

58763

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**RATLARDA, DENEYSEL AKUT KARACİĞER YETMEZLİĞİNİN
FÖTAL HEPATOSELÜLER TRANSPLANTASYONLA
TEDAVİSİNİN HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRMESİ**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN
Dr.Ender ERDOĞAN

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 02.05.1997 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oy birliği ile kabul edilmiştir. (S.B.E. Yön.Kur.Karar tarih ve no.....)

Tez Jürisi : Jüri Başkanı, Danışman Prof.Dr.Refik SOYLU
Üye Prof.Dr.Şahin SIRMALI
Prof.Dr.Hasan CÜCE
Doç.Dr.Serpil KALKAN
Doç.Dr.Selçuk DUMAN

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİ	6
2.1. KARACİĞER.....	6
2.1.1. ANATOMİSİ.....	6
2.1.2. HİSTOLOJİ	7
2.1.3. EMBRİYOLOJİSİ.....	8
2.1.4. FÖTAL HEPATOSİT HİSTOFİZYOLOJİSİ	8
2.2. DALAK ANATOMİ, HİSTOLOJİ VE FİZYOLOJİSİ	10
2.3. SON DÖNEM KARACİĞER RAHATSIZLIKLARI; AKUT KARACİĞER YETMEZLİĞİ VE KARACİĞER ORGAN NAKLİ	11
2.3.1. BIO-YAPAY KARACİĞER SİSTEMLERİ.....	17
2.4. KARACİĞER HÜCRE NAKLİ.....	19
2.4.1. GİRİŞ VE TARİHCE:.....	19
2.4.2. HTX METODLARI VE UYGULAMA YERLERİ.....	20
2.4.3. HEPATOSİTLERİN HAZIRLANMASI VE SAKLANMASI.....	26
2.4.4. DENEYSEL AKUT KARACİĞER YETMEZLİĞİ.....	29
2.4.5. FÖTAL HEPATOSİT TRANSPLANTASYONU.....	30
2.4.6. RED OLAYI VE GVHD.....	33
3. MATERYAL VE METOD	35
4. BULGULAR	39
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	52
6. ÖZET	57
7.SUMMARY.....	58
8. KISALTMALAR.....	59
9. LİTERATÜR.....	60
10. ÖZGEÇMİŞ.....	76
11. TEŞEKKÜR	77

1. GİRİŞ

Karaciğer, stratejik anatomik lokalizasyonu ve metabolik dönüşümler için sahip olduğu büyük kapasiteleri ve fonksiyonları nedeniyle; birçok ajanla muhatab olması söz konusudur. Karaciğer hastalıklarında morbidite ve mortalitenin çok hızlı ilerlemesi, zararlı medikal ajanların ve çevresel etkenlerin artan sayısına da büyük ölçüde bağlıdır (1).

Şiddetli karaciğer rahatsızlıkları, hayatı sıklıkla tehdit eder ve hayatın kalite ve kantitesini de dramatik olarak etkileyebilir (2). Hızlı ve aşırı bir nekroz ve hepatosit kaybıyla ilerleyen akut hepatik yetersizlik, multietiyolojik ciddi bir antitedir (3, 4, 5). Akut yetmezlik, kronik karaciğer hastalıklarıyla, konjenital metabolik karaciğer hastalarının sağ kalım oranlarında artış ve yaşam kalitesinde artış, karaciğer fonksiyonlarının düzeltilmesine bağlıdır. Bu hastalara katkı sağlayacak yoğun kritik bakım şartları hariç; şimdilerde geliştirilmiş suni karaciğer desteğine ilişkin aktif bir form yoktur (6). Tüm teknik tedavi imkanlarına rağmen sağkalım oranları, % 20'lerde seyretmektedir. Hasarlanmış karaciğerin rejenerasyonu uyarılırken; kritik periyot boyunca azalmış fonksiyonların desteklenmesi önemlidir (4).

Akut karaciğer yetmezliğinde: bilinen en seçkin tedavi metodu, karaciğer organ transplantasyonudur (7).

Akut karaciğer yetmezliğinin (AKY)'nin, tüm terapodik girişimlere rağmen yüksek oranda ölümcül seyretmesi nedeniyle; çoğu hasta iyileşme şansından önce ölürlere (8, 9). Karaciğerin rejenerasyon kapasiteleri iyi bilindiğinden, iyileşme mümkün olabilir. Şiddetli hepatoselüler hasarlı hastalarda sağkalımda en büyük rolü, bu rejenerasyon süreci oynar. Karaciğer rejenerasyonunda karaciğer hücre fonksiyonlarının etkisi, farklı şartlar altında araştırılmıştır (10). Sağkalım raştırmalarının çoğu da herhangi bir iyileşme olmaksızın; geçici karaciğer desteğine ait metodlar geliştirmeye yöneliktir. Çünkü; bu metodların çoğu, normal bir karaciğer tarafından yapılan karmaşık fonksiyonların hepsini karşılamaz (8).

Ortotopik karaciğer transplantasyonu (OKT), bu hastalar için başarılı bir çözüm olarak bildirilse de; bu prosedürün yüksek bilimsel ve teknik imkanlar gerektirmesi, kompleksliği, yüksek maliyetin getirdiği sorunlar yanısıra; endikasyonların da hayli genişlemesiyle; giderek artan donör ihtiyacının ortaya çıkardığı sınırlamalar, çalışmalarda alternatif tedavi seçeneklerini gündeme getirmiştir (7, 9).

Uygun bir donör için bekleyenlerin sayısı giderek artarken; bu sıkıntı özellikle pediatrik dönemde daha belirgin olup; ABD'de dahi 10 çocuktan ancak sekizine donör bulunabilmektedir (7, 10, 11).

Son yıllarda geliştirilen biyoyapay karaciğer destek sistemleriyle, mekanik ve metabolik olarak plazmada biriken toksik maddelerin uzaklaştırılmasıyla geliştirilen sağ kalım oranları da, hala: % 30 lardadır. Zira; bu yaklaşımlar da: karaciğerin karmaşık metabolik fonksiyonunun sadece bir yönünü hedef alır. Halbuki bir destek sisteminin bu fonksiyonların hepsine yönelik olması arzu edilir , 12, 13).Bu nedenle: bu tür hastaların tedavisine uygun etkili bir karaciğer destek sistemine ihtiyaç belirmektedir. Bu sistem, kalitatif ve kantitatif bir düzelme sağlamalıdır. Karaciğer hastalıklarının geniş bir kısmının tedavisi için: izole hepatositlerin kullanımı ile spesifik biyolojik yetersizliklerin ikamesi sayesinde potansiyel bir tedavi yaklaşımı oluşmuştur (2, 6).

OKT'nin büyük ve irreverzible cerrahi problemlerine karşın; hepatoselüler transplantasyon (HTX) in bozulmuş karaciğer fonksiyonlarını düzeltebilme ihtimali oldukça ilgi çekicidir (10, 14).

Bugün gelinen noktada; birçok araştırmada: izole HTX'in karaciğer fonksiyonlarının hepsini sağlamasa da; büyük bir destek sağladığı bulunmuştur. HTX, yeni bir konu değildir. Son gelişmeler ve kültür sistemleri bu prosedürü kolaylaştırmıştır. Demetriou ve ark. % 90 parsiyel hepatektomi (PH) yapılan ratların canlılığında HTX ile önemli artışlar kaydetmişlerdir (8). Transplante edilen hepatositlerin, karaciğer dokusunun yeterli rejenerasyonu için;

hepatektomili ratların canlı kalmasını mümkün kılacak yeterli metabolik desteği sağlayabildiği gösterilmiştir (7, 9). Doğuştan metabolizma bozukluklarının çoğu, hepatik enzim aktivitesinde spesifik bir eksiklik veya defektle karakterizedir. Karaciğerde bunlarla ilgili genler de belirlenmiş olup; yetersiz genin normal kopyelerinin HTX'i ile bu metabolik bozuklukların iyileştirilebileceği düşünülmektedir (8, 15).

Deneysel çalışmalarda: transplante edilen hücrelerin kısa dönemde canlılığı, birçok hayvan modelinde ve farklı implantasyon sahalarında araştırılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır (14). Bu konuda ilk çalışmalar: Hanspapper ve ark.ca 1930'larda karaciğer fragmanlarının ektopik nakliyle başlatılmıştır. Monodisperse izole hepatositlerle uygulamalar ise; 1960 larda başlamıştır (12).

Son dönem karaciğer rahatsızlıklarında iki maksatla HTX kullanılagelmiştir:

- 1- Enzim defektlerinde replasman tedavisi için
- 2- AKY'de destekleyici tedavi olarak (4, 16).

HTX'in reverzibl bir prosedür olup; bir donörden alınıp, saklanarak multibl alıcıya verilebilir olması ve donör sıkıntısının daha az olması avantajları vardır (8, 15). Tek problem: hepatositler, diğer hücrelere göre daha hassas ve hasarlanabilir olduklarından süspansiyonlarının saklanması zordur ve primer kültürlerde de iyi muhafaza edilemezler (17). Cazip bir özelliği de; gezici lökositler, antijen sunan hücreler ve reddi artıran diğer hücreleri içermediğinden rejeksiyon (red) olayının rastlanmaması veya az rastlanılmasıdır (11).

Transplante edilen hepatositlerin etki mekanizmaları, henüz net değildir. Konakçı karaciğerinin rejenerasyonunda karaciğer sitozol fraksiyonlarının etkisi de düşünülmektedir. HTX'in hasta karaciğer rejenerasyonunun uyarılmasına neden olan indirekt etkisiyle beraber hücrelerin metabolik aktiviteleri ile oluşabilecek tedavi edici etkinlikler söz konusudur (18).

İsole hepatositlerin, ekstrahepatik yerlerde fonksiyonel olarak normal hücreler içeren morfolojik koloniler oluşturabildiği çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir (15-19).

Benzer retikulo-endotelyal mimariye sahip olması ve hepatositleri destekleyen uygun bir mikro-ortam ilişkisi sağlamasıyla dalak, en sık kullanılan implantasyon sahasıdır. Dalağa yapılan HTX'le, hepatositlerin uzun süre canlı kaldığı iyi bilinmektedir (14, 20).

HTX ile verilen donör hücrelerle sağlanacak metabolik destekte: yapılacak bir parsiyel hepatektominin bu hücre popülasyonuna potent bir proliferatif stimulus sağlaması ilgi çekicidir. Parsiyel hepatektomi veya hepatoselüler hasardan sonra; rejenerasyonun uyarılması veya hatta sınırlandırılmasından sorumlu faktör(ler)in orijini, bizzat karaciğerin kendisi olabilir. Bu nedenle; akut karaciğer yetmezliği ile ilgili deneysel çalışmalarda yetmezlik oluşturmak için kullanılan en yaygın model, parsiyel hepatektomi modifikasyonlarıdır (10, 20, 21).

Gelişim sürecinin başlangıcında Hepatosit Growth Faktör (HGF)'ün güçlü etkisi söz konusudur. PH'den sonra dolaşımında artmış HGF izole edilmiştir. İnsanda karaciğer rejenerasyonu, nisbeten daha az araştırılmış bir konudur. Cerrahi rezeksiyon veya doku hasarından sonra karaciğer rejenerasyonu hemen başlar. Ancak invivo çalışmalar ve invitro gelişim modelleri sınırlıdır. Çünkü; yeterli canlı, fonksiyonel normal insan karaciğer dokusu temini güçtür (22). Çalışmalar özellikle fetal yaşam boyunca otokrin, parakrin ve regulatuar sinyallerin etkilerini ortaya koymaktadır (23, 24).

Taranılan son literatürlerde rastlanılan çalışmalarda: konjenital metabolik bozukluklarda ve özellikle de Severe Combined Immun Deficiency (Şiddetli kombine immün yetmezlik = SCID)'li hastalarda: fetal karaciğer hücrelerinin nakli ile başarılı sonuçlar alınmıştır. Bu prosedürlerde HLA karşılaştırması gerekmediği, hatta; prenatal uygulanabilirliğini de ortaya koymuştur (25, 26).

Fetal hepatositlerin adult hepatositlere göre daha kolay hazırlanabilmesi ve yüzey antijenlerinin zayıf olması sayesinde; doku reddi olayının yok denecek kadar az olması, mitoza daha yatkın ve bol miktarda blast hücre içermeleri avantajlarıdır. Embriyolojik gelişimde: fetal karaciğerin, hematopoezin major kısmını teşkil etmesi ve hematopoetik (stem cell, ana=kök hücreleri) de içermeleri kemik iliği yerine fetal karaciğerle yapılan transplantasyonlarla daha başarılı bir şekilde kullanılabilirliği ortaya konmuştur. Çünkü; fetal karaciğer, daha az immunopotent hücre içermesi nedeniyle Graft Versus Host Disease (GVHD)'i indüklenme kapasitesi çok daha azdır (26, 27, 28).

Çalışmada; fetal karaciğerden mekanik ayrıştırma tekniği ile elde edilen hepatositlerin, transplantasyonunun akut hepatik yetmezlikte alternatif bir tedavi seçeneği olup olmadığını, ratlarda invivo koşullarda; parsiyel hepatik rezeksiyonla oluşturulan deneysel akut karaciğer yetmezliği tablosunda: dalak parankimi yoluyla transplante edilerek; metabolik destek sağlayıp, sağlamadığı; sağkalım üzerine etkisi olup olmadığı, kısaca; bahsedilen tekniğin etkinliğinin histomorfolojik olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİ

2.1. KARACİĞER

2.1.1. ANATOMİSİ

Karaciğer vücudumuzun en büyük glandüler organıdır. Diyafragmanın hemen altında, karın boşluğunun sağ üst çeyreğinde yer alır. Yarım elipsoid görünümde olup; yetişkinde vücut ağırlığının: % 2, çocuklarda: % 5'i kadardır. Kanla dolu ağırlığı 2500 g, kansız ağırlığı 1500 g. kadardır. Vena porta hepatis (portal ven) ve arteria hepatis propria (hepatik arter) olmak üzere iki kaynaktan beslenir. % 70 portal, % 30 arteriel sistemden kan alır. 1500 ml/dk'lık bir debisi vardır. Karaciğerden geçen bu kan, sinusoidleri döşeyen hücrelerce bakteri ve diğer yabancı maddelerden temizlenir. Yüksek rejenerasyon kapasitesi olan bir organdır. Lobus dekster, lobus sinister, lobus quadratus ve lobus caudatus olmak üzere 4 lobdan oluşur (29, 30).

Organ: koyu esmer renkte, katı ve gevrek bir kıvamda olup; dıştan Glisson kapsülü denen ince fibröz kapsülle sarılmıştır. Bir bölümü hariç peritonla kaplıdır. Dört adet ligamentle çevre yapılara tutunur. (30, 31)

2.1.2. HİSTOLOJİ

Organ seröz bir zarla çevrili olup; parankimasını hepatosit kordonları meydana getirir. Bu kordonlar arasında zengin bir sinusoidal dolaşım vardır. Glisson kapsülü, elastik fibrillerden zengin bir bağ dokusu olup; hilusda kapsül içeriye doğru girer ve organı lobcuklara ayırır. Ancak bu lobcukların sınırları belirgin değildir.

Lobcuk içindeki bağ dokusunda retiküler fibriller vardır. Hepatositler ile sinusoid kan damarları arasındaki bu fibriller, parankimi taşır ve çatıyı oluşturur.

Kesitlerde 1-2,5 mm. çapında "lobuli hepatis" denen kabartılar görülür. Bu lobcuklar, 5-6 köşeli ve kenarları gayrimuntazam prizmatiktir. Bu

lobcukların hepsi parankimi oluşturur. Birbirlerinden septa interlobularia ile ayrılmışlardır. Sayıları yaklaşık bir milyon kadardır.

Üç lobcuğun köşelerinin biraraya geldikleri yerlerde üçgen şekilli yıldız benzeri aralıklar vardır. Bunlara portal aralık (Kiernan aralıkları) denir. Her aralıkta bağ dokusu içinde, vena portanın dalı olan vena interlobularis, a. hepaticanın bir dalı olan a. interlobularis ve safra kanalcığı (ductuli interlobularis) ile sinir lifleri ve lenf damarları bulunur. Hepatik lobcukların merkezinde vena santralis bulunur (32).

Karaciğerde lobül sistemleri üç tür olarak tanımlanmıştır.

Merkezinde vena santralis bulunan, kabaca altıgen biçiminde, içerisinde Remark kordonlarının ışınal yerleştiği klasik lobül; üç klasik lobülün vena santralislerinin birleştirilmesi ile oluşan, üç köşeli portal lobül ki; bu da, portal aralıktaki safra ductusuna safra veren komşu karaciğer hücreleri tarafından oluşturulur. Nihayet; hepatic asinus ise; 2 portal aralık ve iki vena santralisin birleştirilmesiyle oluşan eşkenar dörtgen şekilli oluşumdur. Esası: a. interlobularisin kanlanmasına dayanır (33).

Bu sınıflamada: portal aralığa yakın olanlar: zon 1, vena santralse en yakın olanlar: zon 3 olarak isimlendirilir. Zon 2 ise; bu iki zonun arasındaki geçiş bölgesi olup; anatomik bir sınır yoktur. (34)

Karaciğer fonksiyonu, insan fizyolojisinin hemen tüm yönlerini ilgilendirir (35). Hepatik parankimin strüktürel ve fonksiyonel unitleri, hepatic asinusun morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel kabiliyetleri farklı hepatositlerden oluşur. Hepatosit heterojenitesi, değişen sinusoidal mikro çevreye bir adaptasyon olarak belirmektedir (36).

Hepatositler, çekirdekleri bakımından diğer hücrelerden farklı olup; birden fazla çekirdek de içerebilir. GER ve AGER, Golgi ile mitokondria organelleri bakımından zengindir. Sitoplazmalarında yoğun glikojen partikülleri bulunur (37).

2.1.3. EMBRİYOLOJİSİ

Dördüncü haftanın başında, ön barsağın kaudal kısmının ventralinde karaciğer tomurcuğu belirir. Buradan: karaciğer, safra kesesi ve kanalları gelişir ve bu divertikulum, septum transversuma doğru ilerler. (38). Divertikulumda proliferen olan endodermal hücreler ilerde Remark kordonlarını oluşturacak hepatositleri ve intrahepatik safra yollarının epitelini oluşturur. Kordonlar endotelle döşeli boşlukların etrafında anastomoz yaparlar. Bu boşluklar da: sinusoidlerin taslaklarıdır. Karaciğerin fibröz, hemapoetik bileşenleri ve Kupffer hücreleri mezodermal kökenli septum transversumdan türeler (39, 40, 41, 42).

Karaciğer hızla büyüyerek karın boşluğunun büyük bir kısmını işgal eder. Sağ lob, sonradan daha fazla gelişecektir.

Hematopoez, karaciğerde 6. hafta civarında başlar ve bu nedenle; karaciğer parlak kırmızı bir renkte görünür. Bu aktivasyon da, karaciğeri büyüten diğer bir nedendir.

9. haftada vücut ağırlığının % 10'unu oluşturur. En fazla proliferasyon organda 2. trimestr'dadır. Safra üretimi de 12. haftada başlar. Safra kesesi ve yollarının da gelişmesiyle 13. haftada safra barsağa ulaşır ve mekanyumun rengini yeşil yapar. (42)

2.1.4. FÖTAL HEPATOSİT HİSTOFİZYOLOJİSİ

Hepatositler metabolizma, bilirubin ve safra üretimi yapan karaciğer parankim hücreleridir. Karaciğer divertikulumunun septum transversumdaki mezenkimal yapılarla kaynaşması ile organogenez başlar (39).

Önceleri polarizasyon göstermeyen hepatositler, 5-6. haftalarda bazal ve apikal polarizasyona girer ve olgunlaşır. Kalan hücreler, safra kanallarını oluşturacaktır. Hepatositlerin birbirine bakan kenarlarında hematopietik stem hücreler belirmeye başlar ve hematopoez başlar (42).

