

# Ratlarda deneysel hepatik rezeksiyon modelinde iskemi-reperfüzyon ile indüklenen apoptozis ve hepatik rejenerasyona granülosit-makrofaj koloni stimule edici faktörün etkileri

Role of granulocyte-macrophage colony stimulating factor on induced by ischemia-reperfusion liver regeneration in the experimental hepatic resection model

İlkay Güler\*, Alper Akcan\*, Engin Ok\*, Hülya Akgün\*\*, Sebahattin Muhtaroglu\*\*\*, Namık Yılmaz\*

## Amaç:

Ratlarda deneysel hepatik rezeksiyon modelinde, Granülosit-Makrofaj Koloni Stimule Edici Faktörün (GM-CSF) iskemi-reperfüzyon ile tetiklenen apoptozis ve hepatik rejenerasyon üzerine etkilerini araştırmak.

## Yöntem:

Çalışmada ağırlığı 200-275 gram arasında değişen, 50 adet rat kullanıldı. Her biri 10 rattan oluşan 5 grup oluşturuldu. Sham grubu dışındaki tüm ratlara juguler venöz kateter yerleştirildi ve operasyondan 1 saat önce SF infüzyonuna başlandı. Orta hat insizyonla laparotomi yapıldı. Sham grubundaki ratlar portal diseksiyon sonrası sakrifiye edildiler. Diğer gruplardaki ratlara 30 dakika total iskemi yapıldı, ardından %70'lik karaciğer rezeksiyonu sonrası klemp açılarak reperfüzyona bırakıldı. Kontrol gruplarına operasyondan 60 dakika önce 0.02 ml SF, çalışma gruplarına 1µg/kg GM-CSF SC verildi. Reperfüzyonun 2. ve 48. saatlerinde relaparotomi yapılarak AST, ALT, LDH ve sFas ölçümleri için vena cava inferiorından kan örnekleri alındı. Kalan karaciğer dokusu çıkarılarak tartıldı ve rölatif karaciğer ağırlığı, MI, Fas İHK boyama ve MDA düzeyi için doku örnekleri alındı.

## Bulgular:

Rölatif karaciğer ağırlıkları ve MI, GM-CSF verilen grupta 48. saatte daha yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). AST, ALT ve LDH düzeyleri 2. saatte yüksek değerlere ulaştı, GM-CSF verilen grupta 48. saatte normale inmeye başladı. Hepatik MDA düzeyi GM-CSF verilen grupta 2. saatte yüksek, 48. saatte ise diğer gruba göre daha düşük bulundu ( $p<0.05$ ). sFas düzeyi ve Fas İHK boyama oranı sonuçları paralel idi, GM-CSF verilen grupta 2. ve 48. saatlerde daha düşük bulundu ( $p<0.05$ ). İskemi-reperfüzyon hasarının 2. saatte yüksek olduğu, SF ve GM-CSF verilen gruplarda farklı olmadığı, ancak GM-CSF verilen grupta 48. saatte anlamlı düzelme olduğu görüldü.

## Sonuç:

GM-CSF, Pringle manevrasını takiben %70 hepatik rezeksiyon sonrası karaciğer rejenerasyonunu morfolojik ve fonksiyonel olarak artırmaktadır, reperfüzyonun ileri dönemlerinde apoptozisi ve iskemi-reperfüzyon hasarını azaltmaktadır.

## Anahtar Kelimeler:

İskemi-reperfüzyon, karaciğer rezeksiyonu, apoptozis, Fas, GM-CSF

Karaciğer ile ilgili cerrahi girişimler sırasında iskemi ve iskemi-reperfüzyon (I-R) modeline uyan değişiklikler olmaktadır. İskemik dönemde hücre hasarı olurken, hipoksik periyodu izleyen reperfüzyon döneminde bu hasar daha da artmaktadır (1). Karaciğerdeki I-R hasarı değişik mekanizmalarla açıklanmaya çalışılmıştır. Hasara neden olan faktörler; serbest oksijen radikalleri (SOR), lökosit migrasyonu ve aktivasyonu, sinüzoidal endotelial hücre hasarı, mikrosirkülasyondaki düzensizlikler, koagülasyon sisteminin aktivasyonu olarak özetlenebilir (1-3).

Fizyolojik koşullarda pek çok sistemin homeostazisini sağlayan, gen kontrolünde, programlanmış fizyolojik ölüm biçimi olan apoptozis ilk defa 1972 yılında Kerr ve ark. (4) tarafından tanımlanmıştır. Deneysel olarak oluşturulan I-R'un beyin, miyokard ve böbrekte mitoz sonrası ortaya çıkan hücrelerde apoptozis artışına neden olduğu gösterilmiştir. Bu dokular I-R'un tetiklediği apoptotik yanıtı değerlendirmeye fazla izin vermezken, karaciğer ve intestinal epitel apoptozisi değerlendirmek için mükemmel organlardır (5, 6).

Apoptozisin önemi çeşitli biyolojik olaylarda gereksiz, hasarlı ya da zararlı hücrelerin yok edilmesini sağlamasından ve organizmanın iç dengesinin devamlılığına katkıda bulunmasından ileri gelmektedir. Apoptozis, gelişimde rol oynadığı gibi gastrointestinal sistem, karaciğer, epidermis gibi devamlı yenilenen dokularda da kendini gösteren bir süreçtir (7). Apoptozise karaciğer patolojilerinde de sıklıkla rastlanılmaktadır. Son yıllarda karaciğer hastalıkları ile apoptozisin birlikteliğine ilgi artmıştır. Etanol, asetaminofen, safra tuzları, sitotoksik ilaçlar ve diğer ajanlar nekroz ve/veya apoptozis yoluyla karaciğer hasarına neden olmaktadır (8).

