurokolat 0,2 ml/kg dozunda infüze edildi ve iğne çekildi. Abdomen steril koşullarda kapatıldı. Ratlara 1 ml/100gr olmak üzere Serum fizyolojik sıvı replasmanı amacıyla verildi. Grup II ve IV'teki hayvanlara ETA uygulandı (Resim 3-5). İlk iki grup 24 saat, son iki grup ise 5 gün izleme alındı, hayvanlara normal yem ve sıvı verilmesine devam edildi. Çalışma sonunda hayvanlardan anestezi altında kardiyak kan örnekleri alındı ve ardından ötenazi edildi. Kan örnekleri 3000 rpm/10 dakika santrifüj edildi ve -20°C'de dondurularak enzim analizleri için saklandı. Otopsi yapılan hayvanlardan patolojik inceleme ve MDA-MPO analizleri için pankreas dokuları alındı. Patolojik inceleme için dokular %10 formaldehid içerisinde tespit edildi. MPO ve MDA analizleri için aynı gün ayrılarak işleme alındı.





**Resim 3.** Koledok kanalı



**Resim 4.** Taurokolat enjeksiyonu



**Resim 5:** Etanercept uygulaması

#### HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Otopsi sırasında alınan pankreas örnekleri %10 formaldehit içerisinde tespit edilerek rutin takip prosedüründen sonra parafine gömüldü. Mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesilen doku örnekleri hematoksin eozin (HE) ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Patolojik bulgular Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında değerlendirildi. Histopatolojik değerlendirmede pankreas lezyonları 0-3 arasında skorlandı. Ödem, kanama, infiltrasyonlar, nekroz, fibrozis ve rejenerasyonlar skorlandı ve hem ayrı ayrı hem de toplanan skora istatistik analizler uygulandı. Histopatolojik bulgular Nikon E-600 model mikrofotografi ataçmanlı mikroskop ile fotoğraflandı.

#### BİYOKİMYASAL İNCELEME

Amilaz ve lipaz ölçümleri Idexx vettest kitleri ile otoanalizörde rat için spesifik kitler kullanılarak kuru yöntemle incelendi.

#### MALONDİALDEHİD ANALİZİ

Pankreas dokularındaki MDA düzeyleri Draper ve Hadley'in çift ısıtma yöntemi ile saptandı (52). Yöntemin temeli, tiobarbituric asidin (TBA) MDA ile

reaksiyonu sırasında oluşan rengin spektrofotometrik ölçümüdür. Bu amaçla her bir santrifüj tüpünde, 0.5 ml süpernatant ile 100g/L trichloroacetic asitten 2.5 ml eklendi ve tüpler 15 dakika süreyle kaynamış su banyosuna konuldu. Tüpler musluk suyunda soğutulduktan sonra, 10 dakika boyunca 1000 g hızda santrifüj edildi. Bir test tüpünde, 2 mL süpernatant 1 mL 6.7 g/L TBA solüsyonuna eklendi ve tüp 15 dakika süreyle kaynamış su banyosuna konuldu. Solüsyon musluk suyunda soğutulduktan sonra 532 nm'de Shimadzu UV-1601 spektrofotometre kullanılarak absorbansı ölçüldü. MDA konsantrasyonu, MDA-TBA kompleksinin ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı (ekstinksiyon katsayısı  $\epsilon = 1.56 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ) ve (nmol/mg protein) olarak ifade edildi.

### MİYELOPEROKSİDAZ AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜ

Dokuda PNL birikiminin hassas bir göstergesi olan miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi, miyeloperoksidazın katalize ettiği,  $\text{H}_2\text{O}_2$  bağımlı tetrametylbenzidine oksidasyonu kullanılarak saptandı (53). Pankreas örnekleri tartıldı ve % 0.5 hexadecyltrimethylammonium bromide (Sigma, USA) ile 9 ml 50mM potasyum fosfat tamponu (pH 6) içine koyuldu. Örnekler, buz banyosunda 20 saniye süreyle homojenize edildi (Ultra-Turrax T25, Almanya). Homojenat 30 saniye süreyle sonike edildi (Bandalin Sonopuls UW 2070, Almanya) ve 4 °C'de, 12000 g hızla, 15 dakika süreyle santrifüj edildi. MPO aktivitesi 460 nm'de absorbansta oluşan değişiklik ölçülerek saptandı. Kullanılan tampon içeriğinde, 50 mM potasyum fosfat, pH 6.0 (50 ml), 0.38 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  (% 0.3 solüsyon; Sigma, USA) vardı. Süpernatant 1:80 (süpernatant:tampon) oranında karıştırıldı. MPO birimi  $\Delta\text{A}/\text{dakika}/\text{g}$  doku olarak ifade edildi.

### İSTATİKSEL İNCELEME

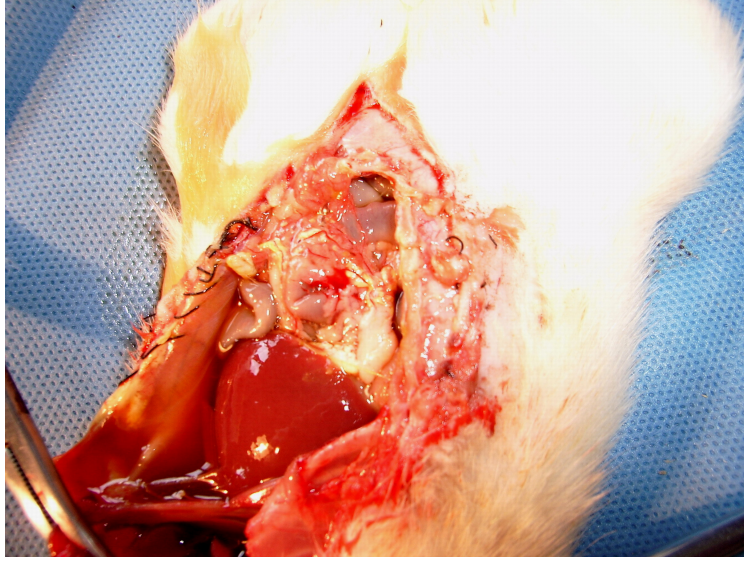
Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 10.0 programı kullanıldı. Kan biyokimyasal analizleri, arasındaki farklar parametrik analizlerle test edildi. İstatistik analizle için One-way Anova ve Duncan testleri kullanıldı. Elde edilen verilere göre gruplar arasındaki farklar tablollaştırıldı ve her parametreye ait farklar grafikler haline getirildi.

## SONUÇLAR

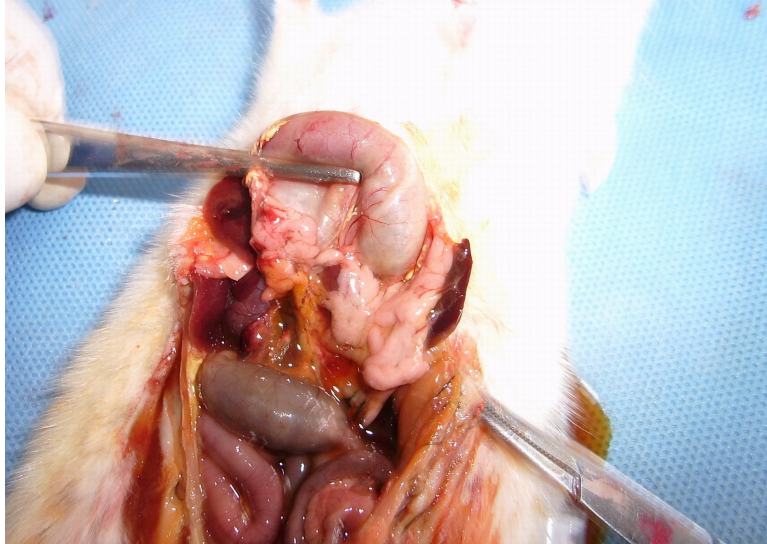
Akut pankreatit oluşturulduktan sonra anesteziden çıkan hayvanların davranışları incelendi. İlk gözlenen klinik semptom tüylerde kabarma ve hareketlerde azalmaydı. Klinik bulgular 12 saat ile 24 saat arasında daha belirgin olarak dikkati çekti. Şiddetli akut pankreatit gelişen hayvanlarda karın bölgesinde asit birikimine bağlı şişkinlikler gözlemlendi. Birikimin fazla olduğu hayvanlarda diyaframa olan basınçtan dolayı solunum güçlüğü semptomları görüldü. Bazı hayvanlarda bu semptomların yavaş yavaş düzeldiği ve 2. günden sonra ortadan kalktığı görüldü. Durumu şiddetlenen ratların ise arka ayakları üzerinde oturur pozisyonda nefes almaya çalıştıkları dikkati çekti. Grup I ve II deki ratların bir çoğunda karın açıldığında pankreas üzerinde beyazımsı renkli küçük nekroz odakları gözlemlendi (Resim 6). Damarlar hiperemik görünümdeydi ve bazı bölgelerde kanamalar gözlemlendi. Tedavi grubunda daha hafif olmak üzere bütün hayvanlarda pankreas ve çevre dokularda ödem görüldü. Hiçbir ratta operasyon ile ilgili komplikasyonlara rastlanmadı. Çalışma süresince grup I ve III'ten birer hayvan pankreatit oluşturulmasından 24 saat sonra şiddetli nekrotizan pankreatit (Resim 7), belirgin retroperitoneal ödem ve hemorajik asit semptomları ile öldü (Resim 8).



