

Ratlarda deneysel tıkanma ikteri modelleri

Experimental jaundice models in rats

Öz

Tıkanma ikteri klinikte sık olarak karşılaşılan bir tablodur. Sıklıkla safra yolları taşları, kolanjiyo kanserler ve pankreas kanserleri nedeniyle oluşmaktadır. Tıkanma ikteri nedeniyle oluşan hepatoselüler hasarın mekanizmasının ortaya koyulması tedavideki yeni alternatif tedavilerin geliştirilmesi açısından önemlidir. Bu nedenle tıkanma ikteri deneysel modelinin başarılı bir şekilde uygulanması gerekmektedir. İrreversible tıkanma ikteri modelinin uygulanması genellikle başarılı olmaktadır. Ancak irreversible tıkanma ikteri modellerinde; tıkanma ikterinin çözülmesinde başarı sağlanmasında teknik zorluklar mevcuttur. Bu nedenle farklı reversible tıkanma ikteri modelleri geliştirilmiştir. Literatür eşliğinde tıkanma ikteri deneysel modellerini değerlendirmek ve pratik uygulamada ki teknik zorlukları ortaya koymak istedik. Deneysel çalışma planlamasında uygulanabilir bir modelin seçilmesi çalışmanın başarısı açısından önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Tıkanma ikteri, deneysel model, rat

Abstract

Obstructive jaundice is a common clinical table. Often causes are biliary stones, cholangio-cancers and pancreatic cancers. It is important to elucidate the mechanism of hepatocellular damage caused by jaundice; in order to development of a new alternative therapy in the treatment. Thus; experimental model of obstructive jaundice needs to be implemented successfully. Model of irreversible obstructive jaundice is usually implemented successfully. However, in models of irreversible obstructive jaundice, success in resolving jaundice; technical difficulties are present. Therefore, different reversible obstructive jaundice models have been developed. We wanted to evaluate experimental model of obstructive jaundice In light of literature and put forward practical application of technical difficulties. While planning experimental studies, for the success of the study, selecting a model applicable is important.

Keywords: Obstructive jaundice, experimental models, rat

* Özgür Türk
** Bartu Badak

* Sivrihisar Devlet Hastanesi
Genel Cerrahi Kliniği,
Eskişehir
** Banaz Devlet Hastanesi
Genel Cerrahi Kliniği, Uşak

Yazışma Adresi:
Uz. Dr. Özgür Türk
Sivrihisar Devlet Hastanesi
Genel Cerrahi Kliniği 26040
Eskişehir
Email: drozgurturk@gmail.com

Giriş

Tıkanma ikteri klinikte sık olarak karşılaşılan bir tablodur. Safra kanalında tıkanıklık koledok taşı, hepatokolanjiyo kanserler, pankreas kanserleri gibi birçok sebeple oluşabilmektedir. Safra kanalı tıkanıklığının sonucunda tıkanma ikteri oluşmakta; bununla beraber karaciğer hasarı meydana gelmektedir. Ayrıca tıkanma ikteri nedeniyle hepatosellüler nekroz, biliyer kanal epitelyum hücrelerinde proliferasyon ve karaciğer fibrozisine yol açan Stellate hücrelerinin aktivasyonu gerçekleşir. Karaciğerde tıkanma ikteri nedeniyle bir inflamasyon oluşur, inflamatuvar sitokinlerin salınımı ve toksik oksijen radikallerinin salınımı ile karaciğer hasarı ortaya çıkar. Tıkanma ikteri süresi uzadığı zaman safra yolları epiteline proliferasyon başlamaktadır. İkteri gelişiminin 48.saatinden itibaren hepatosellüler proliferasyon başlar ve 5. gün pik seviyesine ulaşır ve devamında bazal bir seviyede devam etmektedir. Tıkanma ikteri gelişiminde ilk 7 günlük süreçteki değişiklikler akut kolestatik hasar; sonrasında ki değişiklikler ise kronik kolestatik hasar olarak tanımlanmaktadır(1).