Karaciğer artan fonksiyonel talebe bağlı (hepatik rezeksiyon, fazla beslenme, ciddi protein kaybı, gebelik vs) olarak hem hipertrofiye hem de hiperplaziye uğrayarak büyür. Uyarı ortadan kalkınca karaciğer, apoptozis sayesinde fazla hepatositleri ortadan kaldırarak normal haline döner (8).

Büyüme yanıtının başlaması hepatositler ve non-parankimal hücreler, ekstra-sellüler matris, endokrin, otokrin, parakrin ve nöroregülatuar faktörler, SOR, metabolitler ve besinler arasındaki karmaşık etkileşimler sonucu olmaktadır. Karaciğer kitlesinin yeniden oluşumunu ve büyümeyi sonlandıran mekanizmalar son yıllarda apoptozise doğru yönelmektedir (9,10).

Makalenin Geliş Tarihi : 30.04.2007

Makalenin Kabul Tarihi : 11.07.2007

\* Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD, KAYSERİ

\*\* Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD, KAYSERİ

\*\*\* Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, KAYSERİ

Dr. Alper AKCAN

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi

Genel Cerrahi Anabilim Dalı, 38039 / KAYSERİ

Tel: (0533) 743 03 57 Faks: (0352) 437 59 12

e-posta: acakcan@erciyes.edu.tr acakcan2002@yahoo.com

GM-CSF, 14 kDalton moleküler ağırlığında olan, aktive T hücreleri, endotelial hücreler, fibroblastlar, endotelial ve stromal hücreler ile makrofajlar tarafından sentez edilen glikoprotein yapısında bir büyüme faktörüdür (11). Makrofaj, nötrofil ve eozinofillerde myeloproliferasyonu, makrofaj kemotaksisini, makrofajlardaki sitokin üretimini artırmaktadır. GM-CSF değişik hemopoetik hücrelerin yaşam sürelerini, diferansiyasyonunu ve proliferasyonunu stimüle eden bir sitokindir (11,12). İn vitro çalışmalarda TNF, IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF gibi bazı proinflamatuvar sitokinlerin makrofaj ve nötrofil apoptozisini geciktirdiği gösterilmiştir (12).

Modern cerrahide karaciğer rezeksiyonları sıklıkla yapılmaktadır. Rejenerasyon esnasında karaciğerin eski boyutlarına ve fonksiyonlarına ulaşması, rejenerasyonun sonlandırılmasında ve karaciğerin yeniden şekillenmesinde yararlı olabileceğini düşünerek anti-apoptotik bir büyüme faktörü olan GM-CSF'ü çalışmamızda kullandık.

## Gereç ve Yöntem

### Deney düzeni

Çalışmada ağırlıkları 200-275 gram arasında değişen, 50 adet Wistar-Albino erkek rat kullanıldı. Ratlar randomize olarak her biri 10 rattan oluşan 5 gruba (Sham, kontrol ve çalışma gruplarına) ayrıldı. Çalışma öncesinde Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındı.

Ratlar deneyden 1 hafta önce laboratuvar koşullarına alınarak, 21°C'de barındırıldı ve standart rat yemeği ile beslendi. Deneyden önceki gece su serbest olmak üzere ratlar 12 saat aç bırakıldı. Bütün cerrahi işlemler sabah 08:00-11:00 saatleri arasında yapıldı. İntraperitoneal 50 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg xylazine ile anestezi sağlanıp, deney süresince spontan solunuma bırakıldı. Anestezi sonrası ratlar tartılarak kaydedildi.

**Grup I (Sham):** Hepatik manüplasyon ve portal triad diseksiyonu.

**Grup II (Kontrol grubu, 2. saat):** %0.9 NaCl, subkütan (SC) + 30 dakikalık total iskemi + parsiyel hepatektomi + 2 saat reperfüzyon.

**Grup III (Çalışma grubu, 2. saat):** GM-CSF + 30 dakikalık total iskemi + parsiyel hepatektomi + 2 saat reperfüzyon.

**Grup IV (Kontrol grubu, 48. saat):** %0.9 NaCl SC + 30 dakikalık total iskemi + parsiyel hepatektomi + 48 saat reperfüzyon. Bu gruptaki ratlara sakrifikasyon yapılmaya kadar günde tek doz 0.02 ml %0.9 NaCl, SC yapıldı.

**Grup V (Çalışma grubu, 48. saat):** GM-CSF SC + 30 dakikalık total iskemi + parsiyel hepatektomi + 48 saat reperfüzyon. Bu gruptaki ratlara sakrifikasyon yapılmaya kadar günde tek doz 1 µg/kg GM-CSF, SC yapıldı.

### Cerrahi işlem

Laparotomiden 60 dakika önce (plazma pik değerine ulaşması için) 1 µg/kg GM-CSF (13) (recombinant rat GM-CSF, Biosource International, California, USA), kontrol gruplarına da eşdeğer dozda 0.02 ml %0.9 NaCl, SC verildi. Sham grubu hariç diğer gruplara ameliyattan 1 saat önce sağ juguler ven kateterizasyonu yapılarak, majör cerrahi girişim öncesi sıvı replasmanı (%0.9 NaCl 10 mg/kg/saat) yapıldı. Kateterizasyon için 0.5x0.9 mm (Braun, Melsungen, Germany) kateter kullanıldı. Aneztezi boyunca ve postoperatif ilk 24 saat buradan sıvı replasmanına devam edildi.

Üst orta hat insizyon ile laparotomi yapıldı. Karaciğerde I-R modeli için portal triad diseke edildi. Bu işlem için mikrovasküler klemp (Harvard Apparatus, Inc. Holliston, MA, USA) kullanıldı. Çalışma ve kontrol gruplarındaki ratlara 30 dakikalık total iskemi sonrası %70 karaciğer rezeksiyonu uygulandı (14, 15). Higgins ve ark. (14) tanımladıkları yöntemle, orta ve sol lateral loblar vena kavaya birleşim ye-

rinden 4/0 ipek ile bağlanarak %70'lik karaciğer rezeksiyonu gerçekleştirildi. Çıkarılan karaciğer dokusu tartılarak kaydedildi. Rezeksiyon yapıldıktan sonra mikrovasküler klemp açılarak, sakrifikasyon süreleri doluncaya kadar reperfüzyona bırakıldı.