**Resim 6.** Akut pankreatit oluşumundan 24 saat sonra sakrifiye edilen kontrol grubundan bir ratın pankreasının görünümü, küçük nekrotik odaklar (ince oklar) ve kanama bölgesi (ok başı).



**Resim 7:** AP oluşumundan 24 saat sonra sakrifiye edilen kontrol grubundan bir ratın pankreasındaki nekrozlar (beyaz b6lgele) ve karın boşluğunda hemorajik asit sıvısı.



**Resim 8:** AP oluşumundan 2 g6n sonra 6len bir ratın karın boşluğunda hemorajik asit sıvısı.

Histopatolojik inceleme için pankreas dokuları daha 6nceki çalışmalardan adapte edilen parametrelere g6re incelendi (54,55). Pankreatitin şiddeti 6dem, kanama, l6kosit infiltrasyonu, parankimal nekroz, yağ nekrozun ve fibrozise g6re skorlandı. Her bir kriter kendi arasında 0-3 arasında değerlendirildi (Tablo-2). 6dem

ve hemoraji lokalize oldukları bölgelere göre intertubular veya interglandular olarak değerlendirildi. Lökosit infiltrasyonu, parankimal nekroz ve fibrosis etkilenen lobül sayısına göre, yağ nekrozu ise peripankreatik dokudaki yoğunluğuna göre skorlandı.

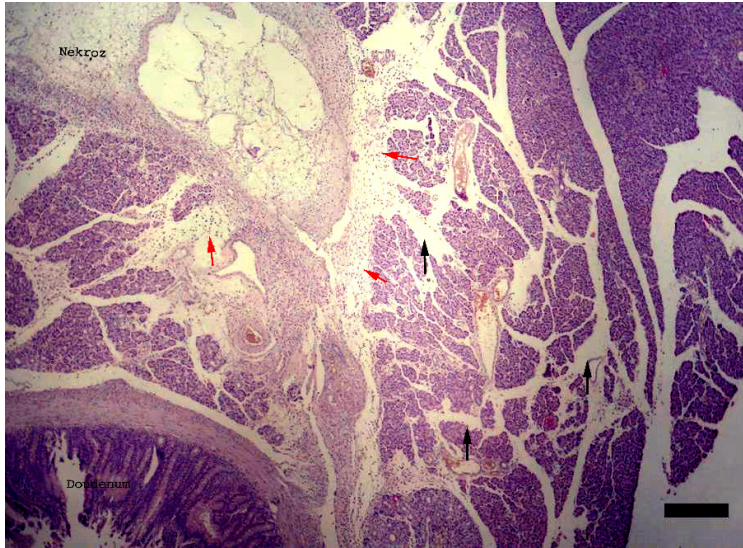
**Tablo- 2:** Histopatolojik lezyon skorları

	0	1	2	3
Ödem	Gözlenmedi	Hafif – interlobüler	Orta şiddette- interglandüler	Şiddetli- interglandüler
Kanama	Gözlenmedi	Hafif	Orta şiddette	Şiddetli
Lökosit infiltrasyonu	Gözlenmedi	Hafif 1-2 lobülde	Orta şiddette 3- 4 lobülde sınırlı	Şiddetli- 4'ten fazla lobülde yaygın
Parankim nekrozu	Gözlenmedi	1-2 lobülde	3-4 lobülde	4'ten fazla lobülde yaygın
Yağ nekrozu	Gözlenmedi	Hafif	Orta şiddette	Şiddetli
Fibrozis	Gözlenmedi	1-2 lobülde	3-4 lobülde sınırlı	4'ten fazla lobülde yaygın

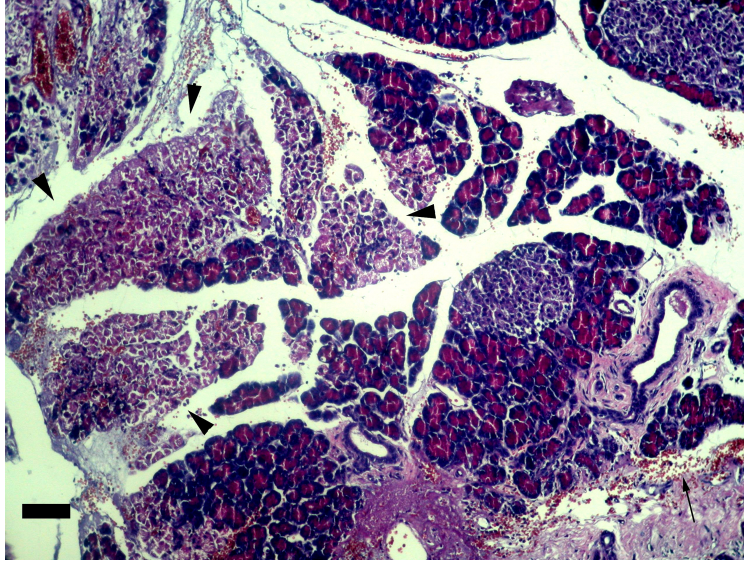
Histopatolojik inceleme sonucunda bütün hayvanlarda pankreatit geliştiği kesin olarak belirlendi ve en sık gözlenen lezyonların kanama ve parankimal nekrozlar olduğu saptandı. Ödem, kanama, nekroz ve lökosit infiltrasyonu grup I ve II'de gözlenen ilk lezyonlardı. Grup III ve IV'teki ratların PNL'lerin yerini lenfositler veya mononükleer hücre infiltrasyonlarının almaya başladığı gözlemlendi. Fibrozis grup I ve II de gözlenmezken grup III ve grup IV'te sıklıkla rastlandı. Histopatolojik lezyonlar ETA verilmeyen kontrol gruplarında (Grup I ve III) bu ilaçla tedavi edilen deney gruplarına (Grup II ve IV) göre daha şiddetliydi. Gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak da önemli bulundu.

Mikroskopik incelemede 24 saat ve 5 gün sonra kurban edilen hayvanlarda akut pankreatitin değişik devrelerinin bulunduğu saptandı. Grup I ve II'deki

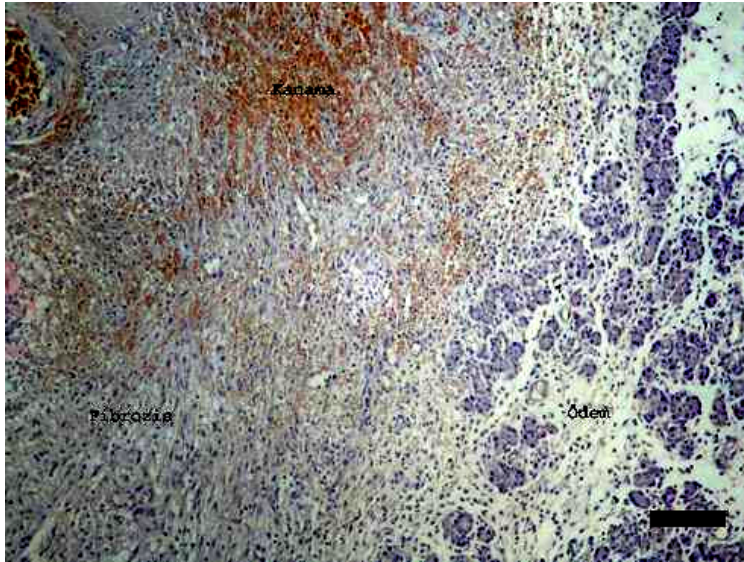
hayvanlarda akut yangısal lezyonlar ön planda iken; grup III ve IV'deki hayvanlarda rejeneratif değişiklikler ve fibrozis ön plana çıkmaya başlamıştı. şiddetli akut pankreatit oluşan ratlarda belirgin ödem, kanama, lökosit infiltrasyonu, şiddetli asiner nekroz (Resim 8-12) ve yağ nekrozu bulguları saptandı. Bu bulgular kontrol gruplarında daha belirgin olarak gözlendi. Grup III ve IV'te yıkılmış asiner hücrelerin bulunduğu alanlarda kanal benzeri yapıların şekillendiği ve bağ doku proliferasyonlarının bulunduğu ve epiteloid hücre, histiyosit, fibrosit, fibroblast artışı ile karakterize erken rejenerasyon bulguları dikkati çekti (Resim 13). Rejeneratif değişiklikler grup III'e kıyasla grup IV'te daha belirgindi. Diffuz vakuoler dejenerasyon grup III'te gözlenen ve grup IV'te ise gözlenmeyen önemli bulgulardanđı. Akut pankreatitin tanısında en önemli bulgu asiner hücrelerin nekroze olarak homojen bir görünüm alması ve yağ nekrozlarıydı.