Obstrüktif, inflamatuvar ve genetik süreçler gibi çeşitli patolojiler karaciğerde kolestazla sonuçlanmakta ve sitotoksik safra asitleri karaciğerde nekroz ve fibrozise yol açmaktadır(2). Klinik olarak tıkanma ikteri tablosu böbrek yetmezliği, koagülasyon bozuklukları, malnütrisyon, sepsis ve yara iyileşmesinde gecikme gibi problemlere yol açabilmektedir. Tıkanma ikteri tablosu ile kliniğe başvuru hastalarda eksternal veya internal biliyer drenaj işlemi yapılmaktadır. Kronik kolestatik hasar oluşmuş olan karaciğer dokusunda biliyer drenaj işlemi sonrasında postiktirik karaciğer hasarı gelişmektedir. Ratlarda koledok ligasyon modeli klinik olarak insanlarda karşılaşılan kolestatik karaciğer hastalıklarına uyumlu bir modeldir. Bu deneysel model üzerinden gidilerek ratlarda reversible tıkanma ikteri tablosu oluşturulmuş ve postiktirik değişiklikler ortaya konulmaya çalışılmıştır(3). Tıkanma ikteri tablosunun deneysel olarak oluşturulmasında farklı deneysel modeller mevcuttur. Deneysel modeller reversible ve irreversible olarak sınıflandırılabilir. Ayrıca cerrahi öncesi ratların hazırlığı ve cerrahi sonrası bakımı ile ilgili önemli noktalar unutulmamalıdır.

Cerrahi Öncesi Hazırlık

Ratlara uygulanacak cerrahi işlem öncesinde en az 8 saatlik açlık süresi gereklidir. Ratlar cerrahi işlem öncesinde uygun sıcaklıkta bir ortamda bulundurulmalıdır. Cerrahi öncesinde profilaktik antibiyotik ve premedikasyon amaçlı analjezik kullanımına gerek yoktur. Cerrahi antisepsi kurallarına uyulmalıdır. Cerrahi orta hat insizyonu için bölgesel temizlik yapılmalıdır. Tercihen elektrikli bir traş makinesi ile traş edilerek tüylerden arındırılmalıdır. Cerrahi alan uygun antiseptik solüsyon ile temizlenmelidir. Denek sırt üstü yatırılarak supin pozisyonunda sabitlenmelidir. Kullanılacak cerrahi aletlerin de temizliğinin ve antisepsisinin yeterli olması gerekmektedir. Cerrahi uygulamak için özel bir alana gereksinim yoktur. Laboratuvar ortamında gerçekleştirilebilir. Anestezi uygulanması için ve cerrahi prosedürde cerraha yardımcı bir asistan olması tercih edilebilir(4).

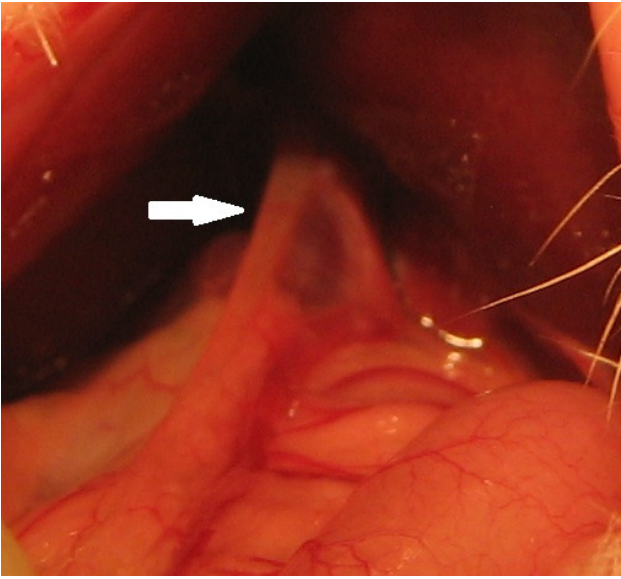
Anestezi Uygulanması

Ratlarda deneysel çalışmalarda tercih edilebilecek farklı anestetik ajanlar ve kombinasyonları mevcuttur. İntraperitoneal uygulama en güvenilir yoldur. Göbeğin hemen lateralinden paramedian olarak 25 G iğne ile yapılır. En fazla 5 ml enjeksiyon yapılmalıdır. 75-100mg/kg ketamin intraperitoneal uygulanmasını takiben ratlarda yaklaşık olarak 15-20 dakikalık bir anestezi sağlanmaktadır. Ketaminin tek başına kullanımı derin bir anestezi sağlamakta yetersiz kalmaktadır. 60 mg/kg ketamin ile 5-10 mg/kg Xylazine intraperitoneal uygulanmasıyla sağlanan kombine anestezide 30 dakikaya kadar anestezi sağlanabilmektedir. Anestezinin erken sonlandırılması amacıyla yohimbine kullanılabilir. Ayrıca 75 mg/kg ketamin ile 0,5 mg/kg Medetomidine kombinasyonun intraperitoneal kullanımı diğer bir tercihtir.

