Cerrahpaşa Med J 2021; 45(2): 116-123 ÖZGÜN ARAŞTIRMA / ORIGINAL ARTICLE

Deneysel Akut Pankreatit Modelinde Adalimumab'ın Doku Hasarını Önleyici Etkisi

Fevzi Fırat Yalnız[1,2], Tuğçe Eşkazan[3], Baki Ekçi[4], Nil Çomunoğlu[5,6], Jale Çoban[7], Cengiz Pata[8], Yusuf Erzin[3,8]

[1]Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul
[2]İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, İstanbul
[3]İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Bilim Dalı, İstanbul
[4]Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul
[5]Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul
[6]İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul
[7]Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul
[8]Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Bilim Dalı, İstanbul

Cite this article as: Fırat Yalnız F, Eşkazan T, Ekçi B, et al. Deneysel akut pankreatit modelinde adalimumab'ın doku hasarını Önleyici etkisi. *Cerrahpaşa Med J.* 2021;45(2):116-123.

Öz

Amaç: Tümör nekroze edici faktör alfa (TNF-α), akut pankreatit patogenezinde ve komplikasyonların gelişiminde anahtar role sahiptir. Çalışmanın amacı, ratlarda oluşturulmuş şiddetli akut nekrotizan pankreatit modelinde TNF-α inhibitörü olan Adalimumab'ın (ADA) etkinliğinin araştırılmasıdır.

Yöntem: 70 adet Wistar albino cinsi dişi rat Grup 1: SHAM laparotomi, Grup 2: Modifiye SHOP modeli ile şiddetli nekrotizan pankreatit (MS-SNP), Grup 3: MS-SNP ve intraperitoneal (İP) salin, Grup 4: ADA 2 mg/kg İP+MS-SNP, Grup 5: ADA 4 mg/kg İP+MS-SNP, Grup 6: ADA 4 mg/kg İP ve Grup 7: ADA 2 mg/kg İP olarak gruplandırıldı. MS-SNP; ortak safra ve pankreas kanalınının duodenuma girmeden önce bağlanması ve 50 µg/kg cerulein İP verilmesiyle oluşturuldu. Ratlar AP oluşturulmasını takiben 24. saatte sakrifiye edilerek; serum pankreatik amilaz ve pankreas dokusunda ödem, nekroz, inflamasyon, yağ nekrozu ve kanama parametreleri değerlendirildi.

Bulgular: Deneysel ADA etkinliğini araştırdığımız Grup 4 ve 5 ile Grup 2 kıyaslandığında pankreatik ödem, inflamasyon, nekroz, kanama, yağ nekrozu ve total patoloji skorları düşük tespit edilmiş, Grup 5'te tüm parametreler açısından anlamlı farklılık elde edilmiştir ($P < ,05$). Grup 4'te ise yalnızca pankreatik ödem, yağ nekrozu ve total patoloji skorlarındaki düşüklük anlamlı bulunmuştur. Pankreatik amilaz değerlerinde anlamlı düşüş saptanmamıştır. ADA'nın uygulanan dozlarda tek başına pankreatit yapmadığı da gösterilmiştir.

Sonuç: ADA uygulanan grupta pankreatik ödem, nekroz ve kanama gibi histopatolojik değişikliklerin oluşması engellenmiş ve histopatolojik skorlar ADA uygulanmayan gruplara göre anlamlı derecede düşük saptanmıştır. Gelecekte ADA'nın AP tedavisinde kullanımıyla ilgili ümit verici sonuçlar elde edilmekle birlikte bu amaca yönelik farklı modeller ve farklı ADA dozlarıyla benzer çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Akut pankreatit, Anti-TNF, Adalimumab,rat

Protective Effect of Adalimumab on Tissue Damage in Experimentally Induced Acute Pancreatitis

Abstract

Objective: Tumor necrosis factor alpha (TNF-α) has a central role in acute pancreatitis pathogenesis and its related systemic complications. The aim of this study is to evaluate the therapeutic effectiveness of TNF-α inhibitor adalimumab (ADA) in severe necrotizing pancreatitis (SNP) model in rats.

Methods: Seventy female Wistar albino rats were randomly divided into the following groups; group 1: SHAM laparotomy, group 2: SNP with modified SHOP model (MS-SNP), group 3: MS-SNP and saline intraperitoneally (IP), group 4: ADA 2 mg/kg IP+MS-SNP, group 5: ADA 4 mg/kg IP+MS-SNP, group 6: ADA 4 mg/kg IP and group 7: ADA 2 mg/kg IP. MS-SNP was induced by complete pancreatic duct obstruction and cerulein hyperstimulation (50 µm/kg IP). The subjects were sacrificed at the 24th hour, and then pancreatic amylase and edema, necrosis, inflammation, fat necrosis and bleeding parameters were evaluated.