**Resim 9.** Grup I'deki şiddetli akut pankreatit oluşmuş ratın pankreasının görüntüsü. Yaygın nekroz ve ödem (şiyah oklar). İnflamatuvar hücre infiltrasyonu (kırmızı oklar). HE. Bar= 400µm.

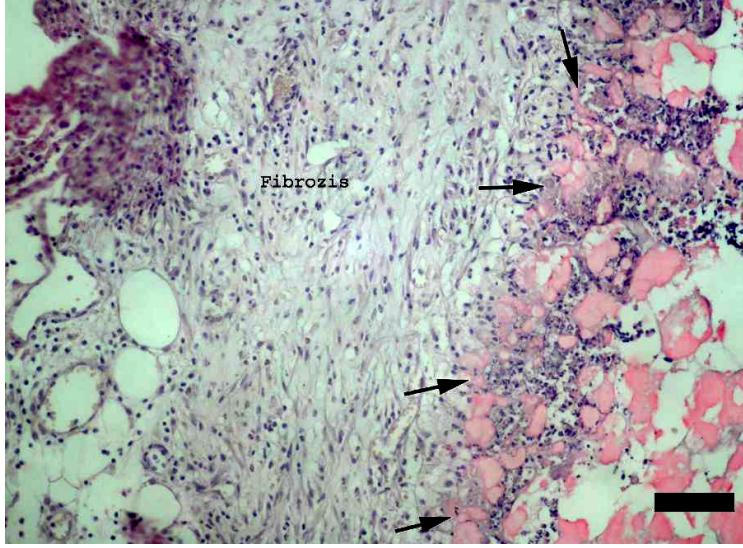


**Resim 10.** Grup II'deki orta şiddetli akut pankreatit oluşmuş bir ratın pankreasının görüntüsü. Nekroz (ok başları ile sınırlı alan), hafif kanama (siyah ok). HE. Bar=100µm.

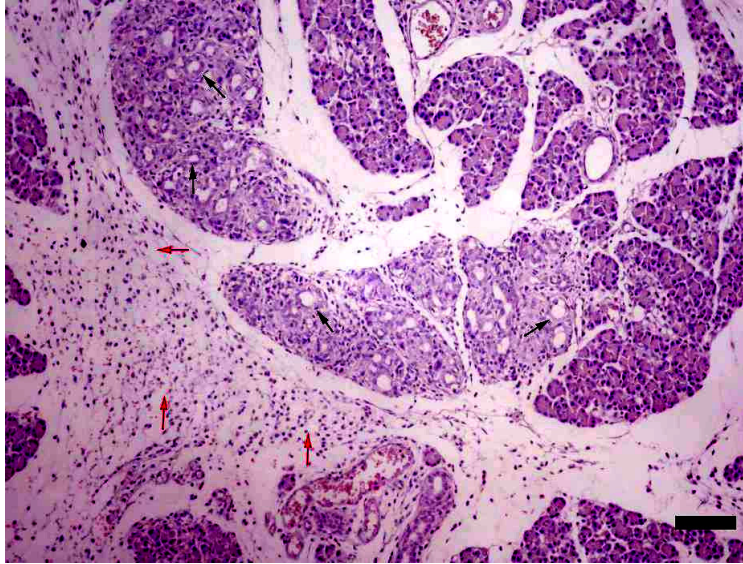


**Resim 11.** Grup III'teki bir ratın pankreasında şiddetli kanama. Ödem ve fibrozis gelişimi. HE. Bar= 200µm.





**Resim 12.** Grup III'teki bir ratta yaygın yağ nekrozu (oklar) ve orta şiddette fibrozis. HE. Bar=100µm.



**Resim 13.** Grup IV'deki pankreas dokusunda kanal oluşumları (siyah oklar). Hafif ödem ve mononükleer hücre infiltrasyonları (kırmızı oklar). HE. Bar=200µm.

Pankreasın histopatolojik yoklaması ETA ile tedavinin akut pankreatit üzerine iyileştirici etkiye sahip olduğunu gösterdi. Gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak da önemli bulundu (Tablo-3). Çalışmada ETA'nın iyileştirici etkisi ödem ve fibrozis ( $p<0.001$ ), hemoraji ( $p<0.01$ ), parankim nekrozu ve inflamasyon ( $p<0.05$ ) gibi kriterlerde daha belirgin olarak gözlemlendi.

**Tablo- 3:** Histopatolojik kriterlerin gruplara göre dağılımı

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	P değeri
Ödem	1.42±0.20 <sup>a</sup>	0.85±0.14 <sup>ab</sup>	0.42±0.20 <sup>bc</sup>	0.28±0.18 <sup>c</sup>	p<0.001
Hemoraji	1.28±0.18 <sup>a</sup>	0.71±0.18 <sup>ab</sup>	0.85±0.14 <sup>ab</sup>	0.42±0.53 <sup>b</sup>	p<0.01
Parankim nekrozu	1.42±.20 <sup>a</sup>	0.50±0.22 <sup>b</sup>	0.85±0.14 <sup>ac</sup>	0.85±0.14 <sup>bc</sup>	p<0.05
İnflamasyon	0.85±0.14 <sup>ab</sup>	0.42±0.20 <sup>a</sup>	1.33±0.21 <sup>b</sup>	0.85±0.14 <sup>ab</sup>	p<0.05
Yağ nekrozu	0.28±0.18 <sup>a</sup>	0.14±0.14 <sup>a</sup>	1.00±0.36 <sup>b</sup>	0.71±0.26 <sup>ab</sup>	p>0.05
Fibrozis	00±00 <sup>a</sup>	00±00 <sup>a</sup>	1.00±0.21 <sup>b</sup>	0.51±0.20 <sup>b</sup>	p<0.001

<sup>a,b,c</sup>: Gruplar arasındaki ortalama değerlerin önemli derecede farklı olduğunu belirtmektedir, (p<0.001, p<0.01 ve p<0.05 önemli, p>0.05 önemsiz).

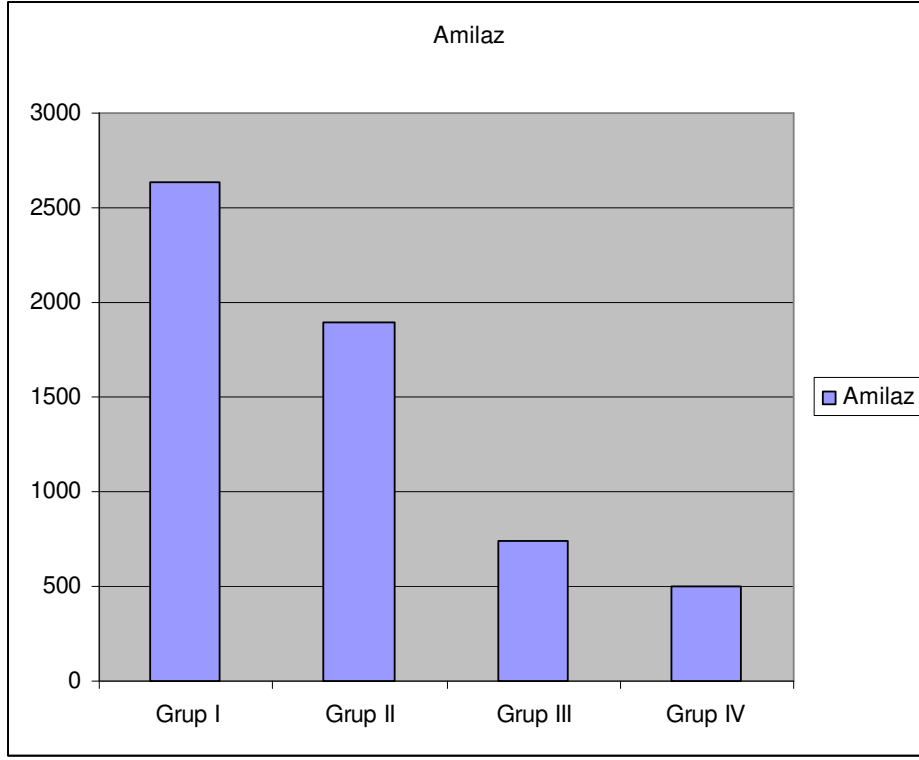
Akut pankreatit oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen hem ETA ile tedavi edilen hem de edilmeyen grupta laboratuvarın normal değerleriyle karşılaştırıldığında hiperamilazemi saptandı. Ancak tedavi grubunda değerler daha düşük bulundu. Çalışmada 5. günde sakrifiye edilen ratlarda değerler genellikle normal sınırlar içinde saptandı ancak ETA verilen grupta kontrol grubuna göre değerler daha düşüktü.