Tıkanma İkteri Modelleri

Deneysel tıkanma ikteri modeli ile çalışma planlanırken sarılığın geri dönüşümlü olup olmayacağı modelin belirlenmesinde en önemli basamaktır. Çözülmesi gereken bir sarılık modeli oluşturulacak ise geri dönüşümlü ikteri modelleri tercih edilmelidir. Koledok kanalının tekrar safra akışını sağlayacak bir tekniğin tercih edilmesi önemlidir. Kalıcı bir tıkanma ikteri oluşturulması gerekiyor ise geri dönüşümsüz model

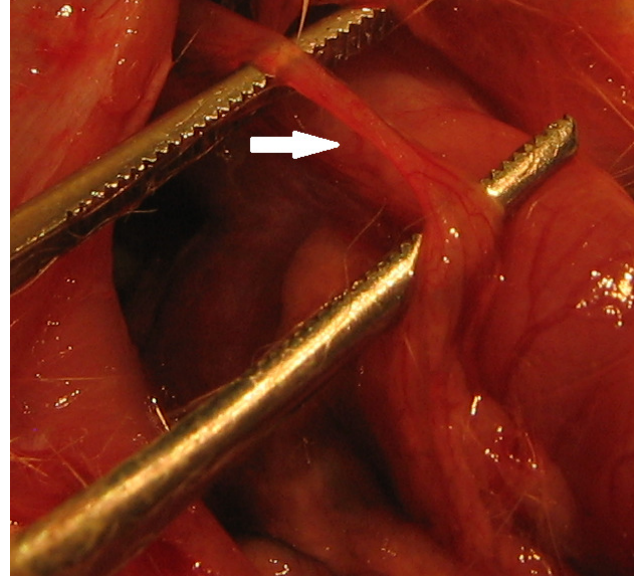
tercih edilmelidir. Koledogun kalıcı olarak bağlanmasını sağlayacak ve rekanalizasyon ihtimalini önleyecek bir model seçilmelidir. Cerrahi teknik olarak her iki modelde de ortak safra kanalının ortaya konması gerekmektedir. Deneğin hazırlanmasını takiben ksifoid çıkıntıdan itibaren 2-3 cm'lik bir kesi ile batına girilir. Mide bulunarak takip edilerek duodonuma ulaşılır. Duodonum öne ve aşağı doğru çekilir bu esnada karaciğer hilusundan duodonuma uzanan ana safra kanalı görülür (Şekil 1). Keskin olmayan bir aletle etraf yağ dokular ayrılarak ana safra kanalı disseke edilir (Şekil 2).



Şekil 1. Duodonum öne ve aşağı çekilerek ana safra kanalı görülür.

a. Geri Dönüşümsüz Tıkanma İkteri Modelleri

Ana safra kanalı proksimal ve distalden absorbe olmayan sütür mataryeli ile bağlanır. Distale daha yakın olmak üzere iki sütür arasından ana safra kanalı kesilir. Kesildikten sonra safra akışının olmadığı veya safra kaçağı olmadığı görülmelidir. Ana safra kanalı kesilmeden bırakılabilir. Düğümlerin yeterince sıkı olmaması durumunda safra akımı devam edebilir. Bazen safra akışında rekanalizasyon olabilir. Ana safra kanalının kesilmesiyle oluşturulan modelde ise proksimal düğüm ana safra kanalının genişlemesini takiben açılabilen ve hem yeterli sarılık oluşmamakta hem de safra peritoniti oluşmaktadır. Bunu önlemek amacıyla proksimal kısım çift bağlanabilir veya bir miktar doku bırakılarak ana safra kanalının açılması engellenebilir.



Şekil 2. Disseksiyon sonrası ana safra kanalı.

b. Geri Dönüşümlü Tıkanma İkteri Modelleri

Tıkanma ikteri modellerinde farklı geri dönüşümlü modeller denenmiştir. Geri dönüşümlü modeller sayesinde tıkanma ikteri oluşması esnasında oluşan etkiler araştırılırken tıkanma ikteri çözülmesini takiben oluşacak değişikliklerinde araştırılması mümkün olmuştur. Geri dönüşümlü tıkanma ikteri modeli oluşturulmasında cerrahi teknik açısından bazı sıkıntılarla karşılaşmaktadır. Safra kanalı ligasyonu ve kanülasyonu, internal veya external drenaj teknikleri, kanülasyon tüplerinin subkutan tünel uygulaması, ana safra kanalı arasına tüp yerleştirilmesi, safra kanalının klempenmesi gibi birçok geri dönüşümlü model yayınlanmıştır (5). Bu modellerin birçoğu cerrahi tekniğin uygulanmasındaki zorluklar ve yüksek morbidite nedeniyle yaygın kullanılmamıştır. İdeal bir model kolay uygulanabilir olmalı; mortalite ve morbiditesi düşük olmalıdır(3). Ana safra kanalının kanülasyonu ve ligasyonunun uygulandığı cerrahi tekniklerde safra kanalı arasına yerleştirilen kanül batın dışına alınarak klempenmiştir. Klempin açılması ile tekrar safra akışının sağlanmış ve tekrar cerrahi müdahaleye gerek kalmamıştır. Kanülasyonun teknik olarak uygulanmasındaki zorluklar ve kateterin enfeksiyon oluşturma riski nedeniyle çok fazla rağbet görmemiştir (6, 7). Drenaj tüpü kullanılan tüm modellerde tıkanma olma ihtimali yüksek