Deney süreleri dolan ratlara relaparotomi yapılarak inferior vena kavadan 4 ml kan ve karaciğer dokusundan örnekler alınarak -80°C'de saklandı. Ayrıca histopatolojik değerlendirme için karaciğer örneği formol ile tespit edilerek saklandı.

### Parametreler

#### 1. Rölatif karaciğer ağırlığı :

Otopsideki karaciğer ağırlığından parsiyel hepatektomi sonrası kalan karaciğer ağırlığı çıkartıldı ve bu değer tüm karaciğer ağırlığına oranı hesaplandı. Elde edilen değer 100 ile çarpılarak karaciğer rejenerasyon oranı bulundu (16). Tüm karaciğer ağırlığı rat ağırlığının %3,4'ü kabul edildi (17). Sonuçlar % şeklinde ifade edildi.

Rölatif karaciğer ağırlığı= [Otopsideki karaciğer ağırlığı- (tüm karaciğer ağırlığı-rezeke edilen karaciğer ağırlığı)/tüm karaciğer ağırlığı] x100 (16).

**2. Karaciğer enzimleri :** Serumlarda AST, ALT, LDH düzeyleri Konelab 60i (Thermo Clinical LabSystems, Espoo, Finland) otoanalizator cihazında ölçüldü ve IU/L olarak birimlendirildi.

**3. Hepatik MDA düzeyi :** Çalışma günü oda ısısında çözülen doku örneklerine 2 cc serum fizyolojik eklendi ve Virsonic 100 (Virtis Company Inc., New York, USA) ultrasonik homojenizatör yardımıyla homojenize edildi. Üst fazdan alınan numunenin absorpsanları spektrometri (Shimadzu Corporation, Japan) ile 532 nm dalga boyunda ölçüldü. Hazırlanan standart çözeltiden MDA değerleri nmol/ml olarak hesaplandı. MDA değerleri doku protein değerlerine bölünerek nmol/g protein olarak ifade edildi (18).

**4. Serumda sFas düzeyi:** Quantikine®, mouse soluble Fas immunoas-

**Tablo 1:** Karaciğerde oluşan iskemi-reperfüzyon hasarına ait histopatolojik değişikliklerin derecelendirilmesi (Suzuki skorlaması) [20].

Derece	Sinüzoidal konjesyon	Vakuolizasyon	Nekroz
0	Yok	Yok	Yok
1	Az	Az	Basit hücre nekrozu
2	Orta	Orta	0-30%
3	Fazla	Fazla	30-60%
4	Çok fazla	Çok fazla	> %60

say, (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) kiti kullanılarak ELISA yöntemi ile serum sFas düzeyi ölçüldü ve pg/ml olarak ifade edildi.

**5.Mitotik indeks (MI):** %10'luk formol içinde saklanan karaciğer örnekleri parafin bloklara gömülerek, 5-

7 mikron kalınlığında kesitler alındı ve Hematoksilen-Eosine (H&E) boyası ile boyandılar. MI; mitozun en fazla olduğu 30 sahadaki mitotik hepatositlerin ve total hepatositlerin sayısı bulundu ve her 1.000 hücreye oranı şeklinde ifade edildi (19).

**6. Histopatolojik analiz:** H&E boyası ile boyanan preparatlar ışık mikroskopu altında değerlendirildi. I-R hasarına bağlı karaciğerde oluşan histopatolojik değişiklikler için Suzuki skorlaması kullanıldı (20) (Tablo 1).

**7. Fas immünohistokimyasal (IHK) boyama:** Spesmenlerden kesitler alınarak, yapıştırıcı madde olarak poli-L-lizin ile kaplanmış lamlar üzerine alındı. Primer antikor olarak fare monoklonal antikor olan Fas (CD95/APO-1) (Dako Corporation, Carpinteria, USA) 1:10 dilüsyonda kullanıldı. Primer antikor uygulandıktan sonra 1 saat 37°C'lik etüvde bekletildi. IHK boyamada streptavidin-biotin kiti (Dako Corporation, Carpinteria, USA) kullanılarak avidin-biotin-peroksidaz metodu uygulandı. Pozitif kontrol olarak Fas (CD95/APO-1) için normal ince barsak mukozası kullanıldı.

**Tablo 2:** Parametrelerin karşılaştırılması.

	Sham (X±SD)		Kontrol (X±SD)	GM-CSF (X±SD)	F	P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>
Rölatif ağırlık (%)	0±0	2.saat	0±0	0±0	1266	<b>p&gt;0.05</b>	<b>p&gt;0.05</b>	<b>p&gt;0.05</b>	p<0.05 <sup>a</sup>
		48.saat	22.85±2.54	33.89±1.92		p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05 <sup>b</sup>
AST (IU/L)	85.8±3.3	2.saat	1345±42.3	1451.7±36.0	5774	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05 <sup>a</sup>
		48.saat	733.7±13.3	269.4±6.3		p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05 <sup>b</sup>
ALT (IU/L)	58.3±2.9	2.saat	964.0±20.0	1199.8±17.6	11087	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05 <sup>a</sup>
		48.saat	358.4±18.3	181.6±9.2		p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05 <sup>b</sup>
LDH (IU/L)	865.3±17.6	2.saat	4239.6±38.5	4195.2±26.8	23644	p<0.05	p<0.05	<b>p&gt;0.05</b>	p<0.05 <sup>a</sup>
		48.saat	2035.7±47.1	1537±19.9		p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05 <sup>b</sup>
MDA (nMol/g protein)	31.7±3.9	2.saat	154.1±2.3	183.7±2.3	3267	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05 <sup>a</sup>
		48.saat	100.7±4.9	59.7±3.3		p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05 <sup>b</sup>
sFas (pg/dl)	34.9±3.5	2.saat	303.7±3.5	215.9±2.9	15157	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05 <sup>a</sup>
		48.saat	106.6±2.0	64.0±2.2		p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05 <sup>b</sup>
MI (%)	0±0	2.saat	0±0	0±0	582	<b>p&gt;0.05</b>	<b>p&gt;0.05</b>	<b>p&gt;0.05</b>	p<0.05 <sup>a</sup>
		48.saat	7.20±1.03	12.0±1.25		p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05 <sup>b</sup>
Fas IHK (%)	1.5±0.7	2.saat	19.5±2.1	12.0±1.5	267	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05 <sup>a</sup>
		48.saat	7.2±1.03	4.1±1.2		p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05 <sup>b</sup>