Hepatositler apikal kutupda kanaliküler yüze, bazalde sinüzoidal hücrelere komşudur. Bu yüzde, mikrovillus varken; birbirleriyle birleştikleri yan

yüzlerde desmozom ve gap-junctionları ihtiva eder. Hepatositler bazal membrana sahip diğer epitelyal hücrelerden ayrılır. Bazal membranın çatısını, sinuzoidal hücrelerin salgıladığı tip 4 kollagen yapar. İnvitro deneylerde: bazal membran ayrıldığı takdirde hücre şeklinin bozulduğu ve fonksiyonlarının değiştiği kaydedilmiştir. İmmatür hücrelerin yüzeyinde "insülin" veya IGF-1 reseptörleri daha çok bulunabilir (42).

Glikojen sentezi 3. ayda başlar ve glikojen granülleri görülmeye başlar. Değişik bölgedeki hepatositlerin fonksiyonları da farklıdır. Zon 1'deki hücreler enterohepatik dolaşıma maruz kalan esas hücreler olup; safra tuzunu da en çok salarlar. Yine en çok glikojen sentezi, protein sekresyonu ve diğer enerji ile ilgili işlevleri icra eden hücrelerdir. Halbuki zon 3'deki hücreler glikoliz ve biotransformasyon faaliyetleri ile ilgilidir. Uterus içindeki canlıda muhtemelen düşük oksijenden dolayı bu tür işlevler tam olarak farklılaşmamış olup daha homojenizedir.

Fizyolojik işlevlere ilişkin çalışmalarda perfüzyon metodu veya otoradyografik metodlar kullanılmaktadır (15, 16, 43).

Fötal hepatosit gelişimi otokrin, parakrin ve proliteratif sinyallerin etkisi altındadır. Hepatosit proliferasyonu ve olgunlaşmasını etkileyen faktörler şunlardır:

Proliferasyonu:

Plasental laktojen, GH, IGF, İnsülin, EGF, (FGF ve TGF((22, 44, 45).

Hücre olgunlaşmasını:

Kortizol, İnsulin, prostoglandin ve tahminen IGF ve EGF (20, 21, 46) etkilerler.

Hepatositler arasında morfolojik farklılıklar olabilir. Çoğunluğu tek çekirdekli. Ancak çift çekirdekli de olabilirler. Erişkin karaciğerinde mitoz nadirdir. Ancak; hasar tamiri söz konusu ise mitoz hızlanır (7).

Hepatositlerin sitoplazması yoğun olup; depo şeklinde glikojen ve yağ ihtiva ederler. Tüm karaciğer hücrelerinin % 80'ini hepatositler oluşturur (32, 33).

Fötal dönem, vücudun büyüme, olgunlaşma ve farklılaşmasının tezahür ettiği bir dönem olup; fötal hepatosit fizyolojisinin de erişkin hepatosit fizyolojisinden farklı olacağı açıktır. Ancak bu konudaki bilgilerimiz fazla değildir.

Fötal karaciğerde glikoz sentezi sınırlıdır ve glikojen yıkımı da zayıftır. Bu yüzden fötal hepatositler (FLC), glikojen deposu yönünden zengindir. FLC'lerin glikoz tutma kapasiteleri yüksektir. Aminoasid sentezi de erişkine göre daha fazla ve çeşitlidir. Gebeliğin ikinci yarısında yağ asidi sentezi fazla ise de fetüsün lipit metabolizması, anne beslenmesiyle yakından ilişkilidir (42).

2.2. DALAK ANATOMİ, HİSTOLOJİ VE FİZYOLOJİSİ

En büyük immun organ olup karnın sol kısmında diyafragmanın hemen altındadır. Dıştan bağ dokusu bir kapsül ile sarılı olup; bu kapsül organın içine trabekülalar göndererek onu lobüllere ayırır. Lobuller içinde kırmızı pulpa organın parankiminin büyük kısmını oluştururken beyaz pulpa onun içinde yayılmış vaziyettedir. Başlıca fonksiyonu, kanı yabancı antijenlerden temizlemek ve immun fonksiyon için ortam sağlamaktadır. Dalak bol kan içerir, hatta depolar (32).

Stroma, kapsül ve trabeküller yoğun bağ dokusu ve az düz kas içerir. Trabeküllerdeki kollajen fibriller, pulpadaki retiküler fibrillerle devam ederek bir ağ yapısı oluştururlar.

Trabekülalar içinde: arter, ven, sinir ve lenfatik damarlar yer alır. Dalak pulpası bu ağ yapısının arasını doldurur. Dalak lobülleri 1 mm civarında olup; keskin sınırları yoktur. Parankimi oluşturan; kırmızı pulpa Billroth kordonları denen dalak kordonları ve venöz sinuslerden oluşur. Süngerimsi yapıdaki kırmızı pulpa boşluklarını sinusoidler doldurur. Dalak kordonlarında retiküler hücreler, sabit ve hareketli makrofaj, monosit, lenfosit, plazma hücreleri ile

eritrosit, trombosit ve granülosit gibi kan hücreleri yer alırlar. (14) Beyaz pulpa, splenik arterin adventitiasının yerini alan ve arter boyunca yer alan lenfatik dokudur. Ya gevşek lenfatik doku veya da aralıklı bulunan ve Malpighi nodülü denen lenfatik nodül şeklinde bulunur. Beyaz pulpada en çok bulunan hücre küçük lenfositler, sonra orta ve büyük lenfositlerle plazma hücreleri ve monositlerdir. Diğer lenfatik nodüllerden farkı içerisinde arteriola sentralis içermeleridir. Beyaz pulpa sayısı 100.000-200.000 arasındadır. Yaşlandıkça azalır yerini kırmızı pulpa alır. (33).

Dalakta arter ve venlerin devamlılığı diğer organlardan farklıdır. Açık dolaşım, kapalı dolaşım ve açık + kapalı dolaşım diye üç ayrı dolaşım teorisi mevcuttur (32, 33).

2..3. SON DÖNEM KARACİĞER RAHATSIZLIKLARI; AKUT KARACİĞER YETMEZLİĞİ VE KARACİĞER ORGAN NAKLİ

Hepatoselüler hasar, irreverzibl olduğunda nekrozla sonuçlanmaktadır.

Alternatif tıbbi tedavinin olmadığı durumlarda progressif ve geri dönüşümsüz akut ve kronik karaciğer rahatsızlıkları için seçilecek en seçkin ve etkin tedavi yöntemi karaciğer organ naklidir (47-48).

Tüm karaciğer hastalıkları içinde en acil ve yaşam kurtarıcı özelliği açısından; en önemli endikasyonu, fulminan karaciğer nekrozu ve akut karaciğer yetmezliğidir (47).

Reverzibl ama iyileşme için yeterli yaşam süresinin olmadığı tablolarda da tedavi; yaşamın sürdürülmesine yönelik olmalıdır. Yetmezlik periodu esnasında karaciğer rejenerasyonu için yeterli süreyi sağlamaya çalışmalıdır (48). Esas problem, transplantasyon zamanını belirlemektir. Bu konuda çeşitli merkezlere ait kriterler mevcuttur. Medikal tedavi mortalitesi: % 80-90 civarında olup; OKT ile belirgin düzelmeler kaydedilmiştir (47).

Tedavi, karaciğerin bozulmuş fonksiyonlarını minimize etmeye veya rejenerasyon kapasitesini stimule etmeye yönelik olmalıdır. Karaciğer

fonksiyonel olarak irreverzibl "dönülmez nokta" ya değil; az veya çok rejenerasyon için bir potansiyele sahip hale gelmelidir ki; uygun uyarıcı faktörler temin edilebilsin (48).

Transplantasyonun başarısı, dikkatli hasta seçimine bağlıdır. Son dönem kronik karaciğer rahatsızlığı olanlarda transplantasyon kriterleri üzerinde görüş birliği olmasına karşılık; akut yetmezlik durumunda zamanlama ve endikasyon konuları hala tartışmalıdır. Erken operasyon, postoperatif mortalite ve morbiditeyi azaltabilir. Ancak; yoğun tıbbi bakımla karaciğeri rejenere olabilecek hastalar da gereksiz yere ameliyat edilebilmektedir. AKY'nin yüksek mortalitesi düşünüldüğünde transplantasyondan fayda görebilecek hastaların tanınmasının önemi ortaya çıkar. Çalışmalarda: AKY olan büyük bir hasta grubunda prognoza ilişkin bir analiz yapılmış, ve sağ kalımın yaş, hepatik ensefalopati gelişme süresi, protrombin zamanı, ve hepsinden önemlisi; etioloji ile ilgili olduğunu bulmuşlardır (49).

Akut karaciğer yetmezliği olan hastalarda OKT'nin karaciğer fonksiyonlarını sağlamasına karşın iki önemli dezavantajı da beraberinde getirmektedir. Bunlarda biri hayat boyu immun süpresyon zorunluluğu, diğeri de: artık asıl karaciğerin kendiliğinden rejenere olması olasılığının ortadan kalkmasıdır. Bu sorunlar, yardımcı karaciğer transplantasyonu (auxillary liver transplantation) tekniği ile kısmen ortadan kalkmaktadır (49).

OKT aşağıdaki endikasyonlarda yapılmaktadır (3, 50, 51).

- 1.Son dönem karaciğer rahatsızlığı (end stage liver disease)
- 2.Fulminan hepatitler,
- 3.Kolestatik hastalıklar,
- 4.Metabolik hastalıklar,
- 5.Post hepatik siroz.

OKT endikasyonlarında; bilirubin, transaminazlardaki yükselme, hipoglisemi düzeyi, protrombin zamanında azalma ve ensefalopati varlığı parametrelerinden en az üçü aranmaktadır.

Kontrendikasyonları şunlardır: Psikososyal ve fiziksel intolarabilite, hepatobilier sistem harici aktif sepsis, metastatik malignite, kolanjio karsinom, aktif alkolizm, portal ven ve v. mesenterica sup.de diffüz tromboz, ileri derecede kardiyopulmoner rahatsızlık, multiorgan yetmezliği (3, 47).

Karaciğer naklinde cerrahi organizasyon karmaşıklığı, büyük kan kayıpları, donör organ saklama problemleri (donör-resipiant arası lojistik mesafe sorunları), pahalı bir yoğun bakım ve üçüncül bakım imkanları gerektirmesi, anestezi zorluğu ve komplikasyonları alternatif tedavilere yönlendirmektedir.(11, 35).

OKT sonrası komplikasyonlar şunlardır (35, 52).

- 1.Kanama (PC şanta bağlı faktör eksikliği, trombosit fonksiyon bozukluğu ile 40 üniteye kadar olabilir),
- 2.Vasküler anastomoz oklüzyonu,
- 3.Respiratuar komplikasyonlar,
- 4.Böbrek yetmezliği,
- 5.Enfeksiyonlar,
- 6.Rejeksiyon (red),
- 7.Glisemide düzensizlikler,
- 8.Asid-baz dengesi bozuklukları,
- 9.Safra yolları komplikasyonları (hemobili, obstrüksiyon vs.) (53).
- 10.Gastro intestinal sistem komplikasyonları,
- 11.MSS ve nörolojik komplikasyonlar.

Enfeksiyonlar, komplikasyonlardan en fazla görülenlerinden olup, klinik bakımdan önemlidir. Bunlar, 3 başlık altında incelenir (54):

- 1.Preoperatif,
- 2.Operatif,

3.Postoperatif enfeksiyon riski faktörleridir.

Preoperatif genel durum, immunglobülinlerin durumu, kreatin yüksekliği, lökosit ve nötrofil sayısı, bilirubin yüksekliği yanısıra operatif risk faktörleri: operasyon süresinin uzunluğu, kan ürünlerinin fazla kullanılması, donörün genel durumunun iyi olmamasıdır. Postoperatif dönemde uzun yoğun bakım gerekmesi, immunosüpresif tedavi ve antilenfositik serumlar enfeksiyon riskini artıran faktörlerdir. (54).

Karaciğer naklinde sık karşılaşılan enfeksiyonlar: HBV, HCV, HSV, V. Zoster, E. Barr, Herpes, yara ve cilt enfeksiyonları, pneumonia, abdominal ve gastrointestinal sistem enfeksiyonları, karaciğer ve intraabdominal abseler, kolanjitler, MSS enfeksiyonu, listeria, aspergillus, criptococcus neoformans, toxoplazma, nocardia ve üriner enfeksiyonlardır. (54).

Karaciğer naklinin en önemli endikasyonu olduğu akut karaciğer yetmezliği, ilk semptomun ortaya çıkışından itibaren sekiz hafta içinde hepatik ansefalopatiye götüren, ağır ve ilk başta fulminan hetatit olarak adlandırılan bir tablodur. Bu durum, ilk 7 günde ortaya çıkarsa, hiperakut karaciğer yetmezliği diye adlandırılmaktadır. Akut yetmezlik durumunun son evrelerinde hangi fizyolojik değişimlerin oluştuğunun anlaşılması, daha iyi destek tedavilerini almalarını sağlamıştır. Bu hastalarda: serebral ödem, sepsis ve multiorgan yetmezliğine neden olan hipotansiyon gelişir (49).

Siroz; fibrozis ve normal karaciğer mimarisinin nodüler yapıya dönüşmesiyle ilgili diffüz bir süreçtir. Hepatoselüler hasarı indükler ve parankimde azalmaya sebep olur. Parankim / nonparankim oranı düşer. Karaciğer volümü kompüterize tomografi ile hesaplanabilir. Hücre sayımları Transplant Aspiration Cytology (TAC) biopsilerle yapılır (55).

AKY, Kupffer hücre fonksiyonunda da azalmaya sebep olur. Bu da; hastalığın ilerlemesinde önemli bir etkindir (4).

Siroz yanı sıra; viral ve toksik hepatitler, hemakromatoz gibi yaygın parankim harabiyetine neden olan çeşitli karaciğer rahatsızlıklarında koma ile

sonlanan nöropsikiyatrik semptomların ortaya çıktığı anlaşılmış, ve bu tabloya; hepatik koma ve patojeniteye dayanan portal sistemik karaciğer ensefalepatisi denmiştir (56). Makowka ve ark. ensefalopatili 188 hastada mortaliteyi % 95 bulmuşlardır (57).

Bir grup araştırmacı tarafından incelenerek kategorize edilen bu klinik durumda söz konusu akut fulminant yetmezlik, bir bakıma gerçek bir hepotektomi tablosu gibidir (56).

Portal sistemik karaciğer ensefalopatisi kategorileri şöyledir (56):

- 1.Prodrom: Öfori, bazen depresyon, akıl ve hissi melekelerde yavaşlama, uyku ritm bozuklukları ile hafif tremor,
- 2.Prekoma: Uykuya meyil, konfüzyon, öfori, dizartri, davranış bozuklukları ile belirgin 2. tremor,
- 3.Stupor: Stimulusla uyandırılabilme, abuk subuk konuşma ile EEG değişiklikleri,
- 4.Koma: Derin şuur kaybı ile EEG değişiklikleri.

Bütün organ nakillerinde olduğu gibi karaciğer naklinde de yaşama yeniden başlayabilmek için; hastaların önünde belirsizliklerle dolu bir bekleme süresi vardır. Ölü, ailesi ve hasta üçgeninde bir iletişim gerekmektedir (57). Genel durumuyla yakından ilişkili olup; fiziksel, sosyal ve psikolojik olarak bir hazırlık gerekir (50).

Karaciğer nakline ilişkin ilk deneysel çalışmalar, Prof. Thomas Fitzgerald Starzl tarafından 1958'de başlatılmıştır. Köpeklerde başlatılan deneysel çalışmalar 1963'lere kadar sürmüştür. 1960'lı yıllarda Fransa ve İngiltere'de de çeşitli çalışmalar yapılmıştır. İlk karaciğer nakli 1 Mart 1963'de Starzl ve ekibince gerçekleştirilmiştir. 1983'te Siklosporin'in FDA'ca onaylanmasından sonra başarı oranı giderek artmıştır. Diğer bir immunsupressif ajan olan FK-506 ile çalışmalar sürmektedir. Sağ kalım oranı: % 30'lardan %70'lere yükselmiştir (3,47,58-60).

ABD'de 1991 yılına kadar yapılan OKT sayısı 5080'dir. 1993 yılında ise sadece Pittsburg'da yapılan nakil sayısı ise 700'dür. Oklohama'da Prof. Nezh Zühdi, Wisconsin'de Prof. Münci Kalaycıoğlu ekibinin başarılı çalışmaları vardır (58).

Türkiye'de ilk nakil Prof. Mehmet Haberal ve ekibince 1988 yılında gerçekleştirilmiştir. Haberal, daha çok parsiel karaciğer nakli üzerinde çalışmaktadır. Hacettepe ve İstanbul Tıp bünyesinde de çalışmalar vardır (52,58).

Dünyada ve Türkiye'de ortotopik transplantasyondaki en büyük problem; donör sıkıntısıdır. Şempanzelerin kullanıldığı xenotransplantasyonda ise başarı düşüktür (58). Amerika'da karaciğer yetmezliği olan 10 çocuktan OKT için ancak 8'ine donör bulunabilmektedir (11) İspanya'da bu oran: % 30'dur (3).

Karaciğer nakli 3 aşamada yapılmaktadır.

1. Donör ameliyatı ile organın alınması ve saklanması,
2. Back-table denen donör organın hazırlanması,
3. Resipient ameliyatı ile alıcı karaciğerinin çıkarılarak yenisinin yerleştirilmesidir (51,52).

Donörlerden alınan karaciğer greftlerinin prezervasyonunda çeşitli solusyonlar kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygınları;

1. UW (University Of Wisconsin) solusyonu,
2. MUW (Modifiye UW) solusyonu,
3. EC (Euro-Collins) solusyonudur (61).

Karaciğer naklinde alıcı-verici uyumu konusundaki son çalışmalar; HLA.Ab. ve DR doku uyumunun graft sağkalımı üzerinde etkisi olmadığı, ABO uyumunun da gerekli olmasa da iyi olacağını göstermiştir (52).

Modern teknolojiye ve AKY'de en seçkin tedavi olmasına rağmen OKT, operasyonun tüm kademelerinde sorunlu seyreden bir girişimdir. Preoperatif ciddi bir hazırlık gerektirir (62). Operasyon ve operasyon sonrası

dönemde bir çok komplikasyonla karşılaşılabilir (52-54). Postoperatif ilk 24-72 saat çok sıkıntılı seyreder (35). Nakillerin % 87'sinde yaşamı tehdit eden en az bir komplikasyon görülür (35).

Tabii ki; en önemli komplikasyon red olayıdır. Alıcının immun sisteminin, transplante edilen grefte yönelik ve greftin hasarına yol açan immun reaksiyondur (47, 62, 63, 64). Ölüm, genelde ilk 3 ayda rejeksiyon nedeniyle olur. Diğer nedenler % 10 kadardır (52).

Akut redde en erken bulgu: Diffuz intersitisiyel ödem, intramural damarlar etrafında fokal mononükleer infiltrasyon ve nekrozdur (65). Hücreyel red önemlidir. Antigen sunan hücreler T-helperleri indükleyip; o da: lenfokin salınımını artırarak; aktive lenfosit ve makrofajlar hedef hücreye bağlanarak harabiyet yaparlar (66). Matür T lenfositler GVHD'nin esas nedenidir. Bu yüzden kemik iliği nakillerinde; kemik iliğini matür T hücrelerden temizlemek için irradiyasyon gibi çeşitli metodlar kullanıla gelmektedir (67).

Son zamanlarda karaciğer nakillerinde ilk yıllarındaki sağ kalım süresi yerine, yaşam kalitesi daha ön plana çıkmıştır. İşlemin maliyet-yarar oranı da tartışılır ve hesaplanır olmuştur (47).