Results: When Group 4 and 5 were compared to Group 2, all histopathological scores were decreased. In group 4, only pancreatic edema, fat necrosis and total pathology scores were significantly lower than those of Group 2, on the other hand, all these parameters were significantly lower for Group 5 ($P < .05$). Pancreatic amylase levels were comparable between groups.

Received: March 13, 2021 **Accepted:** June 14, 2021
Corresponding author: Tuğçe Eşkazan, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye
e-mail: drtugcecaliskan@gmail.com
DOI: 10.5152/cjm.2021.21012

Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

Conclusion: Histopathological changes such as pancreatic edema, necrosis and bleeding were prevented by the administration of ADA, and the total pathology scores were found to be significantly lower in rats receiving ADA than the ones without ADA. The potential therapeutic role of ADA in acute pancreatitis should be evaluated in future studies.

Keywords: Acute pancreatitis, anti-TNF, adalimumab, rats

Giriş

Akut pankreatit (AP); pankreas dokusunda inaktif olarak bulunan enzimlerin, çeşitli nedenlerle aktif hale geçerek, pankreas dokusunu sindirmesi sonucu gelişen yaygın bir inflamasyonla karakterize tablodur. AP'deki inflamatuvar süreç tripsinojenin pankreas içinde aktive olmasıyla başlar. Oluşan tripsin, kompleman sistemini ve kallikrein-kinin kaskadıyla birlikte koagülasyon ve fibrinolizisi aktive eder. Bu sürecin tetiklenmesinde birçok aracı rol oynar.

İnflamasyonun tanımlanmış en önemli mediatörlerinden biri olan tümör nekroze edici faktör- alfa (TNF-α), hem AP hem de AP'ye bağlı komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynamaktadır. İnflamasyonun erken dönemlerinde TNF salınımı ile nötrofiller aktive olur ve lipid peroksidasyonu, hücresel şişme ve sonuçta hücre ölümüne neden olan reaktif oksijen radikalleri salınır.[1,2]

AP'nin görülme sıklığı 13-45/100 000/yıldır ve her iki cinsiyette eşit sıklıktadır.[3,4] Klinik seyir ve prognoz oldukça değişkendir. Olguların %85-90'ında hafif ve kendini sınırlayan ödematöz pankreatit kliniği, %10-15'inde ise metabolik bozukluklar, sepsis, çoklu organ yetmezliği ve ölümle sonuçlanabilen nekrotizan pankreatit görülmektedir.[3]

AP'de tedavinin temelini, hidrasyon ve analjezinin sağlanması oluşturur. Şiddetli AP gelişimini önlemek için destek tedavinin yanında pankreatik proteaz inhibitörlerinin kullanıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur. 5 çalışmanın metaanalizinde,[5] *gabexate mesylate*'ın 90 günlük mortalite üzerine etkili olmadığı ancak komplikasyonları azalttığı tespit edilmiştir. Somatostatin ve onun sentetik analoğu olan oktreotid üzerinde yapılan çalışmalarda bu moleküller AP tedavisinde etkili bulunmamıştır.[6] Son yıllarda, otoimmun hastalıklarda yaygın kullanım alanı bulan TNF-α inbitörü infliksimab (IFX), kısıtlı sayıda, farklı deneysel AP modelinde kullanılmış ve tedavi açısından ümit veren sonuçlar elde edilmiştir.

Adalimumab (ADA), romatoid artrit, psoriazis ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi çok sayıda inflamatuvar hastalığının tedavisi için onaylanmış TNF-α inhibitörlerinden biridir. TNF-α'nın çözünür ve transmembran formlarına yüksek afinite ile bağlanıp, reseptörlerine bağlanmasını engelleyerek etki gösteren bir humanize immünoglobulin G1 (IgG1) monoklonal antikordur.[7,8]

Çalışmamızda ADA'nın, ratlarda oluşturulmuş AP modelinde histopatolojik ve biyokimyasal parametreler üzerindeki etkinliğini araştırmayı hedefledik.

Etik kurul

Mevcut çalışmada hayvan hakları korunmuş ve çalışma Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu Komitesinin onayı ile yürütülmüştür (Tarih:09.07.2010, Karar no:121).