P 1 : Sham ve kontrol grubunun karşılaştırılması  
P 2 : Sham ve çalışma grubunun karşılaştırılması  
P 3 : Kontrol ve çalışma grubunun karşılaştırılması  
P 4 : 2. ve 48. saatteki değerlerin karşılaştırılması  
[P 4a kontrol grubunun, P4b çalışma grubunun]  
IHK : İmmünohistokimya

**Tablo 3:** Suzuki skorunun karşılaştırılması.

	Sham (median)		Kontrol (median)	GM-CSF (median)	F	P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>
<b>Suzuki skoru</b>	0	2.saat	2.0 [1-3]	2.5 [2-3]	32	p<0.05	p<0.05	<b>p&gt;0.05</b>	<b>p&gt;0.05<sup>a</sup></b>
		48.saat	1.5 [1-2]	0.5 [0-2]		p<0.05	<b>p&gt;0.05</b>	p<0.05	p<0.05 <sup>b</sup>

P 1 : Sham ve kontrol grubunun karşılaştırılması

P 2 : Sham ve çalışma grubunun karşılaştırılması

P 3 : Kontrol ve çalışma grubunun karşılaştırılması

P 4 : 2. ve 48. saatteki değerlerin karşılaştırılması (P4a kontrol grubunun, P4b çalışma grubunun)

IHK değerlendirme 30 büyük büyüme sahasındaki sFas ile boyanmış hücre sayısı ve total hepatosit sayısı bulundu ve her 1000 hücreye oranı şeklinde ifade edildi (21).

### **İstatistiksel Değerlendirme**

Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma ( $X \pm SD$ ) ve median (min.-max.) olarak gösterildi. Grupların ve histopatolojik değerlerin karşılaştırılmasında Post-Hoc Sheffe (ANOVA) ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı. İstatistik; Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows (11.0 version) programında yapıldı.  $P < 0.05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### **Sonuçlar**

#### **1. Rölatif Karaciğer Ağırlığı**

**Sonuçları:** İkinci saatte kontrol ve çalışma grubunda rölatif karaciğer ağırlıklarında artma tespit edilmezken 48. saatte artış tespit edildi. 2 grup karşılaştırıldığında GM-CSF verilen grupta, SF grubuna göre daha belirgin artış saptandı ( $p < 0.05$ ) (Tablo 2).

#### **2. AST, ALT ve LDH Sonuçları:**

AST, ALT ve LDH değerleri karşılaştırıldığında Sham, kontrol ve GM-CSF gruplarında anlamlı farklılık saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). AST, ALT ve LDH değerlerinin 2. saate hem SF hem de GM-CSF verilen grupta belirgin pik yaptığı, 48. saatte belirgin olarak düşmeye başladığı gözlemlendi. Ancak 48. saatte 2 grup karşılaştırıldığında, 2. saatin aksine GM-CSF verilen grupta AST, ALT ve LDH değerlerinin daha fazla

normale yaklaştığı gözlemlendi ( $p < 0.05$ ) (Tablo 2).

**3. MDA Sonuçları:** Sham, kontrol ve çalışma gruplarında saptanan MDA değerleri karşılaştırıldığında tüm gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı ( $p < 0.05$ ). MDA değerlerinin 2. saatte pik yaptığı, GM-CSF verilen grupta bu pikin daha yüksek olduğu tespit edildi ( $p < 0.05$ ). MDA değerlerinde 48. saatte düşüklük gözlemlendi. Ancak 2. saatin tersine, GM-CSF verilen grupta MDA değerleri daha düşük bulundu ( $p < 0.05$ ) (Tablo 2).

**4. sFas Sonuçları:** Sham, kontrol ve çalışma gruplarında saptanan sFas değerleri karşılaştırıldığında tüm gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı ( $p < 0.05$ ). sFas değerlerinin 2. saatte pik yaptığı, GM-CSF verilen grupta bu pikin daha düşük olduğu tespit edildi ( $p < 0.05$ ). sFas değerleri 48. saatte düşük olarak gözlemlendi. Bu değerlerin GM-CSF verilen grupta, SF verilen gruba göre daha düşük olduğu görüldü ( $p < 0.05$ ) (Tablo 2).

#### **5. Mitotik İndeks (MI) Sonuçları:**

Sham ve 2 saatlik gruplarda birkaç hücrede mitoz görüldü, ancak MI olarak anlam ifade etmedi. MI değerleri 48. saatte belirgin olarak yüksek idi. 2 grup karşılaştırıldığında GM-CSF grubunda daha yüksek bulundu ( $p < 0.05$ ) (Tablo 2).

#### **6. I-R Hasarına Bağlı Gelişen Hepatik Hasarın Değerlendirme**

**Sonuçları:** Sham grubunda karaciğer hücre hasarının olmadığı gözlemlendi. Kontrol ve çalışma gruplarında 2. saat-

te önemli histopatolojik değişiklikler meydana geldi. Özellikle portal alan etrafında nekroz, ileri derecelerde sinüzoidal konjesyon ve vakuolizasyon gözlemlendi. GM-CSF verilen grup ile SF verilen grup arasında histopatolojik değişiklikler açısından anlamlı fark gözlemlenmedi ( $p > 0.05$ ). Bu değişiklikler reperfüzyonun 48. saatinde düzelmeye başladı. Ancak GM-CSF verilen grupta, SF verilen gruba göre histopatolojik hasarın daha belirgin azalma gösterdiğini saptadık ( $p < 0.05$ ). Sham ile GM-CSF verilen grup arasında anlamlı fark yoktu ( $p > 0.05$ ) (Tablo 3).