Yüksek mortalite ile seyreden akut ve kritik durumlarda hastanın yaşama şansını artırmak ve karaciğer transplantasyonu için zaman kazanmak veya genel durumunu düzeltmek için çeşitli medikal teknikler geliştirilmeye çalışılmaktadır (48). Bunlara bio-yapay karaciğer destek sistemleri denilmektedir.

2.3.1. BIO-YAPAY KARACİĞER SİSTEMLERİ

Bu alandaki önemli konulardan biridir. AKY olan bir hastada böyle bir metodun kullanılması, karaciğer rejenerasyonu tamamlanana kadar, ya da; donör sağlanana kadar bir köprü görevini üstlenebilir. Hepatik replasman tedavisi için insan hepatosit sistemleri üzerinde durulmakta ve toksinlerin uzaklaştırılıp; sentez işlemlerinin sağlanmasına çalışılmaktadır (48, 49).

Bu araçlardan biri olan ekstrakorporeal karaciğer yardımı metodunda içi boş bir fiber diyalizerin etrafındaki ekstrakapiller alanda kültürü yapılmış hepatositler bulunmaktadır. Sistemin içine venöz kan pompalanmakta bu da plazmanın ekstrakapiller alana ultrafiltrasyonuna neden olmaktadır (49).

Bu sistemler, hem biyolojik hem de yapay materyalin her ikisini de içerdiğinden; bunlara: hibrid, artifisyel karaciğer denilmektedir. İsole hepatositler major biyolojik materyal olarak kullanılabilmeyle birlikte; yüksek yoğunlukta stabil tutunma ve immunolojik uyum gibi problemleri vardır (2, 6, 12, 68, 69).

Bu sistemler, karaciğer koması ve ensefalopatide yararlı olabilir. Hastaların uygun şartları yakalayabilmesi ve transplantasyona kadar hayatta kalabilmesi için bir köprü görevi görebilir (69). Bir takım avantajları söz konusudur. Ancak yine de mortalitedeki iyileşme % 10-20'yi geçmez ve tüm bu metodlar karaciğerin sadece bir fonksiyonuna yönelik olup; tümünü düzeltmez. (48, 49). Bu metodlarla:

1. Tüm kan yerine plazma perfüzyonu kullanımı, trombositopeni, pıhtı oluşumu, embolizasyon ve heparionu kullanımı, trombositopeni, pıhtı oluşumu, embolizasyon ve heparinizasyonu elimine eder,

2. Cryopreserve (soğuk saklama ile) edilmiş domuz xenograft hepatositlerin kullanımı donör kısıntısını azaltır,

3. Kollagen kaplı yatakta hepatositlerin tutunmaları farklı hücre fonksiyonlarını sağlamada daha faydalıdır (69).

Yaygın olarak kullanılan BAL sistemleri (69):

Domuz karaciğer perfüzyonu, hemoperfüzyon, karaciğer sitozol perfüzyonu, cross sirkulasyondur.

2.4. KARACİĞER HÜCRE NAKLİ

2.4.1. GİRİŞ VE TARİHCE:

Yüksek morbidite ve mortaliteyle seyreden klinik bir tablo olan AKY'de en uygun seçenek OKT gibi görünse de (47, 48); transplantasyon prosedürlerindeki hızlı ilerlemelere rağmen; transplant için donör temini başta olmak üzere; nakil zamanını tesbitte erken veya geç davranılmanın hastanın morbidite ve mortalitesini oldukça fazla etkilemesi yanısıra (47, 49); prosedürün gerçekleştirilebilmesi için yüksek teknolojik gereksinimlerin oluşturduğu limitlere ilaveten bu prosedürlerdeki riskler nedeniyle uygulamalar sınırlı kalmaktadır (11, 35).

Akut ve kritik durumlarda organ nakline alternatif olarak; temel hepatik fonksiyonları destekleme ve düzeltmede bir seçenek olarak; donör karaciğerlerinden alınan heterolog hepatositleri içeren hücre süspansiyonlarının nakli giderek önem kazanmıştır (70, 71,72). Hepatositlerin sağlıklı donörlerden onun sağlığını sıkıntıya sokmadan kolaylıkla sağlanabilmesi, belli bir süre saklanabilmesi ve yüksek teknolojik imkan ve ekipmanlar gerektirmemesi yanı sıra, değişik sahalarda nakil için kullanılabilmesi prosedüre büyük avantajlar getirmektedir. Revesbl bir prosedürdür (36-70).

Karaciğer hücrelerinin izolasyon teknikleri 1960'ların sonunda araştırılmaya başlanmıştır. Extra-hepatik alanlarda hepatositin canlılığı ve fonksiyonu sonraki yıllarda gösterilmiştir (7, 68, 70). İlk ciddi çalışmalarda GUNN ratlar kullanılmıştır. UDP eksikliğinin neden olduğu ankonjuge hiperbilirubinemi olan bu ratlara yapılan bir hepatosellüler transplantasyonun bir kaç haftada serum bilirubinini düşürdüğü gösterilmiştir (17, 70, 74). 1930'lu yıllarda karaciğer doku fragmanlarının gözün ön kamarasına başarısız implantasyonu ile başlayan çalışmalar (25), daha sonra gerçekleştirilen hepatositlerin izolasyonu ile başka bir boyut kazanmıştır (15, 17, 47).

Dinsel inançlarına göre organ nakli yasak olan uzakdoğu milletleri ve özellikle de Japonya'da 1980'li yıllardan sonra hücre nakline özel bir ilgi oluşmuş, Japonya'da özellikle: Hirai, Uyama, Mito ve Ebata oldukça önemli çalışmalar gerçekleştirmişlerdir (4, 16, 43, 73).

İnsanlardaki klinik uygulamalar özellikle ABD'de bilimsel temeller üzerinde ilerlerken Çin ve Hindistan gibi tıbbi etiğin zayıf olduğu ülkelerde yaygın olarak çalışılmaya başlanmıştır (11).

Önemli gelişmeler şöyle oluşmuştur.

1973. Matsamura Rat hepatositlerinin izolasyonu,

1986. Demetriu Dekstran taşıyıcılara isole hepatositlerin tutturulması,

1986. Miura Ca Alginat jelle enkapsülasyon

1991. Dixit Matrijelle enkapsüle HTX (12).

2.4.2. HTX METODLARI VE UYGULAMA YERLERİ

Deneysel olarak induklenmiş karaciğer yetmezliği dahil son çalışmalarda HTX ile verilen donör hepatositlerinin akıbetinin gösterilmesindeki sınırlamalar, araştırmacıları ektopik sahalarda belirlenebilecek hepatosit canlılığı ve sonrasına ait sistematik çalışmalara yönlendirmiştir.

Portal yoldan enfüzyon yoluyla yapılan HTX sonrası hepatositler distal portal dalda ve hepatic sinuzoidlerde depolanırlar. Karaciğer dokusu lokal nekrotik alanlar hariç morfolojik olarak intakt kalan intravasküler hücre agregalarını çevreler. Ancak portal HTX'den sonra erken ölüm, şiddetli karaciğer hasarı ve aşırı nekroz, hücre okluzyonu ve/veya emboliye bağlanmıştır (13,44, 74). Hepatositler subkutan ve intramuskuler alanlara direkt olarak injekte edildiğinde yaşayamazlar (70).

İnterskapular yağ dokusunda ve renal kapsül altında yaşayabildikleri bulunmuştur (70, 75, 76).

Pulmoner damar yatağına (jugular venden) (77, 78), veya direkt olarak akciğer parankimine HTX yapıldığında canlılık sınırlıdır. Akciğerler oksijen saturasyonu ve kanlanmaları iyi olduğundan tercih edilirler. Damarlar yoluyla verilen hepatositlerin teorik olarak iyi beslenen bir lobda yerleşeceği kabul edilir ve burada hemodinamik respuratuvar fonksiyonları etkilemez. Alveolar kapillerler ve alveollerde (bir hücre / alveol) hepatositlere rastlanır. (13, 78). Fazla hücre verilmesi pulmoner emboliye neden olabilir (77). Splenik veya renal vaskuler yatağa doğru yapılan intraarterial infuzyondan sonra yaşayamazlar (79, 80). Pankreasa da HTX denenmiştir (81). Pankreas özelde endokrin bir organdır. Ancak hepatotrofik faktörlerin bir kaynağı olarak da kaydedilmiştir (44). Pankreas karaciğerle aynı embriyolojik köke ve gerektiğinde safra için extretuar kanala sahiptir (82). Bu özellikler pankreasın avantajlarını teşkil eder.

Perfuzyonu daha iyi olması ve portal sirkulasyonla yakın ilişkili olması avantajları yanısıra, süngerimsi yapıları nedeniyle en uygun olan ve en çok kullanılan transplantasyon sahası, dalaktır. (15, 43, 46, 68, 80, 83). Splenik pulpada hepatositlerin belirlenebilmesindeki kolaylık, intrasplenik HTX'in uzun dönem akibetinin araştırılmasını kolaylaştırmaktadır. Dalakta bu hepatositlerin organizasyonu belirli fazlarla ilerler. İnterasplenik injeksiyonu takiben hepatositler, birkaç yüz hücreden oluşmuş kümelerde gözlenebilir. Bu, trabeküle komşu venöz sinüslerin bazal membranlarıyla sınırlıdır. Pulpa kordonları ve kırmızı pulpada kümeler retiküler fibrillerle desteklenmiş olup; kırmızı pulpa veya dalak kapsülü altında da bulunabilir (14, 43, 82, 84, 85). Mitokondrial şişme ve sitoplazmik nükleer membranlarda düzensizliğin ilk 2-3 hafta içinde görülmesine rağmen; normal yapı, daha sonra tekrar kazanılır. İlk saatlerde belirgin olmak üzere ilk günlerde özellikle 7 güne kadar hücre sayısında belirgin bir azalma görülür ki buna; başlangıç kaybı denilir. Daha çok hücre izolasyonu

prosedürlerine özellikle de kollajenaz enzim metodu ile ayrıştırmanın hücrede yaptığı zarara bağlanmaktadır. Bu da daha sonra telafi edilir (4, 11, 15, 21).

Sellden (78), ISp.HTX'den sonra normal morfolojilerin ortaya çıkması için yaklaşık 2 aylık bir süre beklenilmesi gerektiğini; bu peryotta: nonproliferatif, nonfonksiyonel hatta dejenere olduklarını ortaya koymuştur. HTX'i takiben 2-3 ay içinde, hepatositler kordlarda rozetler ve pseudoasiniyle aranje olmaya başlar. Devamlı hepatosit proliferasyonu dalağın % 30-50 kadarını kaplayacak kadar ilerleyerek birkaç ayda bir "hepatizasyon"a götürür (71, 85, 86). Makroskopik patolojik olarak sarı-beyaz alanlar şeklinde seçilebilir (85, 86). Bu basamakta kalan hücreler dalağın kırmızı pulpasına yerleşirler; beyaz pulpaya yayılmazlar. Safra kanalikülü ve sinusoidal yapılaşma, endotelyal ve yağ depolayan hücreler dahil görülür (20, 73, 87). Hepatositler geniş sitoplazmalı, yoğun binükleer hücrelerdir. PAS (+) boyanan sitoplazmik granüller (glikojen) mevcut olmasıyla tanınır (43, 88).

Hepatosite özgün sitoplazmik markerler; glikojen, albumin, glukoz-6 fosfataz ve üre siklusu enzimleri bulunmuştur. Metabolik çalışmalarla, fonksiyonel olarak aktif üre siklus ve sitokrom P 450 sistemlerini (albumin salınımı, bilirubin glukronidasyonu ve organik anyonların temizlenmesine kadar), tecnetium 99 m, dimetil imino diasetik asit vs. ile gösterilmiştir. HTX ile albumin sentezi ve glikogenez gibi biyolojik aktiviteler gösterilmiştir (15, 36, 43).

Gupta ve ark.(72) transgenic teknikle işaretlenmiş G7HBV hepatosit sistemi kullanarak hepatositleri tespit etmiş ve; ISpHTX'den sonra karaciğere göç ettiklerini ve bu işlemin , hepatositlerin viabilitesini düşürdüğünü göstermiştir.

Çeşitli çalışmalarla dalağa yapılan hepatosit greftlerinin fare veya sıçanda uzun bir süre boyunca (aylar, yıllar) hatta hayvanın ömrü boyunca sağkalım gösterdiğini ortaya koymuştur (68, 85). Bu hepatositler dalakta

prolifere olurlar. DNA sentezlerinin oranı konakçı karaciğerindeki kadardır. (11).

Konakçı karaciğerinin bir parsiyel hepatektomisi, ektopik sahalardaki hepatosit proliferasyonunda bir dalgalanmaya sebep olur. Bu dolaşımdaki hepatotrofik maddelere bir cevap olduğunu destekler (11).

Gupta (19), ISpHTX'i takiben 10 ay sonra % 67 hepatektomi yapılan ratlarda proliferasyon indeksinin arttığını göstermiştir. Bu artış hücre kitlesinde değil sayıca olur. (89).

Proliferasyon indeksi (PI), antibromedeoxyuridin (BrdU) monoklonal antikor ile boyanmasıyla yapılır. Burada DNA sentezleyen hücrelerin direkt gözlenmesi esasına dayanır. Total hepatosit / işaretli hepatosit (500 hepatosit sayılarak) oranı hesaplanır (20, 90).

Grifits (7), karaciğer rejenerasyonunun çok ince bir homeostatik mekanizma ile ayarlandığını; normal şartlarda; karaciğerde hücre dönüşümünün oldukça yavaş olduğunu, bununla birlikte hasar olduğunda karaciğerin tüm hücre tiplerinde hızlı bir proliferasyon ile tamirin gerçekleştiğini, karaciğer hasarı yapılmayanlarda ise: HTX yapılan hücrelerin çoğunun dejenere olduğunu deneysel olarak göstermiştir (7).

Yapılan çalışmalarda: deneysel AKY ile aynı anda veya 24 saat evvel HTX yapılmasının 2. haftada 6/10-8/10'luk bir sağ kalım oranı sağlarken; 24 saat sonra yapıldığında bu oranın, 2/10'a düştüğü gözlemlendi (AKY'de sağkalım normalde 1/10 kadardır). Başka bir çalışmada rezeksiyonun 3-7 gün sonra yapılmasının daha uygun olacağı bildirilmiştir.(84, 86).

Henne, AKY'de fonksiyonel destek için karaciğer parankiminin % 20'sine ihtiyaç olduğunu , bunun da : 5×10^{10} hücreye tekabül eden 500 ml. lik bir süspansiyon verilmesi gerektirdiğini, bunu da ancak peritenoal kavitenin

alabileceğini belirtmektedir (91)Uygulamalarda ise tüm karaciğerinin ancak % 3-5'i kadar hepatosit kullanımı ile netice alınmıştır (4).

Hepatositlerin mikrotaşırıyıcı yataklara veya sentetik fiberlere tutturulduğunda veya biyoyumlu materyaller: mesela; alginate-polylysine gibi maddelerle enkapsüle edildiğinde intraperitenoal canlılık ve fonksiyonlarının iyi olduğu; mikrotaşırıyıcıya tutunmuş hepatositlerin periton boşluğunda neovaskularizasyon ve extraselluler matrix formasyonu ile hızla organize olduğu bulunmuştur (17). Peritonun, kullanılmasının kolaylığı, daha çok hücre verilebilmesi, komplikasyon riskinin az olması yanısıra büyük hayvanlarda da uygulanabilmesi avantajları vardır. Ancak verilen hücrelerin akıbetinin belirlenmesinde birtakım güçlükler vardır (83,84).

HTX'in bizzatihi karaciğere yapılmasının potansiyel avantajları olabilir. Bunlar karaciğerdeki hücre ve hücre matrix etkileşimlerini içerir. Hepatositlerin karaciğerde DNA sentezini hem situmule hem de inhibe edici "dual özellik"leri vardır (48). Lokal olarak salgılanan growth faktörlerle temas veya hepatik proteoglikonlara tutunma yanısıra besin, hormon, tanımlanmamış bazı faktörleri içeren portal kana bağımlılık önemlidir. Ancak; gerekliliği tam çözülememiştir (74). Bir çalışmada: portal akım olmadığında hepatositlerin atrofiye gittiği bildirilmiştir (15).

Yapılan çalışmalarda: EGF'nin DNA sentezini stimüle ettiği, bu etkinin insülinle sinerjist olduğu; TGF'nin ise DNA sentezini stimüle etmeyip; bipolar hücre morfolojisinde hızlı bir değişimi uyardığı bulunmuştur (44-45). Daha çok bir negatif sinyal görevi görür (22). HGF, hepatositlerde güçlü mitojenik etkisi olan bir protein growth faktördür (22). Hepatik rezeksiyon sonrası rejenerasyonu stimüle eder. Otokrin, parakrin ve endokrin trofik ve / veya mitotik etkileri vardır. Hücre proliferasyonunun devamlılığı ve lokamosyonuna etkilidir. HGF, RNA Kupffer ve hepatik endotelial hücrelerde tesbit edilmiştir. Başkaca birçok doku ve hücrede de bulunması multibl hedefleri olduğunu gösterir (92).

Pankreatik ve duodenal epitelde de yapılıp; karaciğere etkisini portal yolla yaptığı düşünülmektedir. Diğer bir antistres cevap da: heparin GF salgılanmasıdır. Ancak; bu faktörün hücre canlılığı ve proliferasyonundaki etkisi zayıftır (9).

İnsülin-like GF/somatomedin (IGF/SM)ler growth faktörlerin etkilerinin ortaya çıkmasında etkin endokrin faktörlerdir. Majör kaynağı karaciğerdir. Human plasental laktojen (hPL) indirekt olarak IGF₁, SM-C salınım ile ilgilidir (23-93). Bir insülin+EGF mixtürünün DNA sentezini stimüle ettiği bulunmuştur (21). Ayrıyeten insülin, glukagon, vazopressin ve prastoglandinlerin karaciğer rejenerasyonunu etkiledikleri bulunmuştur (20-22).

Gözün ön kamarasına (15), meme yağ dokusuna (94), HTX de denenmiştir.

Sadece bir enzimatik fonksiyonu ilgilendiren genetik defektlerde: primer olarak bozulan karaciğer bütünlüğünün yeniden kazanılması için; bu hastalara uzun dönemde retroviral organizasyonlu gen transferi yapılarak; hepatosit genomundaki bu genetik defektin düzeltilmesine yönelik hepatosit reimplantları araştırılmaktadır (87).

Hirai ve ark. experimental AKY'li hayvanlarda HTX'i etkili bulmuştur (4). Ancak bu etkinin nasıl olduğu açık değildir. Sağ kalım oranlarındaki artışın fonksiyonel ve canlı kalabilen bu hepatositlere mi, yoksa; enjekte edilen hücre fraksiyonlarına mı bağlı olduğu bilinmediği tespit edilmiştir (10-15-95).

Demetriou ve ark. allogenik ve syngeneik hücreler arasında bir fark olmadığı; hepatik yetmezlikte bir kaç gün evvel yapılan HTX'in hücrelerin organize ve vaskularize olarak daha etkin fonksiyon görür hale gelmesini sağladığı, immunsupresyona da gerek olmadığı sonuçlarına varmıştır (95).

Birçok çalışma, normal ve rejenere karaciğer dokusundaki hepatik rejeneratif stimulatör maddelerin tesbitine yöneliktir. Şu faktörler önemlidir:

- 1.Normal karaciğer dokusu verilmişse donör yaşı,
- 2.Extraktın preparasyonu ile PH arasındaki interval,
- 3.Extraktın hazırlanması esnasında geçen süre (48).