olduğundan dolayı uzun süreli çalışmalarda uygulanması tercih edilmemiştir(8). Wen Li ve ark. Yapmış olduğu İnternal ve eksternal safra drenajı karşılaştırmalı çalışmada ortak safra kanalının bağlanmasından yedi gün sonra ikinci operasyon yapılmıştır. Bir grupta koledokoduedonostomi ile internal drenaj sağlanmış. Diğer bir grupta ise 15 cm'lik bir tüp safra kanalına yerleştirilip sabitlenmiş ve cilt altında ilerletilerek boyun bölgesinde sonlandırılmıştır. İnternal drenajın eksternal drenaja göre daha üstün olduğu tespit edilmiştir (7). Oruç ve arkadaşlarının yayınladığı yeni bir model de ana safra kanalı ortaya konduktan sonra safra kanalı etrafına damar kanülü yerleştirilerek ligasyon yapılmıştır. Safra kanalı etrafındaki sütürün kesilmesi esnasında daha az yapışıklık olduğu gözlenmiştir. İkinci laparotomi esnasında daha az kanama ile karşılaşmıştır. Bu yeni yöntem kolay uygulanabilir, geri dönüşümlü ve daha inandırıcı olarak tanımlanmıştır(3).

Rodriguez ve ark. yaptığı çalışmada koledok ligasyonu koledok etrafına sarılan bir kanül üzerine yapılan çift bağlama ile gerçekleştirilmiştir. Ligasyonu takiben 7-10. günlerde ligasyon çözülmüş ve tıkanma iktinin gerilediği gözlenmiştir (9).Ancak reversible koledok ligasyonunda koledokta oluşan fibrozisin tıkanma ikteri tablosunun tamamen normale dönmesini engellediği düşünülerek farklı deneysel modeller geliştirilmiş. Bazı araştırmacılar koledok ligasyonunun reversible olmasını sağlamak amacıyla özel aparatlar geliştirmişlerdir. Yu JL ve ark. "minioculder" diye adlandırılan aparat ile reversible koledok ligasyonu sağlamaya çalışmışlardır (10). Hirazawa ve ark. geliştirmiş olduğu deneysel modelde ise koledok ile duodenum arasına yerleştirilen tüp subkutan oluşturulan tünelden geçirilmekte ve bu tüpün ligasyonu ile reversible tıkanma ikteri tablosu oluşturulmaktadır(8).Reversible koledok ligasyon modelinde karşılaşılan bir diğer problem ise ratların reeksplorasyon esnasında ve sonrasında meydana gelen komplikasyonlar nedeniyle mortalite ve morbiditenin artmasıdır. Bu problemi aşmak amacıyla Gaoxiong Yi ve ark. çift silikon tüp arasında koledokun askıya alınarak ligasyonun sağlamışlardır. Bu silikon tüpleri de batın ön duvarına sütüre etmişlerdir; ligasyonu çözmek için reeksplere etmeksizin batındaki sütür kesilerek silikon tüpler serbest bırakılmıştır (11).

Cerrahi Sonrası Ratların Bakımı

Cerrahi işlem sona erdikten sonra 3-5 ml steril oda ısısında serum fizyolojik intraperitoneal uygulanabilir. Cerrahi sonrasında batın insizyonları karın kasları ayrı cilt ayrı olmak üzere 3/0 veya 4/0 polipropilen sütürlerle kapatılmalıdır. Anestezi etkisi ortadan kalkması beklenmeli ve sonrasında ratlar kafeslerine alınmalıdır. Ortam ısısının yeterli olması gereklidir. 6 saat sonrasında ratlar beslenmeye başlamalıdır. Cerrahi sonrasında meydana gelebilecek sıvı ve elektrolit dengesizliklerini önlemek için beslenmeye dikkat edilmelidir. Ratlarda günlük ortalama su ihtiyacı 35-50 ml'dir. Ticari laboratuvar yemleri ile beslendiklerinde ortalama ihtiyaç 15-25 gr/gündür. Yeterli ve dengeli bir beslenme sağlamaya dikkat edilmelidir. Ratlarda sarılık gelişimi açısından takip edilmelidir. İdrar renginde koyulaşma; mukozal yüzeylerde, ciltte sarılık gelişimi gibi belirtiler verir.