Pankreas dokusunda MDA ve MPO düzeyleri kontrol gruplarında tedavi gruplarına göre 24 saat sonra sakrifiye edilen grupta daha yüksek bulundu. Benzeri bulgular 5 gün sonra sakrifiye edilen grupta da saptandı; ancak değerler de normale dönmeye başlamıştı. Gruplar arasındaki farkların amilaz, lipaz, MPO, MDA ve toplu histopatolojik incelemelere göre yapılan istatistik analizi Tablo 4'te verilmiş ve grafiklerde gösterilmiştir.

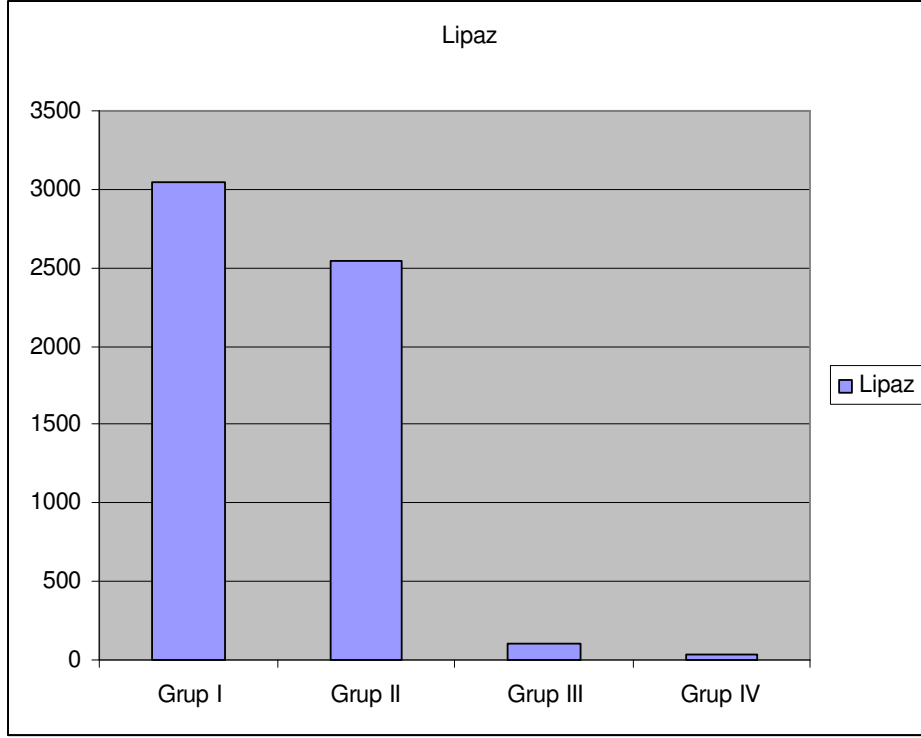
**Tablo-4 :** Biyokimyasal ve histopatolojik bulguların istatistik analiz sonuçları

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	P değerleri
Amilaz	2636.16 <sup>a</sup> ±191.94	1898.71 <sup>b</sup> ±262.53	738.67 <sup>c</sup> ±48.60	497.14 <sup>c</sup> ±47.25	p<0.001
Lipaz	3049.67 <sup>a</sup> ±972.65	2538.85 <sup>a</sup> ±660.45	101.33 <sup>b</sup> ±39.32	34.57 <sup>b</sup> ±7.29	p<0.01
MPO	0.64 <sup>a</sup> ±0.15	0.59 <sup>a</sup> ±0.13	0.10 <sup>b</sup> ±0.06	0.06 <sup>b</sup> ±0.04	p<0.01
MDA	105.77 <sup>a</sup> ±13.29	92.89 <sup>ab</sup> ±10.39	67.91 <sup>bc</sup> ±4.28	60.91 <sup>c</sup> ±3.57	p<0.05
Histopatoloji	5.43 <sup>a</sup> ±0.43	2.57 <sup>b</sup> ±0.20	5.43 <sup>a</sup> ±0.43	3.71 <sup>b</sup> ±0.68	p<0.001

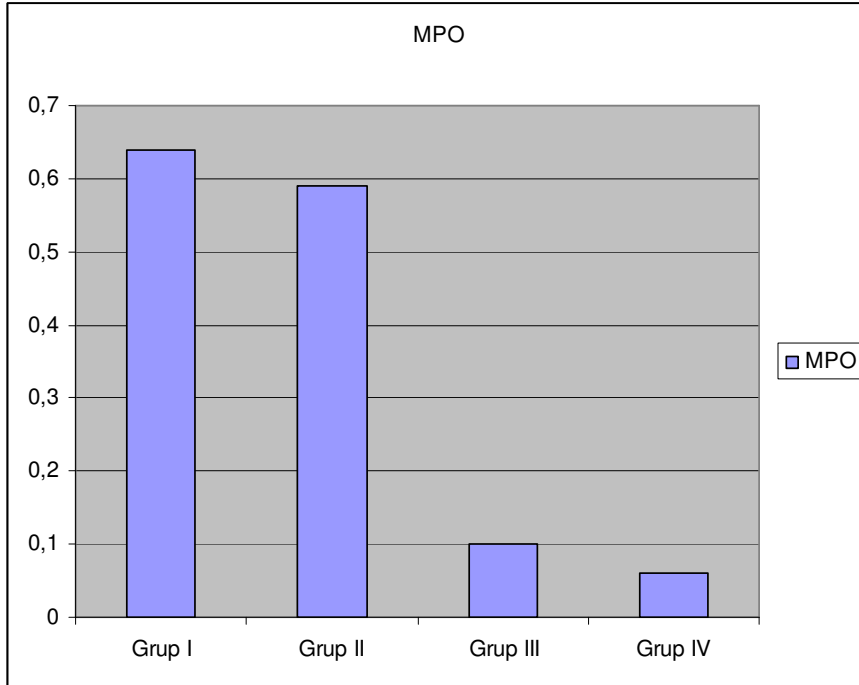
a, b, c : Ortalama değerlerin gruplar arasında önemli derecede farklı olduğunu belirtmektedir. , ( $p<0.001$ ,  $p<0.01$  ve  $p<0.05$  önemli,)



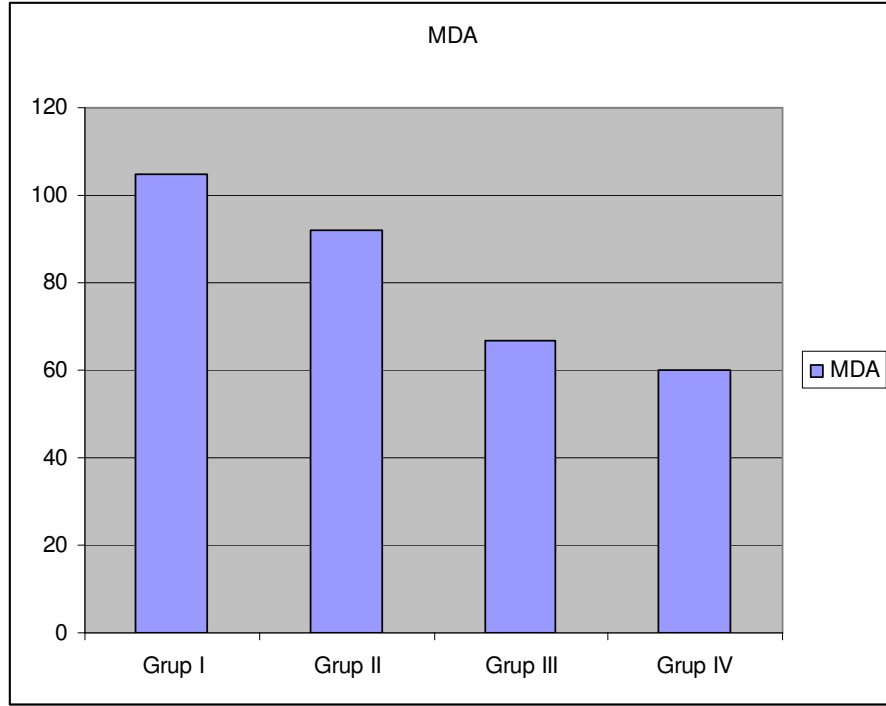
**Grafik 1.** Serum amilaz düzeylerinin grup ortalamalarına göre grafiği