İntrasplenik olarak yapılan HTX'den sonra 12-20. haftalarda proliferasyon indeksi (PI): % 3 iken; PHdan sonra, PI , yükselmektedir (% 10). Bu devamlı mitotik aktiviteye bağlanmıştır (20). Karaciğer hasarının iyileşmesini ve rejenerasyonunu situmule edici hücrel faktörlerin sağkalımı yükselttiği sanılmakla birlikte; burada: hepatik yetmezliğin derecesi önemlidir (95). % 70 PH'den sonra kompensatuar hiperplazi ile karaciğer ağırlığı 10. günde tamamlanmaktadır (20). Makowka, D. Galaktozaminle induklenen AKY'de 4-5 gün içindeki mortaliteyi tavşanda: %71, domuzda: % 75 bulmuştur. ABO ve doku grubunun önemli olmadığını ancak konakçıyı sensitize ettiğini bildirmiştir (57).

En sık çalışılan hayvan modeli olan, ratlarda ISp HTX' de: dalakta uzun süre canlı kalabilen hepatositlerin, poligonal şekilleri, kord benzeri mimari ve PAS (+) boyanmaları ile belirlenebileceği; histolojik tetkiklerde HE, PAS G6Pase, Masson trikrom boyalarının kullanılabilceği, safra salgılanmasını göstermede safra akımının majör determinantı ve en yoğun anyonu olan safra asitlerinin kullanılabilceği araştırmalarla ortaya konmuştur (83,86,96).

Son zamanlarda peritoneal kaviteye 10 000 hepatosit / 30 pankreas adacık oranıyla yapılan Co-transplantasyonla adacıklardan salgılanan hepatosit growth faktörlerden faydalanmaya çalışılmaktadır (97).

2.4.3. HEPATOSİTLERİN HAZIRLANMASI VE SAKLANMASI

Deney hayvanlarında hepatositlerin eldesi için çeşitli metodlar kullanılmaktadır. En yaygın metod; modifiye Collagenase Digestion metodudur.

Enzimatik yolla bağlantıları koparılan hücreler, çeşitli tampon solusyonları ile yıkanıp; santrifüj edilerek homojenleştirmeye çalışılır (18, 60, 98). Adult rat karaciğerinde en uygun metod da budur. İnsan karaciğerinde de metod aynıdır. Ancak insan karaciğeri daha fibröz olduğundan; iki aşamalı enzim metodu kullanılır (22). Domuz karaciğeri ise; sirotik insan karaciğeri gibidir (78,99).

Rat ve insanda hepatik kollagenin en az 1/3ünü tip 1 ve tip 3 kollagen oluşturur. Bunlar, interstisyel kollagenlerdir (100).

Fötal dokuda monodisperse hücre eldesi daha kolaydır. Çıkarılan fötal karaciğerler (yaklaşık 6-10 fötus/karaciğer) küçük parçalara ayrılarak kıyma haline getirilip; özel bagetlerle ezilerek; belirli ölçüleri olan porlara sahip naylon veya çelik eleklerden geçirilir. Bu mekanik ayrıştırma sonrası elde edilen materyal, yine belirli solüsyonlarla yıkanır. En basit metod budur (13,27,73,101). İlaveten enzimatik ayrıştırma da kullanılabilir (11,75).

Her iki yolla da elde edilen süspansiyondaki hücrelerin viabilitesini kontrol için çeşitli metodlar önerilmektedir. % 0.2 lik Trypan blue veya % 0.04'lük Eritrocine B ile boyanan yayma preparatlarında viabilite: % 80-95 arasında değişebilir. Dye exclusion (boya alımı) testi denilen bu testteki mantık, viable hücrelerin bu boyaları almaması, non-viable hücrelerin boyayı içerilerine alarak görünür hale gelmesi esasına dayanır (11,85,87).

Çökelti, esasen 2 tip hücre içerir. Viable küçük nonparankimal hücreler (8-10 mikron) ki bunlar; muhtemelen Kupffer hücreleridir; ve epitelyal ve bilier epitelyal hücrelerle kontamine edilir. Diğer; hepatositler, bazen binükleer ve büyüktürler, poligonal şekillidir (30 mikron). Nonparankimal hücreler (npcs) % 1'den azdır (60,98,102,103).

Hepatositlerin bir kan bankası gibi depolanıp gerektiğinde kullanılabilmesi bir sistem idealdir. Ancak diğer hücre tiplerine göre hepatositler, oldukça duyarlı hücrelerdir. İzole hepatositler iyi saklanamazlar. Kültürlerinde de bir hafta içinde diferansiyasyona başladıklarından uzun süre

tutulamazlar (10). Matrijel inkubasyonları bu süreyi uzatabilir. Fonksiyonları da daha iyi korunur (104).

Ca alginat jelle enkapsulasyon hepatosit viabilitesini azaltırken (% 93'ten 60'a) sağkalımını artırmaktadır (% 50'den 70'e). (4).

Standart saklama süreçleri zararlı olabildiğinden; programlı dondurucular gerekmektedir (10). Mikroenkapsülasyon, dondurup saklamanın menfi etkilerinden hepatositleri korurken; fonksiyonlarında da bozulma olmaz. Bu tekniğin, iyi hepatositleri seçici olması da bir avantaj olup (10); mikrotaşyıcılara bağlanarak -80 °C'de 4-8 hafta saklanabilir (99).

Hepatositler, kültürde, süspansiyon halde yaşayamazlar. Ağsı yapı bağımlı olduklarından; basit bir injeksiyonda hücreler tutunacak yer bulamazlar. Fiber sistemlerle tutunma için yüzey arttırılarak besin ve gaz değişimi için de uygun bir ortam sağlanabilir (9). Solid destek sistemleri intraportal ve intrasplenik HTX komplikasyonlarını da azaltır (87).

Hepatositler, izolasyondan hemen sonra yapı ve fonksiyonca bozulmaya başlarlar (5). Saklama hasarının sebepleri iyi bilinmemekle birlikte; ATP kaybı, serbest oksijen radikalleri, hücre şişmesi, damar sistemi düzenindeki bozukluklarla ilgili olduğu sanılmaktadır. Hepatositler reperfüzyon hasarına da hassastırlar. Cold UW solusyonda 30 saat % 100 canlı kalabilmekte olup (105); - 5° C'de 7 güne kadar canlı kalması da araştırılmıştır (106). Viable hücre E.C.'a göre MUW solusyonunda daha fazladır (107). Ayrıyeten Bretschenide'nin Histidin, Katogluterat, triptofan (HTK), Krebs Hensleit (KH) solusyonları da kullanılmaktadır (61).

Standart koşullarda oda ısısında: hazırlanan hepatosit süspansiyonlarının, en geç 1-2 saat içinde transplante edilmesi önerilmektedir. (7,108).

2.4.4. DENEYSSEL AKUT KARACİĞER YETMEZLİĞİ

Deneysel olarak AKY sendromu oluşturabilecek hayvan modelleri iki esasa dayanır:

1. Total dehepatizasyon (total hepatektomi veya devaskülarizasyon ile);
2. Cerrahi dehepatizasyon (Cerrahi veya toksik) (109).

Kaudat lop hariç tüm loblar çıkarılarak yapılan % 90 hepatektomide mortalite % 90'dır (İlk 24-72 saatte) (109). % 80 rezeksiyon + portakaval şantta mortalite % 93 (14,77), % 75 rezeksiyon + portakaval şantta mortalite: (48 saat içinde) % 80'den fazla bulunmuştur (18). İlk 24-72 saatte ölüm çoktur. Massif hepatektomiden sonra erken safhada mortalitenin yaygın nedeni hipoglisemidir. Diğerlerini anatomik ve hemodinamik nedenler oluşturur (109).

% 90-95 hepatektomi (massif parsiyel dehepatizasyon) sonrası karaciğer histolojisi, 24 saatte değişmeye başlar. Yağlı dejenerasyon, konjestif fenomen (sentrilobuler bölgede), mikroveziküler steatozis, hepatosit rejenerasyonu ve sayısız mitoz görülür (109).

Kimyasal ve toksik ajanlarla da AKY geliştirilebilir.

1. Dimetil nitrozamin: Devamlı verilirse kanser, yüksek dozda AKY, düşük dozda, intermittant ve subtoksik dozda verilirse siroz yapan bu ajan, AKY dozunda: şiddetli intraperitoneal hemoraji, sentriober nekroz ve komplet lobul hasarı ile 6 günde ölüme götürür (13).

2. D. Glaktozamin; 2.6 gr/kg dozunda intraperitoneal enjeksiyonla verildiğinde 3-8 günde (maximum 4-5. günlerde) % 94 mortaldir. Ancak değerlendirmesi zordur (57,99). Kupffer ve makrofajlar, D. Galaktozamin'in uzaklaştırılmasında etkindir (23).

3. Karbon tetra clorür (CCL₄): Karaciğer yapısında ağır değişiklikler yapar. Hepatik kord yapısında bozulma, hepatik vakuolizasyon, nekroz,

konjesyon, ileri derecede şişmiş balon hücreler, karaciğer mimarisinde genel bir kollaps, sinüzoidlerde azalma, kaybolma, Kupffer ve binükleer hücre değişimlerine neden olur (1).

AKY kontrolü: SGOT, arteriyel keton cisimcikleri oranı (AKBR), fagositik indeks (Kupffer aktivitesi), hepatosit viabilitesi, histolojik inceleme (5) ve bilirubin -stresle ve karanlık-aydınlık fazıyla değişebilmekle birlikte- (16) tetkikleriyle yapılır.

Cerrahi prosedür ve sonrasında external ısı, 25° C'de internal ısı, 38,5 °C'de tutulmalıdır. Anestezi olarak hafif eter anestezisi tercih edilmeli ve en fazla 25 dakika sürmelidir. Cerrahi teknik nonsteril olabilir ama temiz çalışılmalıdır. Postoperatif glikoz takviyesi uygun olur (14,18,109). Numuneler için 1 cc. kuyruk kanı veya retroorbital kan (mixed), 10 cc. arteriyel (aortadan ölüm esnasında) alınabilir (85).

Postoperatif klinik değerlendirmede aşağıdaki skorlama modifiye edilmiştir (109):

- +++: normal postür ve aktivite,
- ++: normal postür; azalmış aktivite,
- +: azalmış cevap ve bir yan üzeri yatış hali,
- : koma hali

Klinik değerlendirmede kullanılan diğer bir metod da: Nose Poke Exploration Activity Behavioral Test'tir. Spontane aktivitelerin özel fotoselli bir sistemle çalışan kompüterle, burun dürtülerine cevaplar sayılarak skor indeks (sayım/saat) olarak hesaplanması esasına dayanır (85).

2.4.5. FÖTAL HEPATOSİT TRANSPLANTASYONU

Fötal karaciğerlerden hazırlanan hepatositlerin temininde kullanılan teknikler aduittakilere göre kolaylıklar sağlar. Henüz gelişme çağında bulunan

bu hücrelerle tedavi konusu son yıllarda daha da ilgi çekici hale gelmiştir (54). Fötal hepatositlerin D. Galaktozaminle induklenmiş, AKY'de mortaliteyi azalttığına dair sonuçlar mevcuttur. AKY'de kritik bir seviyede olan karaciğer fonksiyonlarında: yapılacak bir fötal HTX ile, sağlanacak çok küçük değişikliklerin bile metabolik bir destek sağlayarak mortalitede önemli iyileşmeler sağlayabileceği düşünülmektedir (62). Burada subsellüler bazı fraksiyonların, elementlerin, HGF veya hatta bazı hücrel enzimlerin (sitolizden sonra fonksiyon gören) etkilerinin de olabileceği gözardı edilmemelidir (70).

Fötal hepatositlerin mitoz ve diferansiyasyona daha yatkın blast hücreler içermesi, metabolik yönden oldukça aktif olmaları, uygun ortamlarda hızlı bir çoğalmayla yüksek sayılara ulaşabilmelerini sağlar (110). Fötal hepatositlerin zayıf immunolojik özelliklerinden dolayı; doku reddi reaksiyonuna (GVHD) uğramaması leyhde olan çok önemli bir özelliktir (70,111).

Fötal hepatosit naklinin diğer bir avantajı, kliniğe uygulanarak olumlu sonuçlar alınmış olmasıdır. Bu da; fötal karaciğerin 2. trimestr başında hematopoezin yeri olması ve bu nedenle bol miktarda hematopoitik blast hücreler içermesidir (6,21,22,28,67,73,112,113,114,115,116,117).

Memelilerde fötal karaciğer, uygun dönemlerde: varsa az miktarda T lenfosit içeren zengin bir hematopoitik stem hücre kaynağıdır. Bu özellikten faydalanılarak hematopoitik bozuklukları düzeltmede son yıllarda sıkça kullanılmaya başlanmıştır (67).

Morfolojileri belirgin bir lobuler mimari veya kord yapısı göstermeyen ve irreguler bir yapı ve fonksiyona sahip olan fötal karaciğer, hematopoitik hücrelerin birçok öncüllerini içerdiğinden daha çok kemik iliği gibidir. Ancak matür T cell'den yoksun olduğundan ;muhtemelen, GVHD daha az olur. ALL'li

hastalarda kullanılan FLC ve CBC (Cord Blood Cell) nakillerinde GVHD'nin sadece grade I'i bazı vakalarda görülmüştür (27,118,120).

Çalışmalarda fötal karaciğer hücreleri AKY yanında: , Bare Lenfosit Sendrom, Kombine Immün Yetmezlik (SCID) ve lenfopoietik malignansilerde de oldukça başarılı bir şekilde kullanılmıştır (6,26,115,119,121).

Myeloid lösemide retrospektif çalışmalarda tam remisyon, yedi veya daha fazla fötal hepatosit enfüzyonu alanlarda: % 71 bulunmuştur. Enfüzyon intervali 3 günden az ise; % 100' e yakın, 7 günden fazla ise; % 59 kadardır. Buradaki etkide: hücrelerle beraber sunulan growth faktörlerin bir kokteylinin kemik iliği hematopoiezinin optimal stimülasyonu yanında; sellüler proliferasyon inhibitörlerinin de rolü vardır (6,115).

Fötal karaciğer hücreleri, fötal pankreas hücrelerinin adidif etkisinden faydalanılarak beraber kompozit greftleri yapılarak; ince barsağa intramural, renal subkapsüler ve intramuskuler olarak kullanılmıştır. 24 saat kriyo-prezerve canlı olarak saklanabilen bu greftte resiprokal trofik etkilerden faydalanılmıştır (110).

Fötal karaciğer nakli konusunda Tauraine ve ark.nın birçok çalışması mevcuttur. Tauraine, thalassemia major ve kombine immün yetmezlikte umbilikal venden veya ultrason altında intraperitoneal fötal hepatosit uygulamaları ile insanlarda oldukça ilginç sonuçlar almıştır. Fransa'da, 16 yılda, 213 fötal doku transplantında: kombine immün yetmezlikte: % 50, aplastik anemi ve diğer konjenital metabolik bozukluklarda: % 79'luk bir sağ kalım (1-16 yıl) bulmuştur. Donör ve recipient uyumsuzluğuna rağmen; önemli bir immün probleme rastlamamıştır. HLA karşılaştırması gerekmediği ve prenatal (intrauterin) uygulanabilirliği de kaydedilmiştir (25).

2.4.6. RED OLAYI VE GVHD

Klinikte alıcının immun sisteminin transplante edilen grefte yönelik ve greftin hasarına yol açan reaksiyonlara red olayı denmektedir. Burada: greft T lenfositleri ile alıcı doku grubu antijenleri arasında bir etkileşim söz konusudur. Organ nakillerinde GVHD, tek yumurta ilişkileri hariç, mutlaka görülür. Fakat boyutları farklıdır. Burada: verilen hücre sayısı ve bunların immunolojik etkileri ve doku grup uyumsuzluğu önemlidir. 3 tip red olayı vardır:

1.Hücrenel red: Genelde ilk 15 gün içinde çıkar. % 50-100 görülür. Mononukleer hücre infiltrasyonuna bağlı çeşitli organlarda fonksiyon bozukluğu vardır. Portal ve periportal hepatit, dekstrüktif kolanjit ile portal ve hepatic ven dallarının endotelit ve flebiti söz konusudur (63,64).

2.Duktopenik (kronik) red: 6 hafta ile 6 ay arasında görülür. Skar oluşumu ön plandadır. Safra kanalı kaybı ve köpük hücreli arteriopati olur (63,64).

3.Hiperakut red: Karaciğer naklinde bu görülmez (63).

Red olayı, immunsupresiflerle % 90 kontrol altına alınabilir (63,64).

Hepatosellüler transplantasyonda red olayı, düşük seviyede veya yoktur. Erken posttransplant (10 gün- 2 hafta) dönemdeki hafif ve orta derecedeki allograft disfonksiyonunun, daha çok sekonder iskemiye bağlı olduğu ve karaciğer rejenerasyonu ile 20. günde düzeldiği kaydedilmiştir (65).

Hepatosellüler transplantasyonda: süspansiyonların, T hücreleri ve türevleri yönünden fakir olmasının yanısıra; fetal karaciğer dokusunun içerdiği hücrelerin antijenik yapılarının da zayıf olması, onlara ilave bir avantaj kazandırmaktadır.

Halbuki genotip olarak HLA uyumlu donörlerden bile alınsa thalasemia major'de yapılan kemik iliği nakillerinde: 2-4. derecede GVHD'yi: % 17, rejeksiyonu: % 13 bulunmuştur (122).

Ravikumar, uzun dönem başarının allograft rejeksiyonunu önleyebilecek genlerin gen terapi yardımıyla immun cevabın bastırılabilirliğini ifade etmektedir (46).

Klinikte: organ nakli sonrası gelişen immun graft disfonksiyonu yapılan biopsilerle değerlendirilebilir. Seri TAC (Transplant Aspiration Cytology) biyopsiler, semikantitatif olarak skorlanır. Lenfosit aktivasyonu bakımından:

0= İmmun aktivite yok

1= < % 10

2= % 10-25

3= % 25-50

4= % 50-90

5= > % 90

(Lenfositoz > lökositlerin, % 30'u, lenfopeni lökositlerin % 8'i olarak)

Parankimal hasar bakımından:

Hepatositler

1. Normal

2. Şişmiş

3. Vakuolize

4. Nekroz

Kolestaz bakımından

0. Yok

1. Hafif

2. Orta

3. Şiddetli olarak skorlanır (123).

3. MATERYAL VE METOD

Çalışmada 4 grupta: 14 deney ve 6 kontrol olmak üzere 20 matür sıçan kullanıldı. Fötal hepatositlerin temini için 4 adet gebe sıçan kullanıldı. Pilot çalışmalarda ise yaklaşık 30 adet sıçan, prosedürün standartize edilmesi için kullanıldı. 250-310 gr. ağırlığındaki Wistar Albino tipi sıçanlar, standart bakım koşullarında tutularak; oda ısısında hazır pellet yem ve şehir şebeke suyu verildi.