Kan ve Doku Örnekleri Alınması

Tıkanma iktinin ilk belirtilerinin oluşması yirmi dört saat içinde başlar. Laboratuvar bulgularının oluşması ise kırk sekiz saati bulabilir. İkter gelişiminin mutlaka biyokimyasal olarak da gösterilmesi gereklidir. Doku örneklerinin alınmasından önce kan örneği alınması gerekiyorsa kuyruk veni veya femoral arter tercih edilebilir. Gerekli durumlarda anestezi altında kan numunesi alınabilir. Sakrifikasyon işlemi öncesi doku örneği almak için median laparotomi yapılır. Kardiyak ponksiyon ile kan örneği alınır. Karaciğer ve diğer gerekli organlardan örnekler alınır. Alınan patolojik örnekler %10 formaldehit solüsyonu içine konularak en kısa zamanda histopatolojik inceleme için laboratuvara ulaştırılmalıdır.

Sonuç

Deneysel çalışma dizaynı yapılırken modelin uygulanabilir olması gereklidir. Geri dönüşümsüz tıkanma ikteri modelinde ana safra kanalının çift bağlanarak kesilmesi ile oluşturulan model sık olarak kullanılmaktadır. Güvenilir ve uygulanabilir bir modeldir. Geri dönüşümlü tıkanma ikteri modelinin cerrahi teknik olarak uygulanması daha zordur. Özellikle relaparotomi gereken modellerde ligasyonun çözülmesi esnasında mortalite ve morbidite oranı yüksektir. Bu nedenle relaparotomi ihtiyacı olmayan model arayışı ile farklı modeller denenmiştir. Bu modellerde kullanılan kanül

veya tüpler nedeniyle oluşan enfeksiyon, tüp tıkanması nedeniyle başarısızlıklar bildirilmiştir. Deneysel çalışmaya başlamadan önce bir denek üzerinde modelin uygulanabilirliği denenmelidir. Teknik zorlukların tespit edilmesi ve cerrahın deneyimi açısından oldukça faydalı olacaktır.

Kaynaklar

1. Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F, et al. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg.* 2008;95(5):646-56.
2. Parola M, Leonarduzzi G, Robino G, Albano E, Poli G, Dianzani MU. On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Radic Biol Med.* 1996;20(3):351-9.
3. Oruc MT, Ozmen MM, Han U. A new technique for inducing and releasing obstructive jaundice in rats. *Eur Surg Res.* 2009;43(4):354-9.
4. Pritchett-Corning KR, Mulder GB, Luo Y, White WJ. Principles of Rodent Surgery for the New Surgeon. *J Vis Exp* 2011;47: 2586
5. Kato S, Nagano I, Nimura Y, Wakabayashi T. Hepatic recovery after biliary drainage in experimental obstructive jaundice complicated by biliary infection. *Hepato-gastroenterology.* 1994;41(3):217-21.
6. Melzer E, Krepel Z, Ronen I, Bar-Meir S. Recovery of hepatic clearance and extraction following a release of common bile duct obstruction in the rat. *Research in experimental medicine.*1992;192(1):35-40.
7. Li W, Sydney Chung SC. An Improved Rat Model of Obstructive Jaundice and Its Reversal by Internal and External Drainage. *Journal of Surgical Research.* 2001;101(1):4-15.
8. Hirazawa K, Oka M, Ogura Y, Miyahara M, Hazama S, Suzuki T. New technique for inducing reversible obstructive jaundice in the rat. *Eur Surg Res.* 1997;29(3):195-201.
9. Rodriguez-Garay EA, Agüero RM, Pisani G, Trbojevič RA, Farroni A, Viglianco RA. Rat model of mild stenosis of the common bile duct. *Research in experimental medicine.* 1996;196(2):105-16.
10. Yu JL, Wang LQ, Andersson R, Persson BG, Bengmark S. New model of reversible obstructive jaundice in rats. *Acta chirurgica.* 1993;159(3):163-6.
11. Ker CG, Wu SC. A simple animal model for inducing and releasing surgical jaundice in rats. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi.* 1992;8(10):520-4.