#### **7. Fas İHK Boyama Sonuçları:**

Fas işaretlenme oranları karşılaştırılmış ve 2.saatteki GM-CSF ve kontrol grupları ile sham grubu arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). SF verilen grupta 2. saatteki Fas işaretlenme oranı, GM-CSF verilen gruba göre daha fazla idi ( $p < 0.05$ ). Reperfüzyonun 48. saatinde rejenerasyonun artması ile birlikte Fas işaretlenmesi de azalmıştır. GM-CSF verilen grupta boyanma daha az idi (Tablo 2).

### **Tartışma**

Komplike karaciğer yaralanmalarında, karaciğer tümörleri veya kistleri için yapılan hepatik rezeksiyon sırasında ortaya çıkan kanamayı kontrol etmek, morbidite ve mortalite açısından oldukça önemlidir. Cerrahi tekniği kolaylaştırmak, bir çok cerrah için araştırma konusu olmuştur. İlk kez 1908 yılında Hogarth Pringle tarafından tarif edilen portal triadın klempe edilmesi

bu yöntemlerden biridir. Bu yöntem Pringle manevrası olarak adlandırılır (22). Pringle manevrası uygulandığı zaman vena mezenterika süperior yolu ile olan gastrointestinal sistemin (mide, duodenum, jejunum, ileum) venöz drenajı engellenmektedir. Bu durumda sadece karaciğer iskemisi değil, aynı zamanda gastrointestinal sistemde de bir venöz obstrüksiyon modeli oluşmaktadır. Suzuki ve ark. (20), yaptıkları çalışmada bu durumu engellemek amacıyla Pringle manevrası öncesi kateter ile portosistemik şant (portanın çekal dalı ile juguler ven) uygulamışlardır. Biz çalışmamızda gastrointestinal sistem göllenmesini engellemek ve sonuçları daha fazla etkilememek için total iskemi süresini 30 dakika ile sınırlı tuttuk.

Aminotransferazlardan AST ve ALT, akut hepatosellüler hasarın en iyi serum göstergeleridir. ALT başlıca karaciğerde bulunur ve AST'ye göre daha özgündür. Serumda laktat dehidrojenaz (LDH) artması spesifik olarak karaciğer fonksiyon bozukluğunu gösteren bir bulgu değildir, hücre hasarını yansıtmaktadır. Bu enzimler parankim hasarının olduğu dönemden itibaren yükselmeye başlar. Enzimlerin serum değerlerindeki yükselme hepatosellüler hasarın boyutlarını yansıtır (23). Delva ve ark. 60-90 dakikalık iskemi sonrası AST ve ALT düzeylerinin arttığını ve 7. gün normale yakın seviyelere geldiğini bildirmişlerdir (22). Bizim çalışmamızda GM-CSF kullanımı ile hepatik fonksiyonlar daha hızlı yerine gelmiş ve hücresel hasarın düzeyi azalarak, rejenerasyon daha hızlı gelişmiştir.

İskemik dokuda ortaya çıkan SOR'nin birçok zincirleme reaksiyon sonucunda lipid peroksidasyonuna neden olduğu bilinmektedir. MDA doku, kan ve vücut sıvılarında ölçülerek lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Doku iskemisi uygulanan bir çok deneysel çalışmada kan ve dokuda MDA düzeylerinin yükseldiği ve bu değerle-

rin birbirleriyle korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (24, 25). Çalışmamızdaki MDA sonuçları, I-R ile birlikte ortaya çıkan SOR'nin, GM-CSF'ün de reperfüzyonun başlarındaki katkısıyla, lipid peroksidasyonunu artırmış olabileceğini göstermektedir. Reperfüzyonun ileri aşamalarında anti-apoptotik etkileri, immün sistemin regüle edilmesine olumlu katkısı, hepatosit onarım fonksiyonlarını artırması nedeniyle GM-CSF'ün karaciğeri I-R hasarından koruyabileceği ve rejeneratif aktiviteye katkıda bulunabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Çağlıküleçki ve ark. (13) deneysel tıkanma sarılığı modeli oluşturup, GM-CSF uygulayarak RES fonksiyonlarının önemli ölçüde düzeltildiğini göstermişlerdir. Yine başka bir çalışmada tıkanma sarılığında GM-CSF uygulanması ile immün parametrelerin düzeltilebileceği deneysel olarak gösterilmiştir (26). Groopman ve ark. (27) AIDS'li hastalarda 14 gün süre ile günde tek doz GM-CSF kullanımının nötropeniyi engellediğini bildirmektedirler. Ancak AIDS'li hastalarda yapılan bir diğer çalışmada, GM-CSF'ün nötrofil apoptozisini inhibe etmesinin fagositik fonksiyonlara yararlı etkisinin yanında, anormal inflamasyon sonucu akciğer dokusundaki yıkımın ARDS riskini artırabileceğini ileri sürmektedirler (12).

Çalışmamızda 2. saatte kontrol ve çalışma grubunda önemli histopatolojik değişiklikler meydana geldi. İleri derecede sinüzoidal konjesyon, vakuolizasyon ve portal alan etrafında da nekroz gözlemlendi. GM-CSF verilen grupta 2. saatteki histopatolojik değişiklikler, SF verilen gruptan farklı değildi. Bu değişiklikler reperfüzyonun ileri dönemlerinde düzelmeye başladı. Reperfüzyon hasarı 48. saatte anlamlı şekilde azalma gösterdi. İskemi ve daha sonra reperfüzyonun karaciğer hücrelerinde oluşturduğu histopatolojik değişiklikler, reperfüzyonun ileri aşamalarında GM-CSF etkisiyle azalmaktadır. GM-CSF'ün karaciğer

üzerine hücresel hasarın daha hızlı düzelmesinde rol oynadığını düşündürmektedir. GM-CSF verilirken 48 saat reperfüzyon yapılan grupta histopatolojik hasarın sham grubu ile fark göstermemesi ( $p>0.05$ ) GM-CSF'ün histopatolojik hasar üzerindeki olumlu etkisini göstermektedir.