Transplante edilecek fötal hepatositleri temin için: 2. trimester sonu ve 3. trimester başındaki gebe ratlardan elde edilen fötal karaciğerler kullanılmıştır. Öncelikle, 2 haftalık bir cinsel perhiz için ayrı tutulan ratlardan, 4 dişi ve 1 erkek çiftleşme için bir gece için aynı kafesde tutularak sabah dişi ratların vaginal smearlarda sperm tesbiti yapıldı. Müspet bulunanlar için tarih; gebelik için 0. gün olarak kaydedilerek başka bir kafese ayrıldılar. 14, 15 ve 16. günde bulunan gebe ratlar, sezaryen için kullanıldı. Hafif eter anestezisini takiben batın steril koşullarda açılarak; fetüsler hızlı bir şekilde steril koşullarda bir petri kutusunda biriktirildi (6-10 fetüs/gebe rat.).(Resim 1, 2)

Herbir fetüsün batını sağ taraftan yapılan küçük bir insizyonla açıldı. Bu işlem karaciğerin batın dışına taşarak belirgin bir hal almasını sağlar. Özellikle barsaklar, mide ve pankreas gibi çevre organların zedelenerek; fötal karaciğeri kontamine etmemesine özellikle dikkat edilerek karaciğerler ekstirpe edilip başka bir petride havuzlandı. Kontaminasyon şüphesi olan karaciğer dokuları işleme dahil edilmedi. Toplanan fötal karaciğerler, +4 °C'de soğuk Hank's Ballanced salt solution (HBS) solüsyonu ile yıkanarak kan bulaşığından elimine edilmeye çalışıldı. (Resim 3, 4)

Fötal karaciğerler, bisturi yardımıyla daha küçük parçalara ayrılarak hücre disosiasyon ekipmanının, por aralığı ölçüsü 0.104 mm. olan çelik eleğinden özel cam bagetlerle nazikçe bastırılarak; (Sigma CD-1 ve S. 1145, K. 3878 ve T. 8279 kod nolu cihazlar) mekanik bir filtrasyona tabi tutuldu. Bu işlem esnasında yine soğuk HBS tamponu kullanıldı. Gebe ratların birinden

çıkarılan f3tal karaciğerler bir seans için kullanıldı. İçinde yine HBS bulunan steril bir petride toplanılan f3tal dokular, cam pipetle birkaç defa aspire edilip tekrar petriye bırakılarak yıkama işlemi ve homojenizasyon gerçekleştirildi. (Resim 5).

Toplanan dokular vakit geçirilmeden yine (4 3C HBS) 5 cc tampon sol3syonu içinde bir deney t3p3ne alınarak; 600 devir / dk. hızla, 10 dk., santrif3je edildi. Santrif3j işlemi, 3kelti 3zerinde kalan s3pernatant atılıp yeniden 5 cc HBS eklenerek ve her defasında s3pernatant atılarak 3 kez tekrar edilmek suretiyle yıkama işlemi tamamlandı. Daha y3ksek hızların h3cre viabilitesini olumsuz etkileyeceği d3ř3n3ld3. Son santrif3jden sonra 3kelti tampon sol3syonu ile s3spanse edildi ve buzdolabında +4 3C'de bekletildi.(Resim 6)

Trypan blue dye exclusion test için ayrı bir test t3p3ne 0.3 ml HBS, 0.5 ml trypan blue (% 0.4'l3k) ve 0.2 ml. h3cre s3spansiyonu ilave edilerek (dilusyon fakt3r3 5) iyice karıştırıldı ve 5-15 dk. beklendi.

Tripan mavisinin 3l3 h3crelerce alınması esasına dayanan bu test için hemositometreye bir past3r pipetle, kapatılan sayım lamelinin hemen kenarından, bu s3spansiyondan verildi. (Resim 7, 8)

mm^3 (ml)deki h3cre sayısı = Her karedeki ortalama sayı x dilusyon fakt3r3 x 10

Total h3cre = ml. deki h3cre x alınan s3spansiyon 3rneğinin orijinal vol3m3

% h3cre viabilitesi = $\frac{\text{Total viable h3cre (boyanmamış)}}{\text{Total boyalı h3cre (boyanmış)}}$

form3lleriyle h3cre değerleri hesaplandı. Bu bilgiler yardımıyla 0,1 ml'ye 2×10^6 f3tal hepatosit olacak şekilde s3spansiyon ayarlanmaya çalışıldı. Hata ve ark.(70) tarif ettiği metodun bir modifikasyonu ile hazırlanan hepatosit

süspansiyonu nakilde en fazla bir saat içinde kullanıldı. Çalışmada kullanılan HBS tampon solüsyonları devamlı +4 °C’de saklandı.

Deney gruplar şu şekilde oluşturuldu.

1. Deney grubu:

Dalak parankimine 2×10^6 sayıda fetal hepatositin insülin iğnesiyle (yaklaşık 0.1 ml) alt kutuptan verilmesini (prosedür esnasında verilen hücrelerin kaçışını engellemek için dalak hilusuna parmakla geçici bir bası yapılarak) takiben 4 aylık bir bekleme süresini takiben % 85’lik bir parsiyel hepatektomi ile deneysel akut karaciğer yetmezliği oluşturulan 7 adet ratdan oluşturuldu. (Resim 9)

Ratlar: mortalite, modifiye klinik skorlama, biyokimyasal parametreler yönünden takibe alındı. Kritik dönem olan ilk 72 saat boyunca belirli saatlerde daha sonra belirli günlerde kontrol gerçekleştirildi. Ölen ratların dalak ve karaciğerleri histolojik inceleme için formole alındı. Kan glikoz düzeyleri, Glucotest (Bayer) test striptleriyle kuyruk kanından ölçüldü. Alınabilen deneklerden ölüm anında arteriyel kandan (aortadan) geniş biyokimyasal teknikler için numune alındı.

2. Deney Grubu:

Hepatosit nakli ve parsiyel hepatektominin aynı anda yapıldığı 7 adet rattan oluşturuldu. Deney işlemi 1. grubla aynı şekilde gerçekleştirildi. Klinik ve laboratuvar değerlendirmeleri de aynı usullerle yapıldı.

3. Kontrol Grubu:

% 85 hepatektomi yapılan 6 sıçana prosedürde kullanılan HBS tampon solüsyonundan 0,1 ml. aynı yolla dalak parankimine verilmesiyle oluşturuldu.

Parsiyel hepatektomi için steril şartlar altında açılan batında sağ ve sol lob tamamen (damarları bağlanarak) sol inferior lob da çıkarıldı ve geriye kaudat lob kaldı. Kanama kontrolü yapıldıktan sonra önce periton daha sonra batin cildi

usullerine uygun olarak kapatıldı. İşlemler hafif eter anestezisi altında gerçekleştirildi (Max 15 dk). (Resim 11)

İntrasplenik süspansiyon enjeksiyonu da, steril şartlarda yapılan küçük bir sol karın kesisi ile dışarıya alınan dalağa alt kutuptan parankime doğru 25 no iğne ile gerçekleştirildi. İşlem esnasında organın pedikülüne geçici bir oklüzyon uygulanır. Kanama kontrolünü takiben batın usulüne uygun olarak dikilir. Geçici damar oklüzyonunun buradan % 40'a varan hücre kaybını engellediği bildirilmektedir (5) (Resim 9).

Klinik değerlendirme için şu skorlama kullanılmıştır (109).

Öncelikle ölen ratların ölüm saatleri kaydedilerek sağkalım hesaplarında kullanılmıştır.

- 0 = Koma hali, hareketsiz, uyarılara cevapsız
- + = Azalmış cevap ve bir yan üzeri yatış hali
- ++ = Normal postür, azalmış aktivite
- +++ = Normal postür ve aktivite.

Histolojik incelemeler için alınan materyaller temizlenip, küçük parçalara ayrılarak nötral formal saline alındı. Tesbiti takiben rutin parafin takibi uygulandı. 5 mikron kalınlığında alınan kesitler H & E ile boyanarak Olympus PM-10 AD fotoataşmanlı ışık mikroskobu ile incelendi.

4. BULGULAR

Deneyler öncesinde yapılan harici muayenelerde ratlarda başkaca bir patoloji olmayıp; canlı ve sağlıklı idiler. Deney öncesi kan glikoz düzeyleri kuyruktan alınan periferel kanda 100-130 mg/dl arasında değişmekteydi.

FLC HTX için hazırlanan fõtal hücrelerin viabilitesi, tripan blue testinde: % 80-90 arasında hesaplanmıştır.

Deney 1 grubuna parsiyel hepatektomi ile oluşturulacak akut karaciğer yetmezliğinden 4 ay önce (120 gün) yapılan intrasplenik fõtal hepatosit nakli, herhangi bir mortalite ve komplikasyona neden olmadı.

Her 3 gruba da aynı günlerde yapılan % 85'lik parsiyel hepatektomiden sonra mortalite değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Buna göre ilk 72 saatte Deney 2 ve Kontrol gruplarında yüksek bir mortalite söz konusudur. Deney 1 grubundaki canlılık önemli derecede yüksekti. (Tablo 2)

Operasyon sonrası klinik skorlama değerleri de Tablo 3'de gösterilmiş olup; özellikle Deney 2 grubu oldukça düşük bir klinik skor göstermiştir.

PH. sonrası glikozemi düzeyleri deney öncesi düzeylerle karşılaştırıldığında bütün gruplarda önemli derecede düşüktü. İlk saatler ve ilk günlerde belirgin bu düşük glikoz düzeyleri, Deney 1 grubunda canlı kalan ratlarda hafif yükselmelerle bir müddet daha devam etmektedir. Ex olan ratlarda ölüm öncesi düzeylerin normalden hayli düşük olması ilgi çekiciydi. (Değerler Tablo 3-4 dedir.)

PH prosedürlerinden sonra sadece birkaç vak'ada yeteri kadar alınabilen arteriyel (aortadan) kanda bakılan karaciğer kimyasına ilişkin biokimyasal veriler sayıca yetersiz bulunduğundan değerlendirmeye alınmadı.

Deney 1 grubunda 4 aylık bekleme süresi sonrası dalağın makroskopik olarak incelenmesinde yer yer beyaz-sarı alanlar içerdiği, (Resim 10) histolojik incelemelerde; dalak parankimasında kırmızı pulpada yer yer hepatosit kümeleri

veya birkaç hücrelik hepatosit topluluklarına rastlanıldı. Bu hücreler genellikle tek, bazen 2 çekirdekli olup, geniş sitoplazmaları ve poligonal şekilleri ile kolayca ayırd edilebiliyordu. 4 aylık bir süre canlı kalabildiği gözlemlendi. (Resim 12)

Deney 2 grubunda; dalakta yer yer hepatosit topluluklarına rastlanılsa da Deney 1 grubu kadar bariz değildi. Deney 2 grubunda da Deney 1 grubu gibi bu hücrelere beyaz pulpada rastlanılmayıp; kırmızı pulpada özellikle beyaz pulpaya yakın çevrede yoğunlaştığı gözlemlendi. (Resim 13)

Kontrol grubunda dalaklar normal dalak histolojisi bulguları vermekteydi. Verilen 0,1 ml. HBS solüsyonunun belirgin bir histomorfolojik değişiklik yapmadığı görüldü. (Resim 14)

Tüm grupların karaciğerlerinde histopatolojik bir değişime rastlanılmamış olup; normal karaciğer mimarisi gözlemlendi. (Resim 15)

Bütün gruplarda: bir yabancı cisim reaksiyonu veya greft reddini düşündürecek bir hücre infiltrasyonu, hücre dejenerasyonu ve nekrozuna ait bir bulguya rastlanılmadı. Dalak histolojisi hücresel seviyede normaldi. (Resim 13).

	Vaka No							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Deney 1	24. sa.	44. sa.	8. g.	15. g.	18. g.	Canlı *	Canlı *	Canlı *
Deney 2	1. sa.	2. sa.	3. sa.	4. sa.	1. g.	4. g.	_____.	_____.
Kontrol	20. sa.	20. sa.	34. sa.	60. sa.	18. g.	20. g.	_____.	_____.

Tablo 1: Deney ve kontrol gruplarında mortalite zamanları
(* : 1. ay sonrası hala canlı kaldığı tesbit edilmişlerdir)

	24 saat	48 saat	72 saat	7 gün	15 gün	30 gün
Deney 1	% 12	% 25	% 25	% 25	% 50	% 62
Deney 2	% 66	% 83	% 83	% 100	% 100	% 100
Kontrol	% 33	% 50	% 66	% 66	% 66	% 100

Tablo 2: Belirli zamanlardaki mortalite yüzdeleri

		1. saat	4. saat	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat	7. gün	15. gün
D E N E Y 1	1	0	0	0	EX				
	2	0	0/+	0/+	0/+	EX			
	3	0/+	+	+	+	+	+	EX	
	4	+	+	++	++	++	++	+++	+++
	5	+	++	++	++	+++	++	+++	+++
	6	+	+	++	++	++	+++	+++	+++
	7	+	++	++	++	++	+++	+++	+++
	8	+	+	++	++	++	++	+++	+++
D E N E Y 2	1/5	0/EX							
	6	0	0	0	0/+/EX				
K O N T R O L	1	0	0	0	EX				
	2	0	0	0/+	EX				
	3	+	0/+	+	+	EX			
	4	0/+	0/+	+	0/+	+	EX		
	5	+	+	+	+	+	++	+++	+++
	6	0	0/+	0/+	++	++	++	++	+++

Tablo 3: Belirli saatlerdeki klinik skorlar (Emond'dan modifiye edilmiştir (69))

- 0: Koma hali, hareketsiz, uyarılara cevapsız
- +: Azalmış cevap ve bir yan üzeri yatış hali
- ++: Normal postür, azalmış aktivite
- +++ : Normal postür ve aktivite.

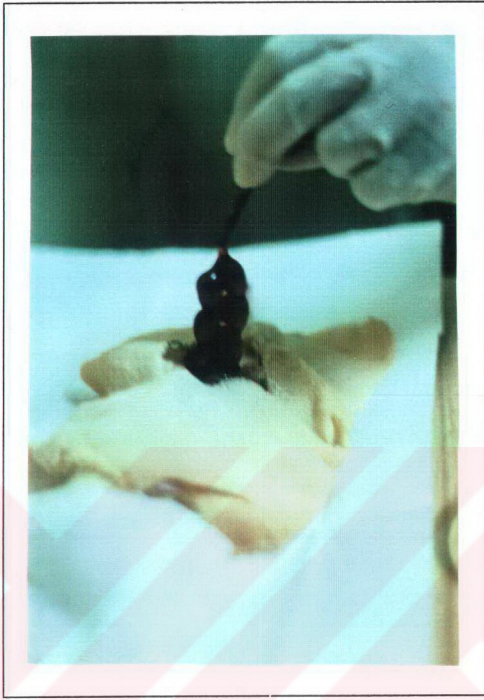
	Vaka no	4 saat	12 saat	24 saat	48 saat	72 saat	7. gün	15. gün
D E N E Y İ G R U B U	1	40	40	-	-	-	-	-
	2	40	45	40	-	-	-	-
	3	30	35	30	55	60	-	-
	4	60	?	70	65	60	?	-
	5	70	50	80	80	?	80	130
	6	40	40	40	60	70	60	?
	7	50	40	55	60	80	80	?
	8	50	45	60	65	80	85	110
	ORT	47	42	53	64	70	76	120
D E N E Y G R U B U	1	20*	-	-	-	-	-	-
	2	15*	-	-	-	-	-	-
	3	30	-	-	-	-	-	-
	4	20	-	-	-	-	-	-
	5	30	-	-	-	-	-	-
	6	40	35	40	-	-	-	-
	ORT	25	35	40				
K O N T R G R U B U	1	30	25	-	-	-	-	-
	2	40	20	-	-	-	-	-
	3	60	40	40	-	-	-	-
	4	30	30	20	40	-	-	-
	5	50	40	35	40	60	60	110
	6	40	40	35	45	60	65	105
	ORT	41	32	32	42	60	62	107

Tablo 4: Deney ve kontrol gruplarında kan glikoz değerleri (mg/dl. olarak)
(* Ölüm esnasında 4. saatten evvel alınmıştır)

- Ölüm nedeniyle ölçülemeyen değerler

? Numune alınmamış veya test hatalıdır

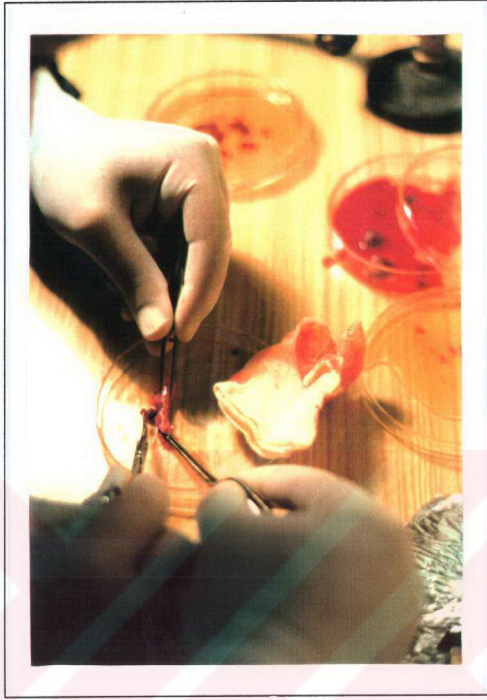
Not: Rakamlar 1-2 mg/dl.a kadar yuvarlanmıştır.



Resim 1: Fötüslerin steril şartlarda çıkarılması



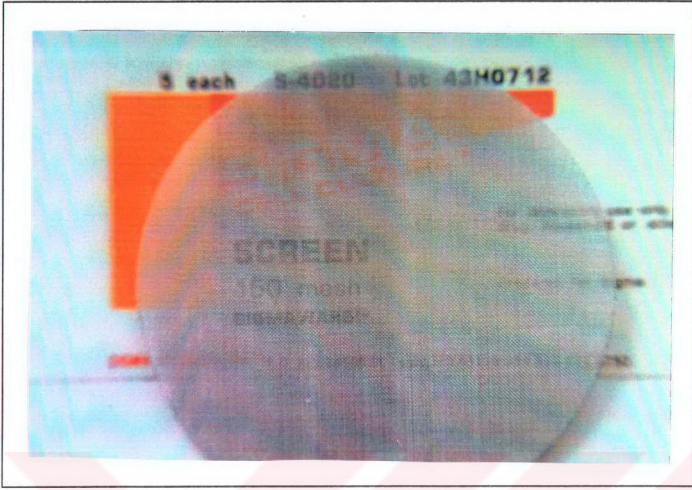
Resim 2: Bir petri kutusunda alınan fötüsler



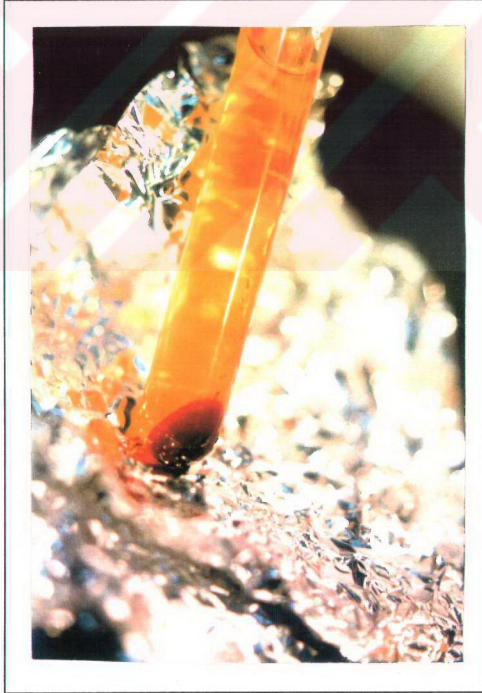
Resim 3: Föetal karaciğerlerin çıkartılması işlemi



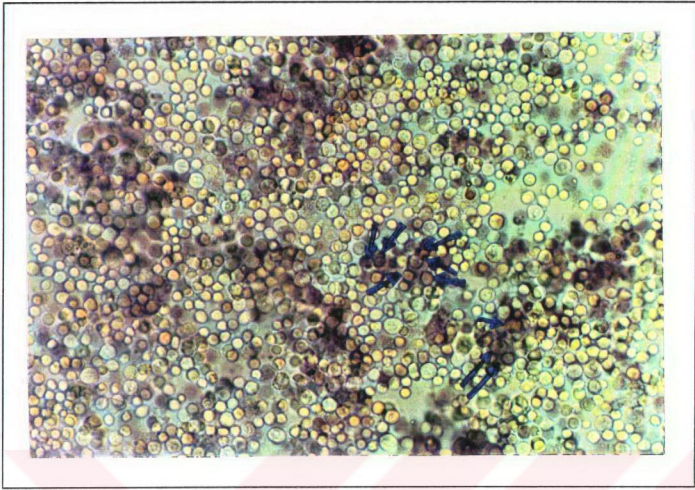
Resim 4: Bir petri kutusunda HBS içine alınan föetal karaciğerler



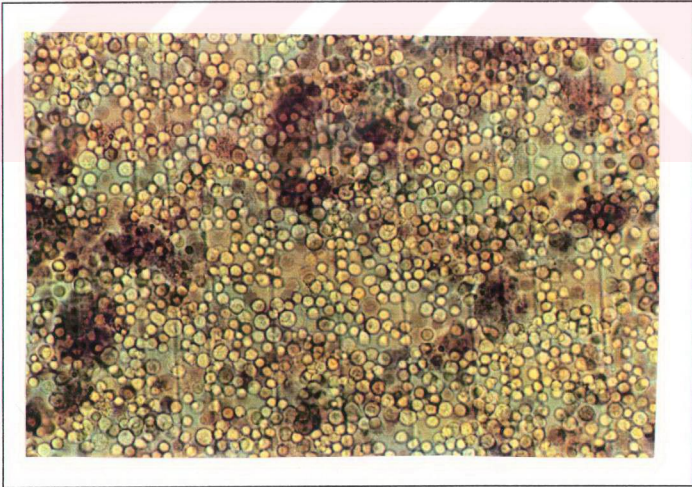
Resim 5: 0.104 mm. por aralıklı screen mash aparatı.