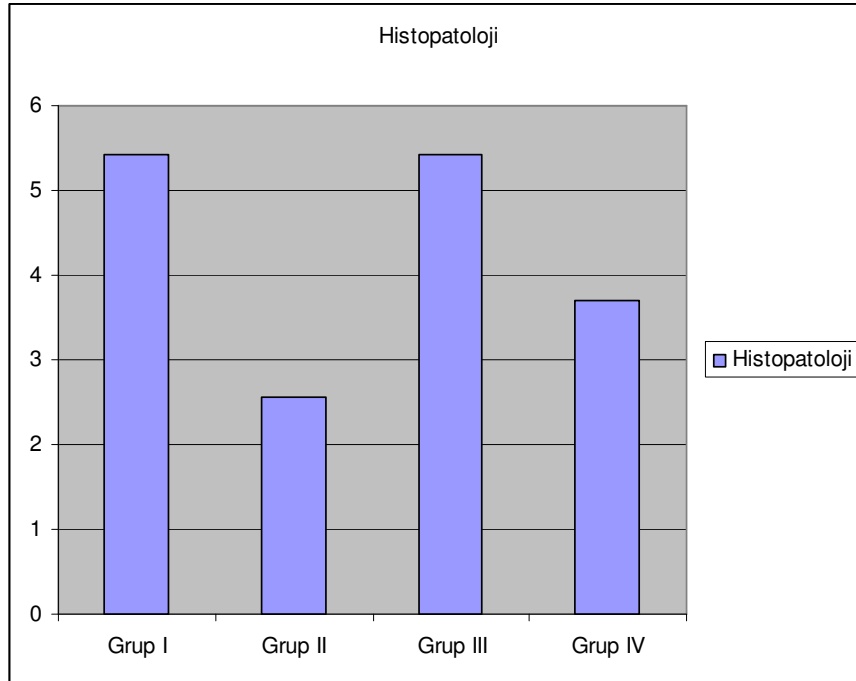
**Grafik 2.** Serum lipaz düzeylerinin grup ortalamalarına göre grafiği



**Grafik 3.** Pankreatik doku MPO düzeylerinin grup ortalamalarına göre grafiği



**Grafik 4.** Pankreatik doku MDA düzeylerinin grup ortalamalarına göre grafiği



**Grafik 5.** Histopatolojik skorların grup ortalamalarına göre grafiği.

## TARTIŞMA

Akut pankreatit, pankreasın iltihabi ve enzimatik nekrozu sonucu ortaya çıkan, akut karın ağrısı ile karakterize bir hastalıktır. Halen hastalığın etiyolojisi kesin olarak bilinmemektedir. Hastalık patogeneğinde pankreasın asiner hücre harabiyeti ya da duktal obstrüksiyona bağlı safra reflüsü üzerinde durulmaktadır. Patogenetik mekanizma ne olursa olsun sonuçta hastalarda pankreas otodigestyonu ve pankreas hasarı oluşmaktadır. Genellikle AP kendini sınırlayan bir hastalıktır. Hastaların % 15-20'sinde hastalık kötü prognozlidir; lokal komplikasyonlar, organ yetmezliği ve ağır AP meydana gelir. Prognoz pankreatik yıkımın şiddeti ile respiratuar, kardiovasküler ve hepatik disfonksiyonlar gibi ekstrapankreatik lezyonlara bağlı olarak değişebilmekte ve bunlar hastalığın morbidite ve mortalitesini önemli ölçüde etkilemektedir (56).

Akut pankreatit, patolojik görünümüne göre, akut ödematöz pankreatit ve akut nekrotizan pankreatit olarak sınıflandırılmaktadır. Akut pankreatit tanısında en karakteristik lezyon parankim ve yağ nekrozudur. Ödematöz pankreatitte ise yağ nekrozu fazla değildir ve intraparakimal nekroz görülmez. Akut nekrotizan pankreatitte yağ nekrozu daha yaygındır ve şiddetli intraparakimal nekroz saptanır (57). Bu çalışmada deneysel modelde sodyum taurokolat kullanılarak nekrotizan pankreatit oluşturuldu. Ratlardan elde edilen pankreas doku örnekleri histopatolojik incelemeye alındı. Mikroskopik incelemede pankreas lezyonları; ödem, kanama, infiltrasyonlar, nekroz, fibrozis ve rejenerasyonlara göre değerlendirildi, skorlandı ve gerek tek tek lezyonlara göre gerekse toplanan skorlara göre istatistik analizler uygulandı. Histopatolojik inceleme sonucunda bütün hayvanlarda pankreatit geliştiği kesin olarak belirlendi ve en sık gözlenen lezyonların kanama, parankimal nekroz ve yağ nekrozu olduğu saptandı. Pankreatit oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen kontrol grubundaki ratlarda, deney grubundakine göre daha belirgin olmak üzere orta şiddette ödem, kanama, nekroz ve lökosit infiltrasyonu saptandı. Deneyin başlangıcından 5 gün sonra sakrifiye edilen gruplarda ise parankim hücrelerinde nekroz ve yağ doku nekrozu ile karakterize şiddetli pankreatit bulguları saptandı. Kontrol grubundaki ratlardaki patolojik bulgular ile deney grubundaki ratların bulguları karşılaştırıldığında kontrol grubunda daha şiddetli lezyonlar saptandı.

Parankim hücrelerinde dejeneratif değişikliklerin göstergesi olan vakuolizasyonlara sadece grup III'te rastlanması ETA'nın koruyucu etkisine yorumlandı. İlk 24 saatte şekillenen lezyonlarda akut yangısal reaksiyon için tipik olan hiperemi, ödem ve PNL infiltrasyonları belirgin iken, 5 gün sonra şekillenen lezyonlarda rejeneratif değişiklikler, fibrozis ve lenfositler seriden hücre infiltrasyonları belirginleşmeye başladı. Tüm gruplar arasında histopatolojik lezyonların önemli farklar gösterdiği saptandı. Bu farkların istatistik analizinde yağ nekrozu dışındaki ( $p>0.05$ ) bulgularda gruplar arasında saptanan farkların istatistiksel olarak önemli olduğu ve sırasıyla en fazla ödem ve fibrozis parametrelerinde ( $p<0.001$ ), daha sonra hemorajide ( $p<0.01$ ) ve parankim nekrozu ile inflamasyonda ( $p<0.05$ ) önemli farklar bulunduğu saptandı. Literatür incelendiğinde daha önce Hughes ve arkadaşlarının TNF poliklonal antikoru kullanarak benzer bir çalışma yaptıkları ve çalışmalarında benzer şekilde taurokolatla deneysel pankreatit modeli oluşturdukları görüldü. Araştırmacılar pankreatit indüksiyonundan 15 dakika önce intravenöz TNF poliklonal antikoru vererek, 72 saat sonra sakrifiye edilen ratların pankreas ve akciğer dokusunu patolojik olarak incelediklerini bildirmişlerdir. Gross patolojik skorlama kullanılarak ödem, hemoraji, yağ nekrozu, akciğer konjesyonu, akciğer hemorajisi ve asit incelenmiş tüm parametrelerde tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklar saptadıklarını belirtmişlerdir. Çalışmalarında ayrıca pankreasın histopatolojik skorlaması; ödem, vasküler değişiklik, inflamasyon, kalsifikasyon, yağ nekrozu kriterlerine göre yapılmış, bunlar arasında vasküler değişiklik ve inflamasyonda istatistiksel olarak anlamlı farklar saptadıklarını bildirmişlerdir (58). Oruç grubunun yaptığı çalışmayla 2004 yılında ilk kez akut ödematöz ve nekrotizan pankreatitte, TNF- $\alpha$  rekombinant soluble antikoru olan infliximab tedavisi denenmiştir. TNF- $\alpha$ 'nın hücre membranına bağlanmasına engel olan İnfliximab'la yapılan çalışmalarla bu ajanın nitrit ve TNF konsantrasyonunu azalttığı ve akut inflamasyon etkilerini azalttığı gösterilmiştir. Çalışmalarında İnfliximab tedavisi pankreatit indüksiyonu ile birlikte verilmiş ve ayrıca TNF maksimum konsantrasyonu pankreatit indüksiyonu sonrası 1-3 saatte tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda İnfliximab'ın deneysel akut ödematöz pankreatitte özellikle PNL aktivasyonunu bloke ederek antioksidan olarak rol aldığı, pankreatik ödemde etkili olmadığı gösterilmiştir. İlacın nekrotizan pankreatitte parankimal ve yağ nekrozunda anlamlı azalmaya sebep olurken pankreatik ödem, nötrofil aktivitesi, mortalite oranlarında farklılık oluşturmadığı