Sileri ve ark. pürivat uygulanması ile hepatik I-R hasarının azaltulmasını gösteren bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada reperfüzyonun 2. saatinde hasarın maksimum olduğu, 48. saatinde ise düzelmeye gösterdiği bildirilmektedir. Ayrıca apoptozisin göstergesi olan DNA fragmentasyonunun ve TUNEL pozitif hücre sayısının yine 2. saatte en yüksek değerlere ulaştığı, 48. saatte ise belirgin azalma gösterdiği bildirilmektedir. Aynı çalışmada IR hasarında SOR ve apoptozisin önemi de vurgulanmaktadır (28). Bulunan değerler çalışmamızın sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Karaciğer rejenerasyonu hepatositlerin, matriks yapıların ve endoteliumun kombine hipertrofi ve hiperplazisi ile ortaya çıkar. Karaciğer ağırlığının (volüm) parsiyel hepatektomi ile azaldığı durumlarda kalan karaciğer dokusunda parankimal ve non-parankimal hücrelerde büyüme olur. Parankimal hücrelerde DNA replikasyonu başlar ve bunu non-parankimal hücrelerin DNA replikasyonu izler. Parsiyel hepatektomiden sonra 8 hafta içinde karaciğer ağırlığı vücut ölçüsü için optimal seviyeye ulaşır (29).

Xu ve ark. (30), yaptıkları deneysel çalışmada parsiyel hepatektomi sonrası safra sekresyonu ve karaciğer rejenerasyonu arasındaki ilişkiyi karşılaştırmışlar ve %75 hepatektomi yaptıkları ratlarda 3. gün sonunda rezeksiyon sonrası karaciğer ağırlığında %108.8 oranında artış olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada da 48. saatte SF verilen grupta rölatif karaciğer ağırlığı ortalama değerleri (%)  $22.85 \pm 2.5$  iken, GM-CSF uygulanan grupta  $33.89 \pm 1.92$  bulunmuştur. Bu fark anlamlıdır ( $p<0.05$ ). Buradan

GM-CSF'ün morfolojik olarak karaciğer rejenerasyonuna pozitif etkili olduğu sonucunu çıkarmaktayız. Bu çalışmada rejenerasyon oranı literatürle karşılaştırıldığında oldukça düşük görülmesinin nedeni, rejenerasyon oranı hepatektomi öncesi ağırlığa göre ifade edilmesidir. Xu ve ark. (30) çalışmasında ise sonuçlar hepatektomi sonrası kalan ağırlığa oranlanarak ifade edilmiştir.

Normal koşullarda karaciğerde hiç mitoz görülmezken, toksik ya da non-toksik (parsiyel hepatektomi) olaylar karşısında mitotik aktivitede artış olur. Mitotik hücrelere parsiyel hepatektomi sonrası 24 ve 48. saatlerde sık olarak rastlanmaktadır (19,31). Laconi ve ark. (31) %70 hepatik rezeksiyon yaptıkları ratlarda mitotik hücre sayısının hepatektomi sonrası 24 ve 48. saatlerde 72 ve 144. saatlere oranla daha yüksek olduğunu gösterdiler. Selzner ve ark. (19) tarafından yapılan çalışmada hepatektomi sonrası mitotik indeks 24. saatte %2, 48. saatte %3 oranında bulunmuştur. Çalışmamızda 2. saatte mitoz çok nadir görüldü, ancak MI olarak anlam taşımadı. GM-CSF verilen gruptaki MI, 48. saatte kontrol grubuna göre daha yüksek idi. Bu da GM-CSF'ün karaciğerde hepatositler üzerine anti-apoptotik etkisinden dolayı rejenerasyonu artırıcı etkisi olduğunu düşündürmektedir.

Apoptozis kontrol ve düzenleme aşamasında ölüm reseptörleri, adaptör moleküller, caspase kaskadı, mitokondri ve Bcl-2 ailesinin dahil olduğu ölüm sinyalleri ile bağlantıyı sağlayan çeşitli proteinler vardır (32). Caspase aktivasyonunun tetiklenmesinde iki önemli uyarı yolu vardır. Biri mitokondri bağımlı, diğeri ise TNF reseptör-1 (TNFR-1) ve Fas molekülü ile ilişkili ölüm reseptörleridir (32, 33). Fas ile Fas-L etkileşimi hücre ölüm reseptörlerinin sinyal yolunu anlamada muhtemel en basit senaryodur. Fas (CD95/APO-1), TNFR-1 ve onların bağlantılı olduğu ligandların uyarılması sonucu indüklenir. Kendine doğal

olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri (Death Domain) adı verilen TRADD (TNFR-1 Associated Death Domain) ve FADD (Fas Associated Death Domain) ile etkileşime girer. Bu ölüm bölgeleri procaspase 8'i aktifleştirerek hücrede hızla ölüm ile sonuçlanan sinyal kompleksinin ortaya çıkmasına, caspase dizisinin aktivasyonuna ve apoptozise yol açar (32,33). Hepatositler Fas reseptörleri (CD95) taşıdıkları, CD95 stimülasyonuna oldukça duyarlıdır. Bir tek CD95'in uyarılması apoptozis indüksiyonuyla hücre ölümüne neden olabilir (8,34). Çalışmamızda hepatositlerdeki apoptozisi göstermek amacıyla İHK olarak Fas boyaması yaptık.