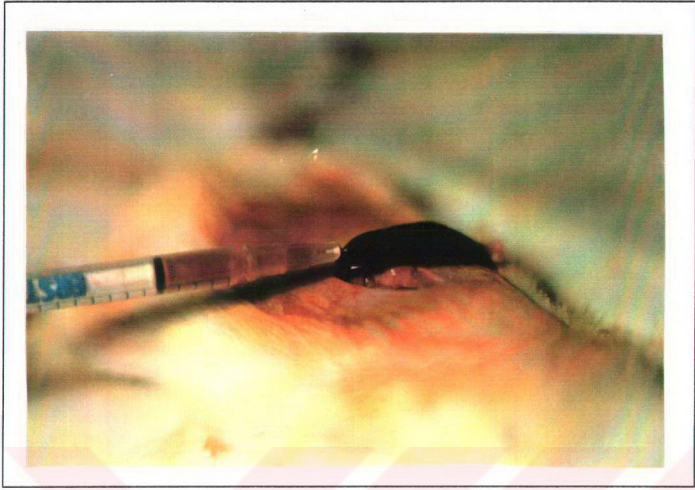
Resim 6: Deney tüpünde santrifüj sonrası çökeltili halindeki hepatösitler



Resim 7: Tripan blue testinde hücrelerin görünümü (X 200)
→ işaretli koyu boyalı hücreler: nonviabledir



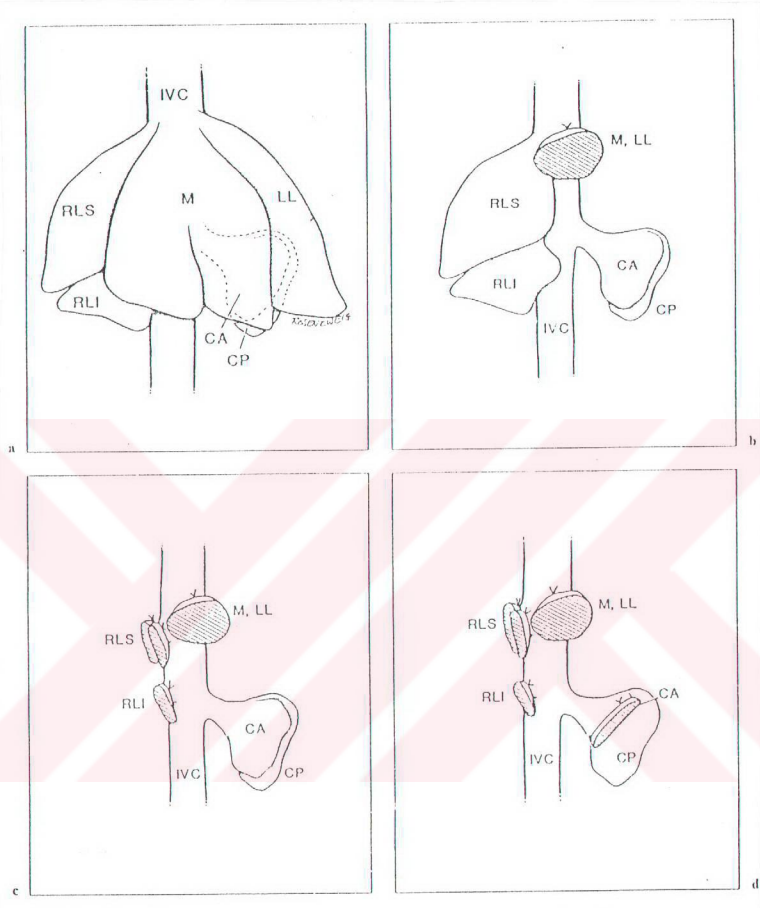
Resim 8: Hücre sayım lamında hepatositlerin görünümü (X 200)



Resim 9: Hazırlanan hücre süspansiyonunun dalağa injeksiyonu



Resim 10: HTX sonrası (4 ay sonra) çıkarılan dalağın makroskopik görüntüsü



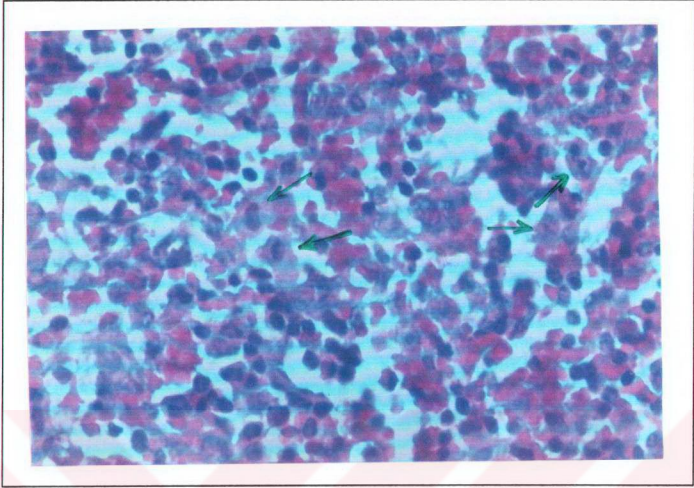
Resim 11: Ratta hepatektomi yüzdeleri

- a) İntakt rat karaciğeri
- b) % 70 hepatektomi yapılmış
- c) % 90 hepatektomi yapılmış
- d) % 95 hepatektomi yapılmış

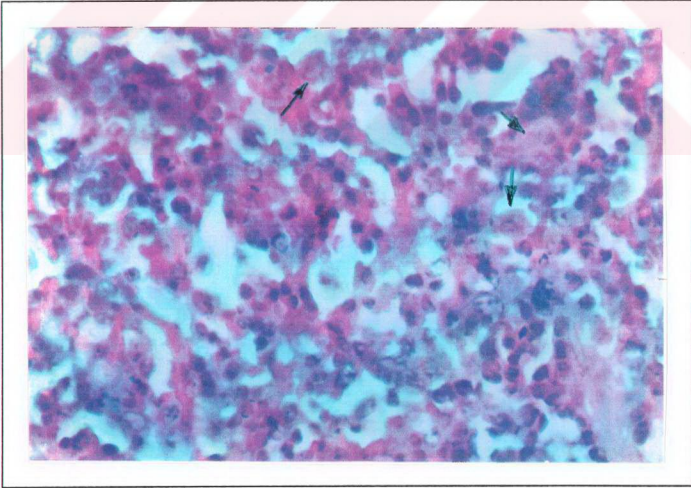
IVC: İnférieur vena cava m: Median lob LL: Sol lateral lob

RLS: Sağ lobun sup. parçası RLI: Sağ lobun inf. parçası

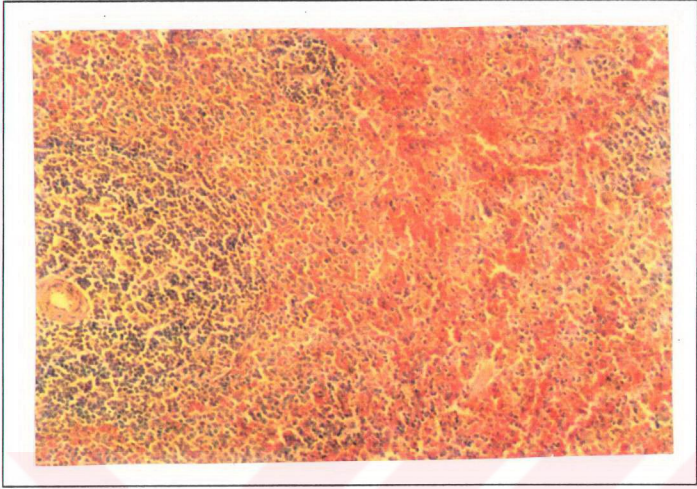
CA: Caudat lobun ön parçası CP: Caudat lobun post. parçası



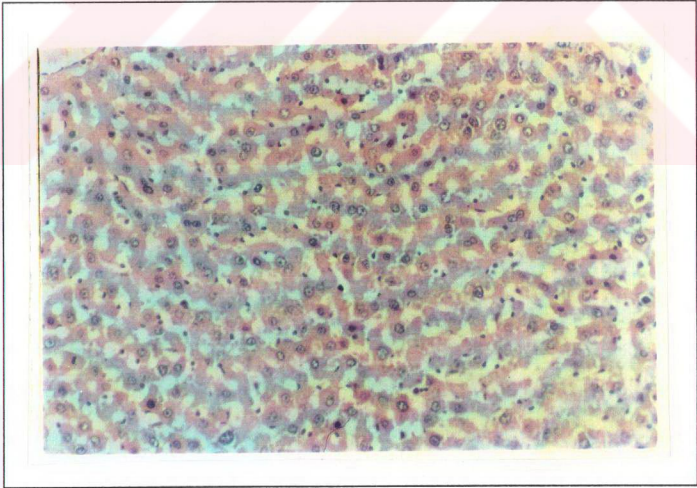
Resim 12: Deney 1 Grubunda dalağın histolojik görüntüsü (HE X 400)
(→ işaretli hücreler hepatositlerdir.)



Resim 13: Deney 2 Grubunda otopside alınan dalağın histolojik görüntüsü (HE X 400)



Resim 14: Kontrol grubunda 18. gün alınan dalağın histolojik görüntüsü (HE X 100)



Resim 15: Deney 1 grubunda otopside alınan karaciğerin histolojik görüntüsü (HE X 200)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Selektif hepatosit transplantasyonu organ transplantasyonuna göre farklı potansiyel avantajlarına sahiptir. Akut hepatik yetmezlik veya izole hepatik hasar gibi spesifik antitelerde fonksiyonel hepatik replasmanı sağlayabilir. (10, 14).

Özellikle pediatrik dönemdeki artan donör sıkıntısı major bir problemdir. HTX'in teorik faydaları giderek klinik uygulamalarla pekiştirilmektedir. (17, 70, 74).

Fötal karaciğer hücreleri, hem karaciğer hem kemik iliği gibi fonksiyon gördüklerinden kemik iliği nakli gereken hastalarda klinik olarak uygulanabilir. (26, 27). Ancak Akut karaciğer yetmezliğini tablosunda FLCTX uygulamaları sınırlıdır.

DeneySEL olarak hepatik yetmezlik ya dokunun büyük miktarlarda cerrahi olarak çıkarılması, veya iskemik hasar yahut da; her ikisiyle de yapılmaktadır. Cerrahi rezeksiyon + porto-kaval (PC.) şant tavsiye edilmekle birlikte, PC şantın elektif bir teknik gerektirmesi nedeniyle; Minato ve ark. ile Emond ve ark. larınca tekniği açıklanan % 85-90 rezeksiyonu tercih edildi. (109). 24-72 saat içinde % 90 hepatektomide belirtilen % 80-90 mortalite oranları Deney 2 grubunda % 83 iken kontrol grubunda % 50 leredir. Bu oran Deney 1'de ise % 25'dir.

Fötal hepatositlerin elde edilmesi için Hata ve ark. larının (70) bildirdiği mekanik ayrıştırma tekniği modifiye edildi. Bu metod enzim metodlarına göre daha basit olup; onlar kadar da başarılı netice vermektedir. Hata'nın metodundan farkımız; fosfat buffer solüsyonu yerine HBS kullanılması olup; HBS de başka araştırmacılar tarafından benzer prosedürlerde kullanılmaktadır.

Trypan blue ile yapılan viabilite testi literatürle uyumlu olarak % 80-90 arasındadır. Prosedürden kaynaklanan % 10-20 lik hasarın teknik tecrübe ile

azalacağı düşüncesine rağmen yine de araştırılması gereken bir konudur (11, 85, 87).

Çalışmalarda temin ve uygulama kolaylığı yanı sıra araştırmalarda en yaygın olarak kullanıldığından kıyaslama yapabilmek için ratlar seçildi. Kendi imkanlarımızla temin ederek ürettiğimiz ve bakımını yaptığımız ratlar arasında bünyesel farklılıkların AKY sonrası klinik farklılıklara neden olabileceği düşünülmeli gerekir.

Literatürde çok farklı ektopik sahalara HTX yapılmış olmakla birlikte, karaciğere benzer ağısı yapısı, embriyolojik gelişim birlikteliği, zengin beslenme imkanı, hayati bir organ olmaması (zarara uğrasa da problem çıkmayacaktır) ve nakledilen hücrelerin bilahare daha rahat gözlenebilmesi imkanı nedeniyle diğer araştırmacılar gibi dalak tercih edildi. Önceki çalışmalarda HTX ile hepatositlerin dalakta canlı kalabildiği, dalakla uyumlu olarak proliferasyon olabildiği hatta dalağın % 40'ını kaplayacak kadar genişleyebildiği, uzun dönemde varlığını sürdürdüğü, burada fonksiyon görebildiği böylelikle metabolik destek sağlayabileceği gösterilmiştir (15, 43, 46, 68, 80, 83, 84, 85).

Çalışmada literatürde belirtilen en az miktar olan 2 milyon FLC kullanılmıştır. Bazı araştırmalar AKY'de metabolik destek için daha çok hücreye ihtiyaç olduğunu bildirmekle birlikte; 1. deney grubunda aldığımız olumlu sonuçlar; burada hücre sayısı da önemli olmakla birlikte transplante edilen süspansiyonla birlikte verilen, hücre fraksiyonları, serumdaki trofik faktörlerin de müsbet bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca AKY'de reverzibl / irreverzibl kritik noktasında yapılacak küçük bir desteğin dahi gidişatı müsbet yönde etkileyerek sağlayacağı büyük fayda da açıktır. HTX için FLC kullanılmasının matür hücreye göre daha çok blast formda hücre içermesi ve bu hücrelerin aktif ve mitozda daha yatkın olmaları avantajı yanında fetal dönem hematopoeziyle ilgili ana hücreleri de içermesinin de avantaj mı dezavantaj mı sağladığı tartışmalıdır (10, 15, 95).

Dalak ve karaciğer dışındaki, periton, pankreas, (44), akciğer, (13, 78), pulmoner vasküler yatak (79), renal kapsül altı, interskapular yağ dokusu (75, 76), subkutan doku veya kas içi (70), gözün ön kamarası (15), mezotestis ve ayak dorsal yağ dokusu gibi yerlerde hepatosit tutunması güçtür. Bu yüzden bu bölgelerdeki canlılıkları ve fonksiyone olabilmeleri de sınırlıdır. Çünkü hepatositler ağısı yapı bağımlı hücrelerdir. Bu yüzden bu tür yerlere yapılacak nakillerde mikro taşıyıcılara veya enkapsülasyona ihtiyaç olabilir (87).

Dalağın en önemli dezavantajı hacminin sınırlı olmasıdır. Bu kapasite sınırlaması araştırmacıları enkapsülasyon teknikleriyle veya sentetik fiberlere tutturularak herhangi bir organa ihtiyaç olmaksızın örneğin periton içine nakil çalışmalarına yönlendirmiştir.

Çalışmamızda; Deney 1 grubunda AKY'de kritik peryod olan ilk 72 saatte mortalite oranı: % 25, Deney 2 grubunda: % 83 olarak bulunmuştur. Kontrol Grubunda ise bu oran: % 66 dır. 20. günden sonra sağ rat Deney 2 ve Kontrol grubunda kalmazken (mortalite: % 100) Deney 1 grubunda 3 ratın hala canlı kalabildiği hatta 30. gündeki kontrolde de canlılıklarını sürdürdükleri görülmüştür. Deney 1 grubundaki bu önemli farklılık deney protokolünden sağlanmıştır (11, 84, 86).

Önceki çalışmalarda intrasplenik olarak yapılacak HTX'in burada organizasyonu için belli bir süreye (en az 2 ay) ihtiyaç bulunduğu kaydedilmiştir (78). Yine bu uygulamalarda dalağa verilen hepatositlerin ilk günlerde (7. güne kadar) bir başlangıç kaybının sözkonusu olduğu bildirilmiştir. Bu düşünceden hareketle hepatositlerin dalakta organizasyonu için Deney 1. grubuna yeterli bir süre (4 ay) verilirken; Deney 2 grubunda bekleme süresi verilmemiştir. (4, 11, 15, 21, 95).

Deney 1 Grubunda sağ kalım oranında sağlanan belirgin düzelme literatürdeki bu tür görüşleri destekler mahiyettedir. Deney 2 grubunda HTX ile kontrol grubuna göre sağkalımda herhangi bir düzelme sağlanmamış

olduğundan; hepatosit organizasyonu, fonksiyonu ve metabolik destek için uzun bir süreye gerek olduğunu göstermiştir (84, 86, 95).

AKY'de klinik değerlendirmede önemli bir parametre olan kan glikoz düzeyleri, metabolik desteğin boyutlarını göstermesi bakımından önemlidir. Çalışmada belirli aralıklarla kuyruk kanından bakılan bu düzeylerin PH'den hemen sonraki ilk saatlerde hayli düşük olduğu, AKY için kritik saatler olan 24-72 saatler arasında ise zaten düşük olan bu değerlerin özellikle Deney 1 grubunda 12. saatte, Deney 2 grubunda mütemadiyen, Kontrol grubunda ise 12 ve 24 saatlerde belirgin bir derecede daha da düştüğü gözlemlenmiştir. Bu glikoz düzeylerinin Deney 1 grubunda 24. saatte başlayıp 7. günde belirgin bir seviyeye ulaştığı, Deney 2 grubunda ise bir düzelme imkanı olmadan tüm ratların öldüğü, Kontrol grubunda ise, 72. saatte düzelmenin başladığı ve her iki grupta (Deney 1 ve Kontrol gruplarında) 15. günde normal glikoz seviyelerine ulaştığı gözlemlenmiştir. Ölüm öncesi kan glikozu düzeylerinin düşük seyretmesi ilgi çekicidir. Bu oranlar literatürle uyumlu vaziyettedir (70, 14, 18, 109).

Subjektif klinik değerlendirme sonuçları da metabolik destek için kabaca bir fikir verebilir kanaatindeyiz (109). Tüm gruplarda PH sonrası ilk klinik skorlar en alt seviyededir. Sıçanlar ilk saatlerde, ağır bir hepatik hasarla sonlanan operasyon neticesi uyarılara dahi cevapsızdılar. Klinik skorlama ile kontrol grubundaki ratların 48-72 saatte kendilerini toparlamaya başladıklarını ve 7. günden sonra normale dönmeye başladığını, Deney 1 grubunda ise 12-24 saatte belirgin bir düzelme olup; 2-3 günden itibaren normal seviyeleri yakaladıkları ve Deney 2 grubunda ise; devamlı en alt seviyede oldukları gözlemlenmiştir. Yine, ölüme giden ratların klinik skorlarının da devamlı düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Klinik değerlendirmede karaciğer kimyası ile ilgili biokimyasal veriler de takip de kullanılabilir. Ancak rat canlı iken bu değerlerin tetkiki için testlere

yetecek miktarda kan alabilmek bir problemdir. Bu kan ancak ölüm esnasında aortadan alınabilmektedir (85). Çalışmamızda yeteri kadar numune alınamadığı ve bir genelleme için sağlıklı sonuçları veremeyeceği düşünülerek bu verilere yer verilmemiştir.