bildirilmiştir (12). Bizim yaptığımız bu deneysel çalışmada TNFR antikoru ETA kullanıldı. Bu ilaç spesifik olarak TNF ve onun hücre yüzeyindeki TNF reseptörlerine etkisini bloke ederek fonksiyon gösterir. Çalışmamızda ETA pankreatit indüksiyonu ile birlikte uygulandı ve uzun yarı ömrü sebebiyle 1 ve 5. gündeki etkileri incelendi. İlaçın uygulanan gruplarda, AP oluşumu ve şiddetini azalttığı ve iyileşmeyi hızlandırdığı saptandı. Etanercept'in serum amilaz, lipaz değerleri ile pankreatik doku MPO ve MDA değerlerinde ve en önemlisi pankreatik doku histopatolojik bulgularında kontrol gruplarına göre önemli ölçüde iyileşmeler oluşturduğu gözlemlendi. Bulguların istatistiksel incelemesinde gruplar arasındaki farkların sırasıyla amilaz değerleri ve histopatolojik bulgularda ( $p<0.001$ ), lipaz ve MPO değerlerinde ( $p<0.01$ ) ve MDA değerlerinde önemli olduğu görüldü. Çalışmamızda ETA sebebiyle oluşturulan TNF inaktivasyonunun pankreasta oluşan hem parankimal hem de yağ nekrozu boyutlarında azalmaya sebep olduğu, dolayısıyla nekrotik kitlelere olan PNL infiltrasyonunu azalttığı saptandı. Bu durumun da yangısal reaksiyon sonucu salınan serbest radikallerin miktarını azalttığı ve bu sebeple hücre harabiyetini önlediği düşünüldü. Dokudaki nekroz oranı azaldıkça iyileşme daha hızlı şekillenmekte olup inflamatuvar olaylarda nekrozu minimumda tutmak aynı zamanda iyileşmeyi de aktive etmektedir. Çalışmamızda ETA'nın nekrozu azaltıcı etkisi özellikle ilk 24 saat içinde sakrifiye edilen ratlarda belirgin şekilde gözlenmiş ve ilaç uygulanan grup ile uygulanmayan grup arasındaki fark istatistiksel olarak da önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

Serum amilaz aktivitesinin ölçümü AP tanısında halen primer laboratuvar metodudur (59). Hastalığın başlangıcında serum amilaz konsantrasyonu saatler içinde yükselir, birkaç gün içerisinde yavaş yavaş düşmeye başlar ve normale döner (60). Amilazın pankreatitli hastaların çoğunda başlangıçta yükselerek 7-10 gün süreyle yüksek kalır. Zirve değerine 12-72 saat arasında ulaşır. Hassasiyet % 75-92 ve özgünlüğü % 20-60'dır. Amilaz erken dönemde normale dönmesi, hastalığın düzelmekte olduğunu gösterebileceği gibi ağır pankreas hasarının belirtisi de olabilir (53,55,59). Akut pankreatit tanısında kullanılan diğer bir enzim olan lipaz için sensitivite %74-100, spesifite %34-100 arasında değişir (59). Yaptığımız bu çalışmada deneysel akut nekrotizan pankreatit oluşturulduktan sonra serum amilaz-lipaz düzeylerinin ilk 24 saat içinde önemli derecede yükseldiği ve daha sonra



düşerek 5 gün sonra normal sınırlara döndüğü gözlemlendi. Çalışmada, 24 saat sonra sakrifiye edilen ratlarda saptanan yüksek serum lipaz ve amilaz düzeyleri akut inflamatuvar ve nekrotik değişiklikler sebebiyle parçalanan hücrelerden açığa çıkan ve kana karışan enzim düzeyleriyle dolayısıyla aşırı parankimal nekroz ile ilişkili bulundu. Bu devrede pankreatik enzimlerin hücre dışına çıkması çevrede bulunan normal hücrelerinde harabiyetine ve dolayısıyla onların içinde bulunan enzimlerin de salınarak başka hücrelere zarar vermesiyle sonuçlandığı düşünüldü. Çalışmada 5. günde sakrifiye edilen hayvanlarda normale yakın saptanan amilaz, lipaz değerleri ise iyileşmenin başlamasına ve parankim nekrozunun azalmasına yorumlandı. Hughes ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tedavi gruplarında amilaz düzeyleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadığı bildirilmiştir. Oruç grubunun yaptığı çalışmada ise İnfliximab tedavisi verilen nekrotizan pankreatit grubunda amilazda istatistiksel olarak önemli azalma saptandığı belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda 5. günde saptanan normale yakın değerler kontrol grubu ile ETA verilen grup karşılaştırıldığında tedavi edilen grupta daha düşük bulunmuştur. Bu da ETA'nın AP tedavisinde önemli düzeyde etkili olduğunu gösteren bir başka bulgu olarak değerlendirilmektedir.

Günümüzde akut pankreatitin patogeneğinde inflamatuvar mediatörlerin aşırı salınımına bağlı lokal ya da sistemik inflamatuvar reaksiyonlar suçlanmaktadır (61). Pankreasta hasar oluştuğunda, anormal aktive olan pankreasın içinde ya da dışındaki inflamatuvar hücreleri uyararak inflamatuvar mediatörlerin salınımına neden olduğu ve sonunda SIRS ve MOY gelişimi ile sonuçlandığı kabul edilmektedir (62). Akut pankreatitte rol oynadığı düşünülen sitokinler, interlökin-1 (IL-1) ve TNF- $\alpha$  dır. Ayrıca IL-2, IL-6, IL-10, NO (nitrik oksit) ve serbest radikaller, hastalığın ilerlemesinde ve şiddetinde önemli rol oynarlar. IL-1 ve TNF- $\alpha$  infeksiyon ve inflamasyona ilk cevap olarak ortaya çıkar. Akut pankreatitte görülen ateş, hipotansiyon, yaygın damar içi pıhtılaşma, şok gibi lokal ve sistemik bir çok bulgudan sorumludurlar. Bu lökosit ürünleri damar duvarına doğrudan etki ederek damar duvarı geçirgenliğini artırıp ödem ve trombüs oluşumuna yol açarlar. Bu durum da pankreas mikrosirkülasyonunu bozar. Deneysel çalışmalarda pankreatitte sitokinlerin etkinliğinin azaltılması veya oluşumunun engellenmesi ile uzak organ işlev bozukluğunun azaldığı bildirilmiştir (2). Grewal ve arkadaşlarının yaptığı bir

çalışmada anti-TNF poliklonal antikoru kullanılarak tedavinin fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklere etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda serum TNF alfa, amilaz, kalsiyum, hemotokrit, glukoz, ve asit volümü incelenmiş ve bu parametrelerde tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandığı bildirilmiştir (63). Daha sonra bu çalışmayı desteklemek amacıyla yapılan ikinci çalışmada Hughes ve arkadaşları deneysel pankreatit modelinde TNF-alfa monoklonal antikoru kullanılarak mortalite ve morbiditede anlamlı azalma sağlandığını bildirmişlerdir (64). Norman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise TNF antagonizmasının süresi irdelenmiş pankreatit erken döneminde yapılan blokajın profilaktik blokajdan daha etkili olduğu bildirilmiştir (65). Bizim çalışmamızda da ETA'nın AP'nin şiddetinde azalmaya sebep olması yanı sıra iyileşmeyi de hızlandırdığı görüldü.

Kalsiyum erken AP olaylarında önemli rol oynamaktadır. Pankreatit oluşturulan olaylarda intraselüler kalsiyum artışı asiner hücrelerde kalsiyum uyarılarını bozar. Asiner hücre vakuolizasyonları ve intraselüler tripsinojen aktivasyonuna sebep olur (66). Bu çalışmada asiner hücre vakuolizasyonları sadece tedavi uygulanmayan ve 5. günde sakrifiye edilen ratlarda gözlemlendi. Bu bulgu da ETA'nın asiner hücre vakuolizasyon ve dejenerasyonlarının önlenmesinde etkili olduğunu gösterdi. Elde edilen bu parametrelerin histopatolojik bulgularla karşılaştırılmasında doku yıkımı ile serum enzim düzeyleri ve doku MPO-MDA düzeyleri arasında paralellik bulunduğu gözlemlendi. Pankreatik dokuda rejenerasyonun başlamasının kan ve doku parametrelerinin de normale dönmesini sağladığı saptandı.