İHK olarak Fas reseptörlerinin boyanması sonucu elde edilen bulgular iskemi ve reperfüzyonun ilk saatlerinde, I-R hasarına bağlı apoptozisin başlatıldığını, ancak reperfüzyonun 48. saatinde apoptozisin anlamlı oranda düştüğünü göstermektedir. Fas İHK boyama sonuçları, GM-CSF verilen ve 48 saat reperfüze edilen grupta kontrol grubuna göre belirgin azalma göstermesi ( $p < 0.05$ ) GM-CSF'ün anti-apoptotik etkisini ve apoptozisin engellenmesiyle karaciğer rejenerasyonundaki olumlu etkilenmeyi göstermektedir. Rejenerasyon ve apoptozis 48. saatte sonra değerlendirilseydi ratlarda rejenerasyonun son bulunduğu noktada (7-10. günler) apoptozisin artması beklenebilirdi.

Bir çalışmada GM-CSF'ün Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyesi olan Bcl X<sub>L</sub> ve karaciğer rejenerasyonunun erken dönemlerinde önemli olan acil-erken gen c-myc seviyesini artırarak etki ettiği bildirilmiştir. Bcl-2 tümörögenезise öncülük etmek için önemli bir gen olan c-myc ile ilişki halindedir. Ayrıca bu çalışmada JAK-2 (Janus Kinase), MEK (Kinase 1) ve ERK (Extracellular signal-regulated kinase) bu antiapoptotik etki mekanizmasında önemli roller üstlenmektedir (35).

İskemi, ardından parsiyel hepatik rezeksiyon yapıldı, 2. saatte sakrifiye edilen ratlarda serum eriyebilir Fas dü-

zeylerinden elde edilen sonuçlar Fas İHK boyama sonuçlarıyla tamamen paraleldir ve GM-CSF'ün apoptozisi azaltarak rejenerasyon üzerindeki olumlu etkilerini desteklemektedir.

Taira ve ark. (10) ratlarda parsiyel hepatektomi sonrası PCNA işaretlenme oranının karaciğer rejenerasyonunun 1-3. günler arasında pik yaptığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada Fas ve Fas ligandın maksimal düzeyinin 3-5. günlerde olduğu görülmüştür. Apoptozisin göstergesi olan TUNEL pozitif hücre sayısının 1 hafta sonra yükseldiğini tespit etmişlerdir. Fas ile TUNEL pozitif hücre sayılarının tam örtüşmeyen bu ilişkisi Fas sistemin sadece apoptozisi artırmadığını, Fas sisteminin rejenerasyonu hem başlatıcı, hem de sonlandırıcı rollerinin olduğu şeklinde yorumlamışlardır. Çalışmamızda rejenerasyonun başladığı ilk saatlerde sFas düzeyinin sham grubuna göre daha yüksek olduğu, rejenerasyonun en yüksek düzeye ulaşmaya başladığı 48. saatte ise azaldığı tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlar Taira ve ark. (10)'nın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir ve Fas reseptörlerinin rejenerasyonu başlatıcı ve durdurucu rollerinin olduğu yönündeki yorumu desteklemektedir.

Ratlarda ekzojen olarak uygulanan GM-CSF, pringle manevrasını takiben, %70 hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunu gerek morfolojik, gerekse fonksiyonel olarak artırmış, ileri dönemde ortaya çıkan I-R hasarına bağlı hepatik hasarı azaltmıştır. Bu çalışmada hepatik hasarın azalması ve rejenerasyonun artması GM-CSF'ün anti-apoptotik etkisinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Ancak bu çalışmada gösterilmemekle birlikte GM-CSF'ün RES fonksiyonlarını düzenleyici ve immün sistemi destekleyici etkilerinin de katkısı olabilir. Bu nedenle GM-CSF, cerrahi sonrası karaciğer rejenerasyonunun hızlandırılmasında etkili olabilecek bir ajan olarak umut vermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN. Role of oxygen free radicals in shock, ischemia and organ preservation. *Surgery*, 1983; 94: 428-432.
2. Fujii Y, Johnson ME, Gores GJ. Mitochondrial dysfunction during anoxia-reoxygenation injury of liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*, 1994; 20: 177-185.
3. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, et al. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant for liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol*, 1994; 145: 1421-1423.
4. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972; 26: 239-257.
5. Namura S, Zhu J, Fink K, et al. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci*, 1998; 18: 3659-3668.
6. Yue TL, Ma XL, Wang X, et al. Possible involvement of stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas receptor expression in prevention of ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis by carvedilol. *Circ Res*, 1998; 82: 166-174.
7. Johnson LR, McCormack SA. Physiology of the Gastrointestinal Tract. Johnson LR, [Ed.], New York, 1994; pp 611-641.
8. Galle PR, Mülter M. Apoptosis in the liver. In: Bircher J, [Ed.]. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology* (2nd ed.). Oxford University Press, Oxford 1999; pp 202-212.
9. Victor Ankoma-Sey. Hepatic regeneration. *News in Physiological Sciences*, 1999; 14: 149-155.
10. Taira K, Hiroyasu S, Shiraishi M, et al. Role of the Fas system in liver regeneration after a partial hepatectomy in rats. *Eur Surg Res*, 2001; 33: 334-341.
11. Gough NM, Nicola NA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Immunol Ser*, 1990; 49: 111-153.
12. Goodman ER, Stricker P, Velavicius M, et al. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and its receptor in the genesis of acute respiratory distress syndrome through an effect on neutrophil apoptosis. *Arch Surg*, 1999; 134:1049-1054.
13. Çağlıküleki M, Oruç T, Aydınurak K, et al. Deneysel tıkanma sarılığı modelinde granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) uygulanmasının RES fonksiyonlarına etkisi. *Ulusal Cerrahi Dergisi*, 2000; 16: 33-38.
14. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver: Restoration of the liver on the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*, 1931; 12: 186-202.
15. Wang X, Andersson R, Soltész V, et al. Bacterial translocation after major hepatectomy in patients and rats. *Arch Surg*, 1992; 127: 1101-1106.
16. Fishback FC. A morphologic study of regeneration of the liver after partial removal. *Arch Pathol*, 1929; 7: 956-977.
17. Kagure K, Zhang YQ, Shibata H, Kojima I. Immediate onset of DNA synthesis in remnant rat liver after %90 hepatectomy by an administration of follistatin. *J Hepatol*, 1998; 28: 977-984.
18. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid

## Summary:

### Role of granulocyte-macrophage colony stimulating factor on apoptosis induced by ischemia-reperfusion and liver regeneration in the experimental hepatic resection model

**Purpose:** The aim of the study is to investigate the effects of Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) on ischemia-reperfusion induced apoptosis and hepatic regeneration in a partially hepatectomized rat model.