Histolojik verilerde: Deney 1 grubunda FLCTX ile PH arası 4 aylık intervalin hepatosit organizasyonu için yeterli olduğu, bu süreye rağmen hepatositlerin dalakta canlı kalabildiği ve orijinal şekiller ve özelliklerini de yaklaşık olarak koruyabildiği görülmüştür. Deney 2 grubunda da verilen hepatositlerin etraf dalak dokusu ile kaynaşmaya başladığı gözlemlenmiştir (20, 73, 87, 43, 88).

Bütün gruplarda histolojik olarak verilen FLCTX ile reddi düşündürecek bir anormal hücre infiltrasyonu, dejenerasyonu veya nekrozuna ait herhangi bir bulguya rastlanılmadı. Bu da HTX ile ve özellikle de FLCTX'de dolu reddi olayının ya hiç olmadığı ya da önemsiz seviyelerde olduğu bilgilerimizle uyumludur (70, 111).

Hücreler ve fonksiyonlarının otoradyografik metodlarla tespit edilmesine yönelik histolojik tesbitler yapılmasının değerli sonuçlar vereceğini düşürmekteyiz. H x E incelemeleri de diğer bazı histokimyasal metodlarla detaylandırılabilir (83, 86, 96).

Tabii ki bu deneysel çalışmaların pekiştirilerek, insan klinik deneylerinde de uygulanabilirliğine dair yapılacak daha çok şey mevcuttur. İleride hücre bankalarının geliştirilmesiyle tüm özgün hücre nakilleri gibi karaciğer hücre nakillerinin de yaygın bir şekilde kullanılabilceği düşünülmektedir.

Bu çalışmalar, fõtal hücrelerin bir kemik iliği gibi klinikte uygulanmasıyla alınan başarılı sonuçların başta akut karaciğer yetmezliği olmak üzere başka endikasyon ve alanlarda da uygulanabileceği sanılmaktadır. Bu konunun gelecekteki seçkin tedaviler arasında olacağı ümid edilmektedir.

6. ÖZET

Son dönem karaciğer hastalıkları ve özellikle de akut karaciğer yetmezliği, hala; yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden klinik bir tablodur. OKT, bu durumda en seçkin tedavi olarak görülse de; yüksek maliyeti, cerrahi prosedürlerinin karmaşıklığı, ömür boyu immunsupresyonu zorunlu kılması yanısıra giderek artan donör sıkıntısı nedeniyle sınırlı kalmaktadır. Biyoyapay karaciğer destek sistemleri de yeni yeni geliştirilmektedir. Geri dönüşümsüz kritik noktadan evvel sağlanacak metabolik desteğin, sağkalımda büyük kazançlar getireceğinden hareketle yeni metodlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Araştırmalar, karaciğer hücre nakli şeklinde yapılacak bir köprü transplantasyonla; hastaların karaciğerlerinin rejenerasyonuna imkan tanınarak; prognozda önemli gelişmeler olabileceğini göstermektedir. Bu nakil prosedürlerinde herhangi bir red olayı olmayacağından immunsupresyon gerekliliği de ortadan kalkacaktır. Fötal hücrelerle yapılan HTX'in ilave bazı avantajlara sahip olduğu da bilinmektedir.

Bu araştırmada, fötal karaciğer mekanik teknik yoluyla ayrıştırılıp, adult sıçanlara dalak parankimi yoluyla allogreftik olarak nakledilmiştir. Sonuçlar deneysel olarak oluşturulmuş cerrahi akut karaciğer yetmezliği modelinde metabolik destek sağlandığı ve mortalite oranlarının düşürüldüğü modifiye-klinik, biyokimyasal ve histo-morfolojik olarak göstermiştir. HTX'in, deneysel karaciğer yetmezliğinden 4 ay önce yapılması hepatositlere yeterli bir organizasyon ve dalak ortamında fonksiyonel olmalarını sağlar. Çalışmalarımızda deney ve kontrol gruplarında herhangi bir red olayına rastlanılmamıştır.

Grubumuz, prosedürün standartize edilmesi için birçok pilot çalışma gerçekleştirmiştir. Bu çalışmanın yurdumuzda yapılan bu tür çalışmaların ilklerinden birisi olması önemlidir.

7.SUMMARY

In the end stage liver diseases and especially acute liver failure has a high mortality and morbidity ratio currently. OLT, is considered as the best therapy in this state. But, that; it has a high cost, complex surgical procedures, it needs extensive immunosuppression and it is difficult to find a suitable donors. Bioartificial liver support systems, are in development ages. It is considered that if a suitable metabolic support can be achieved before the critical irreversible level; the survival, will get long. According to experimental results, a hepatocyte transplantation (as a bridge therapy), can give the liver an opportunity to regenerate; which can give an important improvement in prognosis. In this technique, there is no rejection problem. So we don't need any immunosuppressive procedure. This advantage is a property of fetal cells.

In this study, fetal liver was dissociated by mechanical technique and transplanted to adult (allograft) by intrasplenic route. Our results, show that; we were able to give metabolic support, lower the mortality rate in experimental induced surgical acute liver insufficiency, by modified clinical, biochemical and histomorphological criteria. When HTX, is made four months before, surgical experimental liver failure; hepatocytes gain enough for their organization and functional state inside the spleen environment. In our experiment we didn't observe any rejection reaction neither in the experiment nor the control group.

Our group made a lot of pilot work to standardize this procedure. We are the frontiers of such kind of work in our country.

8. KISALTMALAR

AGER.....	Agranüler endoplazmik retikulum
AKY.....	Akut karaciğer yetmezliği
BAL.....	Bioartificial liver support
EC.....	Euro Collins solution
EGF.....	Epidermal Growth factor
FLC.....	Fetal liver cells
FLCTX.....	Fetal liver cells transplantation
GER.....	Granüler endoplazmik retikulum
GH.....	Growth hormon
GVHD.....	Graft Versus Host Disease
HBSS.....	Hank's Balanced Salt Solution
HGF.....	Hepatocyte Growth factor
HTX.....	Hepatocellular transplantation
IGF.....	Insulin like Growth factor
NAR.....	Nagazaki analbuminemic rat
OKT.....	Ortotopik karaciğer transplantasyonu
SCID.....	Severe Immun Deficiency Disease
TAC.....	Transplant aspiration cytology
UW.....	University of Wisconsin solution
VLDL.....	Very low Density Lipoprotein
WHHL.....	Watanabe Heritable Hiperlipidemic Rabbit

9. LITERATÜR

- 1- DHAWAN, D., GEEL, A. (1994) Hepatoprotective effects of Liv-52 and its indirect influence on the regulation of thyroid hormones in rat liver toxicity induced by carbon tetrachloride. *Res. Exp. Med*, 194, 203-214.
- 2- DIXIT, V. (1993) Development of a bioartificial liver using isolated hepatocytes. *The International Journal Of Artificial Organs*, 16, No 6, 328.
- 3- LANDA I., CALLEJA, J., GOMEZ, M., JOVER, J., ARIAS, J., SEVILLA, P., VALENZUELA, C., MORENO, E. (1990) Evaluation of a prospective protocol for liver transplantation in the treatment of acute liver failure. *Transplantation Proceedings*, 22, No 5, 2293-2294.
- 4- HIRAI, S., KASAI, S., MITO, M. (1983) Encapsulated hepatocyte transplantation for the treatment of D-Galactosamine-induced acute hepatic failure in rats. *Eur. Surg. Res*, 25, 193-202.
- 5- KASAI, S., SAWA, M., HIRAI, S., NISHIDA, Y., ONODERA, K., YAMAMOTO, T., MITO, M. (1992) Beneficial effect of hepatocyte transplantation on hepatic failure in rats. *Transplantation Proceedings*, 24, No 6, 2990-2992
- 6- THOMAS, D. B. (1993) The infusion of human fetal liver cells. *Stem Cells*, 11, 66-71.
- 7- HILLAN, K.J., BURT, A. D., GEORGE, W. D., MACSWEEN, R.N.M., GRIFFITHS, M.R., BRADLEY, J.A. (1989) Intrasplenic hepatocyte transplantation in rats with experimental liver injury: morphological and morphometric studies. *Journal Of Pathology*, 159, 67-73.
- 8- DEMETRIOU, A. A., WHITING, J. F., FELDMAN, D., LEVENSON, S. M., CHOWDHURY, N. R., MOSCIONI A. D., KRAM M., CHOWDHURY, J. R. (1986) Replacement of liver function in rats by transplantation of microcarrier-attached hepatocytes. *Science*, 233, 1190-1192.

- 9- AIKEN, J., LIMA, L., SCHLOO, B., MOONEY, D., JOHNSON, L., LANGER, R., VACANTI, J. P. (1990) Studies in rat liver perfusion for optimal harvest of hepatocytes. *Journal Of Pediatric Surgery*, 25, No 1, 140-145.
- 010- MIYAZAKI, M., MAKOWKA, L., FALK, R. E., FALK, J. A., FALK, W., VENTURI, D. (1983) Reversal of lethal, chemotherapeutically induced acute hepatic necrosis in rats by regenerating liver cytosol. *Surgery*, 94, No 2, 142-150.
- 011- VACANTI, J. P., MORSE, M. A., SALTZMAN, W. M., DOMB, A. J., PEREZ-ATAYDE, A., LANGER, R. (1988) Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *Journal Of Pediatric Surgery*, 23, No 1, 3-9.
- 012- KASAI, S. (1993) Is a biological artificial liver clinically applicable? *The International Journal Of Artificial Organs*, 16, No 6, 325.
- 013- SUTHERLAND, D. E. R., NUMATA, M., MATAS, A. J., SIMMONS, R. L., NAJARIAN, J. S. (1977) Hepatocellular transplantation in acute liver failure. *Surgery*, 82, No 1, 124-132.
- 014- DARBY, H., GUPTA, S., JOHNSTONE, R., SELDEN, C., HODGSON, H. J. (1986) Observations on rat spleen reticulum during the development of syngeneic hepatocellular implants. *Br. J. Exp. Path.* 67, 329-339.
- 015- GUPTA, S., CHOWDHURY, J. R. (1992) Hepatocyte transplantation: back to the future. *Hepatology*, 15, No 1, 156-162.
- 016- UYAMA, S., KAUFMANN, P.-M., TAKEDA, T., VACANTI, J. P. (1993) Delivery of whole liver-equivalent hepatocyte mass using polymer devices and hepatotrophic stimulation. *Transplantation*, 55, No 4, 932-935.

- 017- DIXIT, V., DARVASI, R., ARTHUR, M., LEWIN, K., GITNICK, G. (1993) Cryopreserved microencapsulated hepatocytes transplantation studies in gunn rats. *Transplantation*, 55, 616-622.
- 018- DEMMA, I., HOUSSIN, D., CAPRON, M., MINATO, M., MORIN, J., GIGOV, M., STEKELY, A. M., BISMUTH, H. (1986) Therapeutic efficacy of the transplantation of isolated hepatocytes in rats with surgically induced acute hepatic failure: a study of the mechanism. *Eur. Surg. Res.*, 18, 12-18.
- 019- THEN, P., SANDBICHLER, P., ERHART, R., DIETZE, O., KLIMA, G., VOGEL, W., MARGREITER, R. (1991) Hepatocyte transplantation into the lung for treatment of acute hepatic failure in the rat. *Transplantation Proceedings*, 23, No 1, 892-893.
- 020- VROEMEN, J. P. A. M., BUURMAN, W. A., SCHUTTE, B., MAESSEN, J. G., VAN DER LINDEN, C. J., KOOTSTRA, G. (1988) The cytokinetic behavior of donor hepatocytes after syngenic hepatocyte transplantation into the spleen. *Transplantation*, 45, No 3, 600-607.
- 21- VINTERMYR, O. K., DOSKELAND, S. O. (1987) Cell cycle parameters of adult rat hepatocytes in a defined medium. a note on the timing of nucleolar DNA replication. *Journal Of Cellular Physiology*, 132, 12-21.
- 22- ISMAIL, T., HOWL, J., WHEATLEY, M., MCMASTER, P., NEUBERGER, J. M., STRAIN, A. J. (1991) Growth of normal human hepatocytes in primary culture; effect of hormones and growth factors on dna synthesis. *Hepatology*, 14, No 6, 1076-1082.
- 23- MAKOWKA, L., FALK, R.E., ROTSTEIN, L.E., FALK, J.A., NOSSAL, N., LANGER, B., BLENDIS, L.M., PHILLIPS, M.J. (1980) Cellular transplantation in the treatment of experimental hepatic failure. *Science*, 210, 901-903.

- 24- DECHIARA, T. M., EFSTRATIADIS, A., ROBERTSON, E. J. (1990) A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Letters to Nature*, 345, 78-80.
- 25- TOURAINÉ, J. L., RAUDRANT, D., VULLO, C., FRAPPAZ, D., FREYCON, F., REBAUD, A., BARBIER, F., RONCAROLO, M.G., GEBUHRER, L., BETUEL, H., ZABOT, M.T. (1990) New developments in stem cell transplantation with special reference to the first in utero transplants in humans. *Pav. P, H. Edward Herriot, Lyon Cedex*, 92-97.
- 26- BACCHETTA, R., VANDEKERCKHOVE, B. A. E., TOURAINÉ, J. L., BIGLER, M., MARTINO, S., GEBUHRER, L., VRIEJ, J. E. D., SPITS, H., RONCAROLO, M.-G. (1993) Chimerism and tolerance to host and donor in severe combined immunodeficiencies transplanted with fetal liver stem cells. *J. Clin. Invest*, 91, 1067-1078.
- 27- BATAILLARD, A., VINCENT, M., SASSARD, J., TOURAINÉ, J.-L. (1991) Fetal liver cell transplantation fails to transfer hypertension from genetically hypertensive rats to normotensive rats of the lyon strain. *Journal Of Hypertension*, 9, 85-90.
- 28- PEARCE, R.D., KIEHM, D., ARMSTRONG, D.T., LITTLE, P.B., CALLAHAN, J.W., KLUNDER, L.R., CLARKE, J.T.R., (1989) Fetus by intraperitoneal injection of fetal liver cells. *Experientia*, 45, 307-308.
- 29- YILDIRIM, M. (1994) Transplantasyon uygulamasında cerrahi anatomi. *Klinik Gelişim*, 7, 3074-3082.
- 30- ODAR.İ.V. (1979) *Anatomi Cilt 2 TAŞ Yay. 11. Baskı, İst.*, 115-138, 151-153
- 31- WILLIAMS, P., BANNUTER, L.H., BERRY, M.M., COLUNS, P., DYSON, M., DUSSEK, J.E., FERGUSON, M.W.J (1995) *Grey's Anatomy*. 38. edition. Churchill living stone, Norwich.

- 32- PAKER, Ş. (1986) Histoloji, Uludağ Ün. Yay., Bursa, 361-372, 390-398.
- 33- JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J., KELLEY, R.O. (1989) Basic Histology Sixth Edition, Lange med. Book. Liban. 273-280, 316-380.
- 34- GUMUCIO, J. J., MAY M., DVORAK, C., CHIANALE, J., MASSEY, V. (1986) The isolation of functionally heterogeneous hepatocytes of the proximal and distal half of the liver acinus in the rat. Hepatology, 6, No 5, 932-944.
- 35- DİKMEN, . (1994) Karaciğer transplantasyonlarında yoğun bakım. Klinik Gelişim, 7, 3130-3133.
- 36- MAGANTO, P., TRABER, P. G., RUSNELL, C., DOBBINS III. W. O., KEREN, D., GUMUCIO, J. J. (1990) Long-term maintenance of the adult pattern of liver-specific expression genes in intrasplenically transplanted hepatocytes. Hepatology, 11, No 4, 585-590.
- 37- ERKOÇAK, A. (1984) Genel ve Özel Histoloji Cilt 1-2, Refko Yay. İzmir, 63-70.
- 38- KERSE, İ. (1981) İnsan Embriyolojisine Giriş, 3. Baskı Hacettepe Ün. Yay. Ankara
- 39- JOHNSON, K.E. (1984) Histology and Embryology, Harwall Publishing Co. med. USA, 159-163, 102-105.
- 40- PETORAK, I. (1984) Medikal Embriyoloji 1. Baskı Beta Basın Yay. Dağ. A.Ş. İstanbul, 200-203.
- 41- ŞEFTALİLİOĞLU, A. (1991) Genel İnsan Embriyolojisi 1. Baskı, Ank. Ün. Basımevi, Ankara
- 42- POLİN, R., FOX, W (1992) "Fetal and neonatal Physiology Volume 2" 1. edition W.B. Saunders Comp. Pennsylvania.

- 43- MITO, EBADA, KUSANO; ONISHI, SAITO, JAKAMOTO, (1979) Morphology and function of isolated hepatocytes transplanted into rat spleen. *Transplantation*, 28, No 6, 499-505.
- 44- JAFFE, V., DARBY, H., BISHOP, A., HODGSON, H. J. F. (1991) The growth of liver cells in the pancreas after intra-splenic implantation: the effects of portal perfusion. *Int. J. Exp. Path.*, 72, 289-299.
- 45- SHIPLEY, G. D., CHILDS, C. B., VOLKENANT, M. E., MOSES, H. L. (1984) Differential effects of epidermal growth factor, transforming growth factor, and insulin on dna and protein synthesis and morphology in serum-free cultures of akr-2b cells. *Cancer Research*, 44, 710-716.
- 46- VEMURU, R. P., DAVIDSON, A., ARAGONA, E., CHOWDHURY, J. R., BURK, R. D., GUPTA, S. (1992) Immune tolerance to a defined heterologous antigen after intrasplenic hepatocyte transplantation: implications for gene therapy. *The FASEB Journal*, 6, 2836-2842.
- 47- BOR, S., ÖZÜTEMİZ, Ö., YÖNETİCİ, N. (1994) Karaciğer transplantasyonu. *Klinik Gelişim*, 7, 3163-3172.
- 48- BERG, R. G. M. TEN, ERNST, P., MALDEGEM-DRONKERS, C, VAN., MARQUET, R., WESTBROEK, D. L. (1985) Effect of viable isolated hepatocytes or hepatocyte fractions on survival rate following galactosamine-induced acute liver failure. *Eur. Surg. Res*, 17, 109-118.
- 49- MC. NAIR, A. N. B., TIBBS, C. J., WILLIAMS, R. (1995) Hepatology. *British Medical Journal*, 311, 1351-1355.
- 50- CULLY, F., TÜMAY, G. T. (1994) Çocukluk çağında karaciğer transplantasyonu. *Klinik Gelişim*, 7, 3157-3162.
- 51- ŞENYÜZ, O. F. (1994) Karaciğer nakli. *Klinik Gelişim*, 7, 3110-3119.
- 52- HABERAL, M., GÜLAY, H., ERBERGİ, A. (1989) Karaciğer transplantasyonu. *Türkiye Klinikleri*, 9, 254-266.