Yapılan çalışmalarda IL-1beta, IL-6, ve TNF- $\alpha$ 'nın AP'li hastaların sitokin düzeyinin hastalığın şiddeti ve morbidite ile korele olduğu gösterilmiştir (67). Bu mediatörlerin aktivasyonu Nükleer faktör- $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) aracılığı ile olmaktadır. Bu DNA bağlayıcı proteindir ve sitokin ve adezyon moleküllerinin gen ekspresyonunu ayarlayarak çeşitli şekillerde inflamatuvar ve immun yanıtta rol almaktadır (68). Mekanizma olarak TNF'ye bağlı sitotoksikite p55 reseptörü; TNF'ye bağlı proliferasyon ise p75 aracılığı ile olmaktadır (69). Aktive PNL'lerden salınan inflamatuvar mediatörlerin komplikasyonların gelişiminde predominant rol oynadığı kabul edilmektedir (70). Buna dayanarak tedavideki temel yaklaşımlardan biri de

inflamatuvar mediatörleri baskılamak olmalıdır (71). Çalışmamız TNF'nin bloke edilmesinin akut pankreas hasarının azaltılmasında önemli olduğunu göstermiştir.

Yapılan çalışmalarda, deneysel pankreatitlerin erken basamağında oksijen radikallerinin etkisi olduğu gösterilmiştir. Oksijen radikalleri, hücre membranındaki fosfolipidlerle direk reaksiyona girerek membranda lipid peroksidasyonuna ve sonuçta irreversibl hücre hasarına neden olmaktadır (72). İndirek yoldan ise PNL'leri uyararak bunlardan salınan maddeler sebebiyle hücre hasarına neden olmaktadır (73). MDA, oksidatif stress sonucu gelişen lipidlerin peroksidasyon hasarının son ürünü olduğu için hücre zedelenmelerinde önemli bir belirteç olarak kabul edilmektedir. Wisner ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada seruleinle oluşturulan pankreatit indüksiyonundan 30 dakika sonra MDA düzeyinde hafif bir artış 3,5 saatte ise en yüksek doku konsantrasyonuna ulaşmıştır. Bu sürede pankreatik glandlarda orta düzeyde pankreatit histolojik bulguları saptanmış ve bu bulgular serbest radikallerin ağır organ hasarı öncesi dokuda lipid peroksidasyonunu artırmasına bağlanmıştır (74). Daha önce yapılan çalışmalarda pankreatit gruplarında antioksidan tedavilerle pankreatik gland hasarında ve enzim düzeylerinde anlamlı azalma sağlanmıştır (75). Yaptığımız bu deneysel çalışmada serum MDA ve MPO düzeyleri ETA ile tedavi edilen ve 24 saat sonra sakrifiye edilen grup II ile tedaviden 5 gün sonra sakrifiye edilen grup IV'deki ratlarda tedavi uygulanmayan gruptakilere göre (grup I ve III) önemli derecede düşük düzeyde saptanmıştır. MDA'daki bu düşüş sebebiyle, bu çalışma göstermiştir ki ETA, lipid peroksidasyonunun önlenmesinde de etkili bir ilaçtır.

İnsanlarda AP oldukça ciddi ve ölümlü sonuçlanabilen bir hastalıktır. Akut pankreatit klinik bulgulara göre hafif, orta, ağır, patolojik görünümüne göre akut ödematöz ve akut nekrotizan pankreatit olarak sınıflandırılır. Akut pankreatit genellikle kendini sınırlayan bir hastalık olmakla birlikte % 15-20 hastada ciddi seyrederek lokal ve sistemik komplikasyonlara yol açabilmektedir. Prognoz pankreatik yıkımın şiddeti ile respiratuvar, kardiovasküler ve hepatik disfonksiyonlar gibi ekstrapankreatik komplikasyonlara bağlı olarak değişebilmekte; bunlar hastalığın morbidite ve mortalitesini önemli ölçüde etkilemektedir (56). Bu nedenle hastalığın erken tanısı ve uygun ilaçlarla tedavi gerekmektedir. Hastalığın

tedavisinde çeşitli ilaçlar kullanılmasına rağmen kesin etkili ilaç hala bulunamamıştır. Çalışmamız AP'de amilaz aktivitesindeki artışın erken bulgular arasında ve en önemli klinik bulgu olduğunu desteklemiştir. Ancak 5. günden sonra bu enzim aktivitesinin normale dönmesi erken dönemin atlandığı vakalarda yanlış teşhise sebep olabileceği göz önünde tutulmalıdır. Bu devrelerde lipaz aktivitesi teşhise yardımcı kriter olarak değerlendirilebilir. Yapılan çalışmalar TNF inhibisyonunun yangısal reaksiyonun hafiflemesini sağladığını göstermektedir. Pankreas gibi digestiv enzimlere sahip olan bir organda yangısal reaksiyonun azaltılması nekrozun ve hücre harabiyetinin azalmasında oldukça önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda ETA'nın AP üzerine etkisi deneysel rat modelinde incelenmiş ve gerek doku hasarının azaltılmasında, gerek serum enzim aktivitelerinin düzeltilmesinde gerekse lipid peroksidasyonunun azaltılmasında ETA'nın AP üzerinde iyileştirici etkisi olduğu saptanmıştır. Çalışmada elde edilen histopatolojik skorlar, serum amilaz ve lipaz değerleri ile pankreatik doku MPO ve MDA değerlerinin istatistik incelemesinde ETA ile tedavi edilen gruplar ile kontrol grupları arasında önemli farklar bulunmuştur. Bu çalışma ile ETA'nın AP tedavisinde ve doku hasarının önlenmesinde oldukça etkili olduğu gözlenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Kingsnorth A. Role of cytokines and their inhibitors in acute pancreatitis. *Gut* 1997; 40: 1–4.
2. Formela LJ, Galloway SW, Kingsnorth AN. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1995; 82: 6–13.
3. Frossard JL, Hadengue A, Pastor CM. New serum markers for the detection of severe acute pancreatitis in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 162–170.
4. Viedma JA, Perez-Mateo M, Dominguez JE, Carballo F. Role of interleukin-6 in acute pancreatitis comparison with C-reactive protein and phospholipase A. *Gut* 1992; 33: 1264–1267.
5. Heath DI, Cruickshank A, Gudgeon M, Jehanli A, Shenkin A, Imrie CW. Role of interleukin-6 in mediating the acute phase protein response and potential as an early means of severity assessment in acute pancreatitis. *Gut* 1993; 34: 41–45.
6. Sameshima H, Ikei S, Mori K, Yamaguchi Y, Egami H, Misumi M. The role of tumor necrosis factor-alpha in the aggravation of cerulein-induced pancreatitis in rats. *Int J Pancreatol* 1993; 14: 107–115.
7. McKay CJ, Gallagher G, Brooks B, Imrie CW, Baxter JN. Increased monocyte cytokine production in association with systemic complications in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1996; 83: 919–923.
8. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor and regulation of metabolism in infection: role of systemic versus tissue levels. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; 200: 233–239.
9. Zamir O, Hasselgren PO, Kunkel SL, Frederick J, Higashiguchi T, Fischer JE. Evidence that tumor necrosis factor participates in the regulation of muscle proteolysis during sepsis. *Arch Surg* 1992; 127: 170–174.

10. Schirmer WJ, Schirmer JM, Fry DE. Recombinant human tumor necrosis factor produces hemodynamic changes characteristic of sepsis and endotoxemia. *Arch Surg* 1989; 124: 445–448.
11. Kishimoto T, Taga T, Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell* 1994; 76: 253–62.
12. Oruc N, Ozutemiz O. Infliximab: A new therapeutic agent in acute pancreatitis? *Pancreas* 2004; 28: 1-5.
13. Putz R, Pabst R. Atlas der Anatomie des menschen/Sobotta. Munchen; Wien, Baltimore, 1993.
14. Snell R. Clinical Anatomy. 4th ed. Boston: Little Brown; 1992.
15. Guyton AC. Textbook of Medical Physiology. 6th ed. London: W.B. Saunders Company; 1981
16. Ozmen O, Topsakal S, Sahinduran S, Ozcelik M. Effects of insufficient insulin treatment in Streptozotocin induced Diabetes Mellitus. *Pancreas* 2007; 34: 354-358.
17. Banks PA. Acute pancreatitis: Medical and surgical management. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 78–85.
18. Yousaf M, McCallion K, Diamond T. Management of severe acute pancreatitis. *Br J Surg* 2003; 90: 407–420.
19. Rinderknecht H. Fatal pancreatitis a consequence of excessive leukocyte stimulation? *Int J Pancreatol* 1988; 3: 105–112
20. Hohmann H, Remy R, Brockhaus M, van Loon AP. Two different cell types have different major receptors for human tumour necrosis factor (TNFalpha). *J Biol Chem* 1989; 264: 14927–14934.
21. Loetscher H, Pan Y-CE, Lahm H-W, Tabuchi H, Lesslauer W. Molecular cloning and expression of the 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1990; 61: 351–359.
22. Spinass G, Keller U, Brockhouse M. Release of soluble receptors for tumour necrosis factor (TNF) in relation to circulating TNF during experimental endotoxaemia. *J Clin Invest* 1992; 90: 533–536.
23. Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilisation of the bioactivity of tumour necrosis factor by insoluble receptors. *J Exp Med* 1992; 175: 323–329.