**Materials and Methods:** Fifty rats were used and they were divided into five groups, each including ten rats. A jugular vein catheter placed to all except sham group and normal saline infusion was started 1 hour before operation. A midline laparotomy performed. Sham group rats were sacrificed after portal dissection. Total ischemia performed to the other groups, after 70% hepatectomy the occlusion opened for reperfusion of the remnant liver. Before the operation (60 min.) 0.02 ml normal saline was given to control groups and 1 µg/kg GM-CSF was given to study groups subcutaneously administered. Blood samples were collected from v cava inferior for AST, ALT, LDH and sFas levels at the 2nd and 48th hours of reperfusion with performing relaparotomy. Remaining liver tissues were resected and weighed. Relative liver mass, malondialdehyde (MDA), mitotic index and Fas immunohistochemical (IHC) staining evaluations from tissue samples were performed.

**Results:** Mitotic index and relative liver weights at GM-CSF group were significantly higher at 48th hour ( $p<0.05$ ). AST,ALT ve LDH levels were increased at 2nd hour. However these levels were decreased in the study group at the 48th hour. Hepatic MDA level was high at 2nd but lower at 48th hour than other groups. sFas level and Fas IHC stainings were similar. But they were lower at 2nd and 48th hours in the GM-CSF group ( $p<0.05$ ). Ischemia-reperfusion injury was high at 2nd hour and but there was no difference between saline and GM-CSF groups. However the injury decreased significantly at 48th hour, at the study group.

**Conclusions:** GM-CSF, increases liver regeneration both morphologically and functionally after Pringle maneuver and partial hepatic resection. This application also decreases apoptosis and ischemia-reperfusion injury at the advanced stages of reperfusion.

**Key Words:** Ischemia-reperfusion, hepatic resection, apoptosis, Fas, GM-CSF

19. Selzner M, Clavien PA. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: Disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology*, 2000; 31: 35-42.
20. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation*, 1993 ; 55: 1265-1272.
21. Fukuzawa Y, Takahashi K, Furuta K, et al. Expression of Fas/Fas ligand (FasL) and its involvement in infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma (HCC). *J Gastroenterol*, 2001; 36: 681-688.
22. Delva E, Camus Y, Nordlinger B, et al. Vascular occlusions for liver resections. *Ann Surg*, 1989; 209: 211-218.
23. Büyükoztürk K. Karaciğer Hastalıkları. Ökten A, Yalçın S (Eds.). İc Hastalıkları. Bayda AS. İstanbul, 1992; ss 811-854.
24. Caraceni P, Rosenblum ER, Van Thiel DH, Borle AB. Reoxygenation injury in isolated rat hepatocytes: Relation oxygen free radicals and lipid peroxidation. *Am J Physiol*, 1994; 266: 799-806.
25. Giakoustidis D, Papageorgiou G, Iliadis S, et al. Intramuscular administration of very high dose of  $\alpha$ -Tocopherol protects liver from severe ischemia/reperfusion injury. *World J Surg*, 2002; 26: 872-877.
26. Çağlıküleki M, Ayaz S, Bayramoğlu E, et al. Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör uygulanmasının tıkanma sarılığı oluşturulan deneklerde immünojenik parametrelere etkisi. *Ulusal Cerrahi Dergisi*, 1998; 14: 309-315.
27. Groopman JE, Mitsuyasu RT, De Leo MJ et al. reaction. *Anal Biochem*, 1979;95:351-358.
28. Sileri P, Schena S, Morini S, et al. Pyruvate inhibits hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Transplantation*, 2001; 72: 27-30.
29. Columbano A, Ledda GM, Sirigu P, et al. Liver cell proliferation induced by a single dose of lead nitrate. *Am J Pathol*, 1993; 110: 83-88.
30. Xu HS, Rosenlof L, Jones S. Bile secretion and liver regeneration in partially hepatectomized rats. *Ann Surg*, 1993; 218: 176-186.
31. Laconi S, Curreli F, Diana S, et al. Liver regeneration in response to partial hepatectomy in rats treated with retrorsine: a kinetic study. *J Hepatol*, 1999; 31: 1069-74.
32. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*, 2001; 92: 57-70.
33. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998; 281: 1305-1308.
34. Cheng J, Zhou T, Liu C, et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science*, 1994; 263: 1759-1762.
35. Liu R, Itoh T, Arai K, Watanabe S. Two distinct signaling pathways downstream of janus kinase 2 play redundant roles for antiapoptotic activity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Mol Biol Cell*, 1999; 10: 3959-3970.

## KATKIDA BULUNANLAR:

**Çalışmanın düşünülmesi ve planlanması:**  
İlkay Güler, Engin Ok  
**Verilerin elde edilmesi:**  
İlkay Güler, Alper Akcan, Namık Yılmaz

**Verilerin analizi ve yorumlanması:**  
Hülya Akgün, Sebahattin Muhtaroğlu  
**Yazının kaleme alınması:**  
İlkay Güler, Alper Akcan

**İstatistiksel değerlendirme:**  
İlkay Güler, Alper Akcan, Engin Ok