- 53- ŞENTÜRK, H. (1994). Karaciğer transplantasyonu sonrası bilier komplikasyonlar. Klinik Gelişim, 7, 3154-3156.
- 54- SONSUZ, A., DUMANKAR, A. (1994) Karaciğer transplantasyonu sonrasında enfeksiyonlar. Klinik Gelişim, 7, 3147-3153.
- 55- IMAMURA, H., KAWASAKI, S., SHIGA, J., BANDAI, Y., SANJO, K., IDEZUKI, Y. (1991) Quantitative evaluation of parenchymal liver cell volume and total hepatocyte number in cirrhotic patients. Hepatology, 14, No 3, 448-453.
- 56- AKTAN, H. (1984) Hepatik koma. Türkiye Klinikleri, 4, 313-318.
- 57- SARIYEL, D. (1994) Organ nakli. Tübitak Bilim Teknik Dergisi, 324, 54-58.
- 58- GÜRAKAR, M. (1994) Dünyada ve Türkiye’de karaciğer transplantasyonu. Klinik Gelişim, 7, 3108-3109.
- 59-TAKEGUCHI, N. ICHIMURA, K., KOIKE, M., MATSUI, W., KASHIWAGURA, T., KAWAHARA, K. (1990) Inhibition of the multidrug efflux pump in isolated hepatocyte couplets by immunosuppressants fk506 and cyclosporine. Transplantation, 55, 646-650.
- 60- BUMGARDNES, G. L., CHEN, S., HOFFMAN, R., CAHILL, D. C., SO, S. K., PLATT, J., BACH, F. H., ASCHER, NANCY, L. (1989) Afferent and efferent pathways in i cell responses to mhc class I⁺, II- hepatocytes. Transplantation, 47, 163-170.
- 61- VIEBAHN, R., GROOT, H. DE., LAUCHART, W., BECKER, H. D. (1991) Primäre hepatozytenkulturen als modell zur experimentellen untersuchung der leberkonservierung. Langenbeeks Archiv Chirurgie, 376, 268-272.

- 62- KAYA, G., BOZKURT, P. (1994) Karaciğer transplantasyonu anestezi. Klinik Gelişim, 7, 3120-3126.
- 63- ŞENTÜRK, H. (1994) Karaciğer transplantasyonunda red. Klinik Gelişim, 7, 3144-3146.
- 64- UYSAL, V. A. (1989) Graft versus host hastalığı. Türkiye Klinikleri, 9, 313-318.
- 65- GOLDSTEIN, N. S., HART, J., LEWIN, K. J. (1991) Diffuse hepatocyte ballooning in liver biopsies from orthotopic liver transplant patients. Histopathology, 18, 331-338.
- 66- HAYASHI, T., NOZAWA, M., OTSU, I., DEGUCHI, H., KITAURA, Y., KAWAMURA, K. (1991) Cell mediated cytotoxicity in acute rat cardiac allograft rejection: an immunological and ultrastructural study. Virchows Archiv A Pathological Anatomy And Histopathology, 418, 41-50.
- 67- PROMMER, O., RAGHAVACHAR, A., WERNER, C., VALVO, W., CARBONELL, F., STEINBACH, I., FLIEDNER, M. T. (1985) Fetal liver transplantation in the dog. Transplantation, 39, No 4, 349-355.
- 68- NORDLINGER, B., BOUMA, M. E., WANG, S. R., BALLEET, F., VERTHIER, N., HUGUET, C., INFANTE, R. (1985) High-yield preparation of porcine hepatocytes for long survival after transplantation in the spleen. Eur. Surg. Res, 17, 377-382.
- 69- NEUZIL, D.F., ROZGA, J., MOSCIONI, A. D., RO, M. S., HAKIM, R., ARNAOUT, W. S., DEMETRIOV, A. (1993) Use of a novel bioartificial liver in a patient with acute liver insufficiency. Surgery, 113, No 3, 340-343.
- 70- GUPTA, S., WILSON, J. M., CHOWDHURY, J. R. (1992) Hepatocyte transplantation: development of new systems for liver repopulation and gene therapy. Seminars In Liver Disease, 12, No 3, 321-331.

- 71- PANIS, Y., PUTS, J. P., BALLEET, F., PENIN, E., DELELD, R., VERTHIER, N., NORDLINGER, B. (1990) The isolated perfused rat spleen. an original method for studying the function of hepatocytes transplanted into the spleen. *Transplantation*, 49, No 4, 756-759.
- 72- MAKOWKA, L., ROTSTEIN, L. E., FALK, R. E., FALK, J. A., NOSSAL, N. A., LANGER, B., BLENDIS, L. M., PHILLIPS, M. J. (1989) Allogeneic and xenogeneic hepatocyte transplantation in experimental hepatic failure. *Transplantation*, 30, No 6, 429-435.
- 73- EBATA, H., DNODERA, K., JAWA, M., MITO, M. (1988) A study of liver regeneration using fetal rat liver tissue transplanted into the spleen. *Japanese Journal Of Surgery*, 18, No 5, 540-547.
- 74- HOLZMAN, D., ROZGA, J., NEUZIL, D. F., GRIFFIN, D., MOSCIONI, A. D., DEMETRIOU, A. A. (1993) Selective intraportal hepatocyte transplantation in analbuminemic and gunn rats. *Transplantation*, 55, No 6, 1213-1219.
- 75- KOCH, K.S. BROWNLEE, G.G., GOSS, S. J., MARTINEZ-CONDE, A., LEFFERT, H. L. (1991) Retroviral vector infection and transplantation in rats of primary fetal rat hepatocytes. *Journal Of Cell Science* 99, 121-130.
- 76- KOCH, K. S., BROWNLEE, G. G., GOSS, S. J., MARTINEZ-CONDE, A., LEFFERT, H. L. (1991) Retroviral vector infection and transplantation in rats of primary fetal rat hepatocytes. *Journal Of Cell*, 99, 121-130.
- 77- BUMGARDNER, G. L., ALMOND, P. S., CHEN, S., MATAS, A. J. (1991) Indirect antigen presentation of hepatocyte (hc) mhc class i antigen in hc-sponge matrix allografts. *Transplantation Proceedings*, 23, No 1, 835-836.
- 78- SELDEN, C., GUPTA, S., JOHNSTONE, R., HODGSON, H. J. F. (1984) The pulmonary vascular bed as a site for implantation of isolated liver cells in inbred rats. *Transplantation*, 38, 81-83.

- 79- GUPTA, S., JOHNSTONE, R., DARBY, H., SELDEN, C., PRICE, Y., HODGSON, H. (1987) Transplanted isolated hepatocytes: effect of partial hepatectomy on proliferation of long-term syngeneic implants in rat spleen. *Pathology*, 19, 28-30.
- 80- BRIAND, CENTENO, N. A., ASTRE, C., AUBERT, B. S., JOYEUX, H. (1993) Comparison of two methods of autologous intrasplenic hepatocellular transplantation in partially hepatectomized dogs. *Eur. Surg. Res*, 25, 104-109.
- 81- JAFFE, V., DARBY, H., SELDEN, C., HODGSON, H. J. F. (1988) The growth of transplanted liver cells within the pancreas., 25, No 2, 497-498.
- 82- VRDEMEN, J. P. A. M., BUURMAN, W. A., VAN. DER. UNDN. C. J., VISSER, R., HEIRWEGH, K. P. M., KOOTSTRA, G. (1988) Transplantation of isolated hepatocytes into the pancreas. *Eur. Surg. Res*. 20, 1-11.
- 83- RINKES, I.H.M., BIJMA, A., SINAASEPPEL, M., TERPSTRA, O. T., (1993) Hepatocyte transplantation into spleen or solid supports: comparison of morphology, function, and proliferative response. *Transplantation Proceedings*, 25, No 1, 1014-1016
- 84- GUO, W., WILLEN, R., ANDERSSON, R., PARSSON, H., JOHANSSON, K., BENGMARK, S. (1993) Morphological response of the peritoneum and spleen to intraperitoneal biomaterials. *The International Journal Of Artificial Organs*, 16, No 5, 276-284.
- 85- RIBEIRO, J., NORDLINGER, B., BALLEET, F., CYNOBER, L., COUDRAY-LUCAS. C., BAUDRIMONT, M., LEGENDRE, C., DELELO, R., PANIS, Y. (1992) Intrasplenic hepatocellular transplantation corrects hepatic encephalopathy in portacaval-shunted rats. *Hepatology*, 15, No 1, 12-18.

- 86- NORDLINGER, B., WANG, S. R., VERTHIER, N., HILLAN, K., DELELO, R., INFANTE, R. (1987) Can hepatocytes proliferate when transplanted into the spleen? demonstration by autohistoradiography in the rat. *Eur. Surg. Res.*, 19, 381-387.
- 87- BOREL-RINKES, I. H. M., BIJMA, A. M., KAPPERS, W. A., SINAASAPPEL, M., HOEK, F. J., JANSEN, P. L. M., VALERIO, D., TERPSTRA, O. T. (1992) Evidence of metabolic activity of adult and fetal rat hepatocytes transplanted into solid supports. *Transplantation*, 54, No 2, 210-214.
- 88- MONS, V. CUERVAS, CIENFUEGOS, J. A., MAGANTOP., GOLITSIN, A., EROLES, G., OLIVARES, J, CASTILLO, SEGOVIA DE ARANA, J, M. (1984) Time-related efficacy of liver cell isografts in fulminant hepatic failure. *Transplantation*, 38, No 1, 23-25.
- 89- JAMES, J., FREDERIKS, W. M., VAN NOORDEN, C. J. F., TAS, J. (1986) Detection of metabolic changes in hepatocytes by quantitative cytochemistry. *Histochemistry*, 84, 308-316.
- 90- DEMETRIOU, A. A., FELCHER, A., MOSCIORI, A. D. (1991) Hepatocyte Transplantation a potential treatment for liver disease. *Digestive Diseases And Sciences*, 36, No 9, 1320-1326.
- 91- HENNE-BRUNS, D., KRUGER, U., SUMPELMANN, D., LIERSE, W., KREMER, B. (1991) Intraperitoneal hepatocyte transplantation: morphological results. *Virchows Archiv A Pathol Anatomy and Histopathology*, 419, 45-50.
- 92- WOLF, H.K., ZARNEGAR, R., NICHALOPOULOS, G. K. (1991), Localization of hepatocyte growth factor in human and rat tissues: an immune histochemical study. *Hematology*, 14, No 3, 488-494.

- 93- GUPTA, J., VEMURU, R. P., YERNENI, P. R., CHOWDHURY, N. ROY, JAGTIANI, R. K., SHAFRITZ, D. A., BURK, R. D., CHOWDHURY, J. ROY. (1993) Hepatocyte transplantation: prolonged cell survival following ex vivo manipulation and release from culture matrix components. *Transplantation Proceedings*, 25, No 3, 2370-2374.
- 94- OUTZEN, H. C., LEITER, E. H. (1981) Transplantation of pancreatic islets into cleared mammary fat pads. *Transplantation*. 32, No 2, 101-104.
- 95- DEMETRIOU, A. A., REISNER, A., SANCHEZ, J., LEVENSON, S. M., MOSCIONI, A. D., CHOWDHURY, J. R. (1988) Transplantation of microcarrier-attached hepatocytes into 90 % partially hepatectomized rats. *Hepatology*, 8, No 5, 1006-1009.
- 96- NOVAK, D. A., RYCKMAN, F. C., SUCHY, F. J. (1989) Taurocholate transport by basolateral plasma membrane vesicles isolated from human liver. *Hepatology*, 10, 447-453.
- 97- LEGRELLE, M., CHAPA, O., RACE, J. M., MALLEGOL, S., CAPRON, F., ALTMAN, J. S. (1993) Islet and hepatocyte contransplantation in rats. *Transplantation Proceedings*, 25, No 1, 981.
- 98- BUMGARDNER, G. L., CHEN, S., ALMOND, S. P., ASCHER, N. L., PAYNE, W. D., MATAS, A. J. (1990) Role Of Macrophages In The Immune Response to Hepatocytes. *Journal Of Surgical Research*, 48, 568-572.
- 99- MOSCIONI, A. D., ROY-CHOWDHURY, J., BARDOUR, R., BROWN, L. L., ROY-CHOWDHURY, N., COMPETIELLO, L. S. LAHIRI, P., DEMETRIOU, A. A. (1989) Human liver cell transplantation. *Gastroenterology*, 96, 1546-51.

- 100- GEERTS, A., SCHUPPAN, D., LAZEROMS, S., ZANGER, R. D., WISSE, E. (1990) Collagen type I and III occur together in hybrid fibrils in the space of disse of normal rat liver. *Hepatology*, 12, 233-241.
- 101- LOBO-YED, A., SENALOI, G., PORTMANN, B., MOWAT A. P., MIELI-VERGANI, G., VERGANI, D. (1990) Class I and class II major histocompatibility complex antigen expression on hepatocytes: a study in children with liver disease. *Hepatology*, 12, No 2, 224-232.
- 102- BUMGARDNER, G. L., MATAS, A. I., C. SALLY., C. DAVID, CUNNINGHAM, T. R. (1990) Comparison of in vivo and in vitro immune response to purified hepatocytes. *Transplantation*, 49, 429-436.
- 103- WILTON, J. C., WILLIAMS, D. E., STRAIN, A. J., PARSLOW, R.A., CHEPMAN, J. K., COLEMAN R. (1991) Purification of hepatocyte couplets by centrifugal elutriation. *Hepatology*, 14, No 1, 180-183.
- 104- SCHUETZ, E. G., LI, D., OMIECINSKI, C. J., MULLER-EBERHARD, U., KLEINMAN, H. K., ELSWICK, B., GUZELIAN, P. S. (1988) Regulation of gene expression in adult rat hepatocytes cultured on a basement membrane matrix. *Journal Of Cellular Physiology*, 134, 309-323.
- 105- MARSH, D. C., HJELMHAUG, J. A., VREUGDENHIL, P. K., KERR, J. A., RICE, M. J., BELZER, F. O., SOUTHARD, J. H. (1991) Hypothermic preservation of hepatocytes. iii. effects of resuspension media on viability after up to 7 days of storage. *Hepatology*, 13, No 3, 500-508.
- 106- The Care And Use Of Laboratory Animals (1978) National Ints Of Health. 80-23.
- 107- MICHEL, A., VONS, C., ICARD, P., HILLAIRES, S., HAZEBROUCQ, G., FRANCO, D., HOUSSIN, D., (1990) Efficacy of a modified university of wisconsin solution in rat liver preservation: its prevailing role on

vascular endothelium rather than hepatocyte protection. *Transplantation Proceedings*, 22, No 5, 2291-2292.

- 108- BURCZYNSKI, F. J., CAI, Z.-S. (1994) Palmitate uptake by hepatocyte suspensions: effect of albumin. *Am. J. Physiol. (Gastroint. Liver Physiol. 30)*, G371-G379.
- 109- EMOND, J., COPRON-LAUDEREAU, M., MERIGGI, F., BERNUAU, J., REYNES, M., HOUSSIN, D. (1989) Extent of hepatectomy in the rat. *Eur. Surg. Res.*, 21, 251-259.
- 110- DAFEIO, D. C., WANG, X., TAFRA, L., BEREZNIAK, R., LLOYD, R. V. (1992) Studies of composite grafts of fetal pancreas (fp) and fetal liver (fl) in the streptozotacin-induced diabetic rat. *Pancreatic Islet Cell Regeneration And Growth*, 171-177.
- 111- KOCHUPILLAI, V., JHARMA, S., SUNDARAM, K. R., AJUHA, R. K. (1991) Hemopoietic improvement following fetal liver infusion in aplastic anemia. *Eur. J. Heamatol*, 47, 319-325.
- 112- CAIN, G. R., CHAMPLIN, R., JAIN, N. (1989) Immune thrombocytopenia in dogs after fetal liver hematopoietic cell transplantation. *Exp. Heamatol*, 17, 287-291.
- 113- GAILLARD, V., VIVIER, G., BARJHDUX, L., SOUCHIER, C., TOURAINÉ, J. L., BLANC-BRUNAT, N. (1993) Image analysis of dendritic cells in the human fetal thymus. *Thymus*, 21, 75-91.
- 114- RABINOWICH, H., UNIEL, T., GLOBERSON, A. (1983) T cell progenitors in the mouse fetal liver. *Transplantation*, 35, No 1, 40-48.
- 115- THOMAS, D. B. (1993) The infusion of human fetal liver cells. *Stem Cells*, 11 (Suppl 1), 66-71.
- 116- RONCAROLD, M.-G., BACCHETTA, R., BIGLER, M., TOURAINÉ, J.-L., VRIES, J. E. D., SPITS, H. (1991) A SCID patient reconstituted with

HLA-incompatible fetal stem cells as a model for studying transplantation tolerance. *Blood Cells*, 17, 391-402.

- 117- LANSDORP, P. M., DRAGOWSKA, W., MAYANI, H. (1993) Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J. Exp. Med.*, 178, 787-791.
- 118- DAVENTORT, C., KUMAR, V., BENNETT, M. (1993) Use of newborn liver cells as a murine model for cord blood cell transplantation. *The Journal Of Immunology*, 151, 1597-1605.
- 119- NAMIKAWA, R., WEILBAECHER, K. N., KANESHIMA, H., YEE, E. J., MCCUNE, J. M. (1990) Long-term human hematopoiesis in the SCID-hu. mouse. *J. Exp. Med.*, 172, 1055-1063.
- 120- VEYRON, P., TOURAINÉ, J. L. (1990) Fetal liver cell transplantation: survival of grafted balb/c lysosomal storage disease mice. *Transplantation Proceedings*, 22, No 5, 2253-2254.
- 121- TOURAINÉ, J. L., (1993) Transplantation of fetal liver stem cells into patients and into human fetuses, with induction of immunologic tolerance. *Transplantation Proceedings*, 25, No 1, 1012-1013
- 122- GALIMBERTI, M., LUCARELLI, G., POLCHI, P., ANGELUCCI, E., BARONCIANI, D., POLITI, P., DONATI, M., FILOCAMO, M., GIORGI, C., AGOSTINELLI, F., PARADISI, DEBIAGI, M. (1984) HLA-mismatched bone marrow transplantation in thalassemia. *Haematol.*, 17, 98-100.
- 123- SCHLITT, H. J., NASHAN, B., RINGE, B., BUNZENDAHL, H., WETTEKIND, C., WONIGEIT, K., QICHLMAYR, R. (1991) Differentiation of liver graft dysfunction by transplant aspiration cytology. *Transplantation*, 51, 786-792.

- 124- STRAIN, A. J., HILL, D. J., JWENNE, I., MILNER, R. D. G. (1987)
Regulation of dna synthesis in human fetal hepatocytes by placental
lactogen, growth hormone, and insulin-like growth factor I/somatomedin-
C. *Journal Of Cellular Physiology*, 132, 33-40.



10. ÖZGEÇMİŞ

1966 yılında Karaman'ın Ermenek ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Konya'da çeşitli okullarda tamamladım. 1983 yılında girdiğim Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesini 1989 yılında bitirdim. Aynı yıl başladığım mecburi hizmetimi Kars İli Digor İlçesinde tamamladıktan sonra Konya Meram Belediyesi Tabipliğine naklen atandım. Halen aynı kurumda Sağlık İşleri Müdürü olarak görev yapmaktayım. 1990 yılında Doktora öğrenimime başladım. Evli ve 2 çocuk babasıyım.



11. TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca maddi ve manevi ilgi ve desteklerini esirgemeyen ve bu ilgi ve desteğini, her zaman üzerimde hissettiğim: Anabilim Dalı Başkanımız, Danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Refik SOYLU başta olmak üzere; çalışmalarında yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm Anabilim Dalımız öğretim üye ve elemanlarına, özellikle de Doç. Dr. Selçuk DUMAN Bey'e teşekkürlerimi arz ederim.

Uzun ve yorucu tez çalışmalarında teknik bilgi ve yardımlarıyla katkı sağlayan Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Y. Doç. Dr. Alaattin DİLSİZ, Araştırma Görevlileri Dr. Burhan KÖSEOĞLU ve Dr. Aytekin KAYMAKÇI ile Anabilim Dalımız Uzmanı Dr. Murad AKTAN ve laboratuvar teknisyeni Yaşar KAHRAMAN'a, Veteriner Fak. Viroloji Asistanı Atilla ŞİMŞEK'e ve tezin özellikle yazımındaki katkılarından dolayı eşim, Dr. Hüsniye ERDOĞAN'a teşekkürü bir borç bilirim.