24. Porteu F, Nathan C. Shedding of tumour necrosis factor receptors by activated human and neutrophils. *J Exp Med* 1990; 172: 599–607
25. Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. *Crit Care Med* 1993; 21: 447–463.
26. Norman JG, Fink GW, Franz MG. Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. *Arch Surg* 1995; 130: 966–970.
27. Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V Song M, Sandoval D, Gukovsky S, Pandol SJ. Pancreatic acinar cells produce, release and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest* 1997; 100: 1853–1862.
28. Hughes CB, Gaber LW, Kotb M, Mohey el-Din AB, Pabst M, Gaber AO. Induction of acute pancreatitis in germ-free rats: evidence of a primary role for tumor necrosis factor-alpha. *Surgery* 1995; 117: 201–205.
29. Hughes CB, Henry J, Kotb M, Lobashevsky A, Sabek O, Gaber AO. Up-regulation of TNF alpha mRNA in the rat spleen following induction of acute pancreatitis. *J Surg Res* 1995b ;59: 687–693.
30. Grewal HP, Kotb M, el Din AM, Ohman M, Salem A, Gaber L, Gaber AO. Induction of tumour necrosis factor in severe acute pancreatitis and its subsequent reduction after hepatic passage. *Surgery* 1994; 115: 213–221.
31. Beaux AC, Goldie AS, Ross JA, Carter DC, Fearon KC. Serum concentrations of inflammatory mediators related to organ failure in patients with acute pancreatitis. *Brit J Surg* 1996; 83: 349–353.
32. Southorn PA Free radicals in medicine. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 381-389.
33. Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 1983; 94: 407– 411.
34. Koster JF, Slee RG. Lipid peroxidation of human erythrocyte ghosts induced by organic hydroperoxides. *Biochem Biophys Acta* 1983; 752: 233–239.
35. Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL. The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Surg* 1984; 200: 405– 413.
36. Schoenberg MH, Bu'chler M, Beger HG. Oxygen radicals in experimental acute pancreatitis. *Hepato-Gastroenterol* 1994; 41: 313–319.

37. Schoenberg MH, Birk D, Beger HG. Oxidative stress in acute and chronic pancreatitis. *Am J Clin Nutr* 1995; 62:1306–1314.
38. Anderson J.R. Anderson's pathology. 9th ed. St. Louis, Toronto: Mosby,1990.
39. Kumar V, Cotran RS, Robins SL. Temel Patoloji 7. baskı, İstanbul: Nobel, 2003.
40. Çalangu S, Güler K. Acil Dahiliye. İstanbul: Medikal Yayıncılık, 1995.
41. Feldman M, Brennan FM, Maini RN. The role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann Rev Immunol* 1996; 14:397-440.
42. Grom A, Murray KF, Luyrink L, Emery H, Passo MH, Glass DN. Patterns of expression of tumor necrosis factor  $\alpha$ . tumor necrosis factor  $\beta$ . and their receptors in synovia of patients with juvenile rheumatoid arthritis and juvenile spondyloarthropathy. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1703-1710.
43. Saxne T, Palladino Jr MA, Heinegard D, Talal N, Wollheim FA. Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 1041-1045.
44. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation. costimulation. and death. *Cell* 1994; 75: 959-962.
45. Wooley PH, DutcherJ, Widmer MB, Gillis S. Influence of a recombinant human soluble tumornecrosis factor receptor FC füzyon protein on type II collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol* 1993; 151: 6602-6607.
46. FDC report. Immunex Enbrel indication upgrade to first line requires more safety data. FDC report 1998; 60: 7-8.
47. Chan YC, Leung PS. Acute Pancreatitis. Animal models and recent advances in basic research. *Pancreas* 2007; 34: 1-14
48. Rau B, Poch B, Gansauge F, Bauer A, Nussler AK, Nevalainen T, Schoenberg MH, Beger HG. Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage? *Ann Surg.* 2000; 231: 352-360.
49. Al-Mufti RA, Williamson RC, Experimental models of pancreatitis. *Ann Acad Med Singapore.* 1999; 28: 133-140.



50. Weber A, Friess H, Sill U, Buchler M. The closed duodenal loop technique. *Eur Surg Res.* 1992; 24 : 24-28.
51. Çınar E, Ateşkan U, Baysan A, Mas MR, Cömert B, Yaşar M, Özyurt M, Yener N, Mas N, Özkömür E, Altınatmaz K. Is late antibiotic prophylaxis effective in the prevention of secondary pancreatic infection? *Pancreatology* 2003; 3: 383–388.
52. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186: 421-431.
53. Tullis MJ, Brown S, Gewertz BL. Hepatic influence on pulmonary neutrophil sequestration following intestinal ischemia reperfusion. *J Surg Res* 1996; 66: 143-146.
54. Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215: 44–56.
55. Shields CJ, Winter DC, Sookhai S, Ryan L, Kirwan WO, Redmond HP. Hypertonic saline attenuates end-organ damage in an experimental model of acute pancreatitis. *Br J Surg* 2000; 87: 1336–1340.
56. Renner IG, Savage WT, Pantoga JL, Renner VJ. Death due to acute pancreatitis. A retrospective analysis of 405 autopsy cases. *Dig Dis Sci* 1985; 10: 1005-1008.
57. Steinberg W, Tenner S. Acute pancreatitis. *N Engl J Med* 1994; 330: 1198 - 1220.
58. Hughes CB, Grewal HP, Gaber LW, Kotb M, El-din AB, Mann L, Gaber AO. Anti-TNFalpha therapy improves survival and ameliorates the pathophysiologic sequelae in acute pancreatitis in the rat. *Am J Surg.* 1996; 171: 274-280.
59. Shi C, Zhao X, Lagergren A, Sigvardsson M, Wang XD, Andersson R. Immune status and inflammatory response differ locally and systemically in severe acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 472-480.
60. Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL. The pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Surg* 1985; 201: 633–639.
61. Norman J. The role of cytokine in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1998; 175: 76–83.

62. Wang ZF, Pang CE, Liu SG. Role of inflammatory mediators in acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1998; 6:170–171.
63. Grewal HP, Mohey el Din A, Gaber L, Kotb M, Gaber AO. Amelioration of the physiologic and biochemical changes of acute pancreatitis using an anti-TNF-alpha polyclonal antibody. *Am J Surg* 1994; 167: 214–219.
64. Hughes CB, Grewal HP, Gaber LW, Kotb M, El-din AB, Mann L, Gaber AO. Anti-TNFalpha therapy improves survival and ameliorates the pathophysiologic sequelae in acute pancreatitis in the rat. *Am J Surg.* 1996; 171: 274-280.
65. Norman JG, Fink GW, Messina J, Carter G, Franz MG. Timing of tumor necrosis factor antagonism is critical in determining outcome in murine lethal acute pancreatitis. *Surgery* 1996; 120: 515–521.
66. Banks PA. Acute pancreatitis: Medical and surgical management. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 78–85.
67. Gross V, Leser HG, Heinisch A, Scholmerich J: Inflammatory mediators and cytokines new aspects of the pathophysiology and assessment of severity of acute pancreatitis. *Hepato-Gastroenterol* 1993; 40: 522-530.
68. Homaidan FR, Chakroun I, El-Sabban ME. Regulation of nuclear factor- $\kappa$ B in intestinal epithelial cells in a cell model of inflammation. *Mediators of Inflammation* 2003; 12: 277–283.
69. Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky S. Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest* 1997; 100: 1853–1862.
70. Leser HG, Gross V, Scheibenbogen C, Heinisch A, Salm R, Lausen M. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1991; 101: 782-785.
71. Pezzilli R, Ceciliato R, Barakat B, Corinaldesi R. Immune-manipulation of the inflammatory response in acute pancreatitis. What can be expected. *Journal of the Pancreas* 2004; 5: 115-121.
72. Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 1984 ; 222: 1-15.

73. Petrone WF, English DK, Wong K, McCord JM. Free radicals and inflammation :Superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. Proc Natl Acad Sci 1980; 77: 1159-1163.
74. Wisner J, Green D, Ferrell L, Renner I. Evidence for a role of oxygen derived free radicals in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis. Gut 1988; 29 : 1516-1623.
75. Laura R, Manuel A, Secundino V, Isabel D. Pro- and anti-inflammatory response of acinar cells during acute pancreatitis .Effect of N-acetyl cysteine. Cytokine 2005; 32:125-131.