Gereç ve Yöntem

Bu bir randomize kontrollü çalışmadır. Çalışmamızda Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan alınan, ortalama 250 gr (220-300 gr) ağırlığında, 6-8 haftalık toplam 70 adet Wistar albino dişi rat kullanılmıştır. Ratlar deney süresince polipropilen kafeslerde tutulmuş, 22-24°C sıcaklık ve 12 saat ışık - 12 saat karanlık siklusuna uygun standart koşullar sağlanmıştır. Postoperatif 24 saat (sakrifikasyona kadar) su dışında besin verilmemiş, öncesinde standart rejimle (protein %24, lysine %1, metionin %0,6, sistein %0,4, selüloz %7, NaCl %1, kalsiyum %1-2 ve enerji 2650 kcal/kg) beslenmişlerdir. Ratlara intramusküler xylazin (Rompunc) 10 mg/kg ve ketamin F100 mg/kg verilerek anestezi uygulanmış ve sakrifikasyon dekapitasyonla sağlanmıştır.

AP'nin kompleks mekanizmalarını ortaya koymak için, invaziv ve non-invaziv çok sayıda deneysel pankreatit modeli tanımlanmıştır. Çalışmamızda AP oluşturma amaçlı Murayama ve ark.[9] tarifledikleri SHOP modeli modifiye edilerek kullanılmıştır. SHOP modeli esas olarak pankreatik fibrozis ve asiner atrofiyi taklit eden bir modeldir. Bu model, metalik cerrahi klipsler kullanılarak ortak safra ve pankreas kanalını duodenuma girmeden hemen önce bağlanmasını takiben intraperitoneal (İP) 4 gün üst üste cerulein verilmesi esasına dayanır. Murayama'nın çalışmasında 24, 48, 72 ve 96. saatlerde hayvanlar sakrifiye edilmiş; serumda amilaz, dokuda kollajen değerleri ile histopatolojik değerlendirme yapılmıştır. Değerlendirmede 24. saatteki sakrifikasyonda amilaz değerlerinde belirgin yükseklik saptanmış, 96. saatte ise amilaz değerleri normale dönmüş ancak kollajen değerleri belirgin olarak artmış bulunmuştur. Bu sonuçlar ışığında, SHOP modelinin erken dönemde akut inflamasyonu, geç dönemde ise fibrozisin hakim olduğu kronik süreci oluşturduğu görülmektedir. Amacımız AP'de ADA'nın histopatolojik ve biyokimyasal parametreler üzerinden etkinliğini değerlendirmek olduğundan, çalışmamızda modifiye SHOP (MS) modeli uygulanmıştır. Anestezi ve orta hat insizyonunun ardından 50 mikrogram/kg cerulein

(SIGMA, IL, USA) İP yolla verilmiş, ortak safra ve pankreas kanalı duodenuma girmeden hemen önce ipek sütür yardımı ile bağlanmıştır. İlaç verilmesinin ardından 24. saatte ise, hayvanlar dekapitasyonla sakrifiye edilmiştir.

ADA'nın farmakokinetik etkilerinin test edildiği rat modellerinde, İP uygulaması sonrası TNF-alfa'yı inhibe edecek serum konsantrasyonlarına en erken 24. saatte ulaştığı tespit edilmiştir.[10] Buna ilaveten, romatoid artritli hastalarda kullanımının sonrası tedavi etkinliğinin 24. saatten önce başlamadığı raporlanmıştır.[11] Rat modellerinde kullanılan intraperitoneal dozlar 2-5 mg/kg aralığında değişmektedir.[12,13] Bu verilerden hareket ile çalışmamızda, ADA salin solusyonu ile çözünmüş, 2 mg/kg (5 µL) ve 4 mg/kg (10 µL) dozlarında İP olarak, modifiye SHOP modeli ile AP oluşturulmadan 24 saat önce ratlara uygulanmıştır.

Çalışmada kullanılan ADA Abbott Türkiye tarafından temin edilmiştir.

Çalışma gruplarının oluşturulması

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz SHAM laparatomisi grubunda (Grup 1), orta hat abdominal insizyon yapılmış, ek prosedür uygulanmadan insizyon hattı sütüre edilmiştir. Ratlar insizyon sonrası 24. saatte sakrifiye edilmiştir. Bu grup, çalışmamızın kontrol grubunu oluşturmuştur. Grup 2'de (MS-SNP) Murayama tarafından tariflenmiş SHOP yöntemi[7] ile AP oluşturulmuş, SHOP işleminden 24 saat sonra sakrifikasyon gerçekleştirilmiştir. Bu grupta şiddetli nekrotizan pankreatit (SNP) oluşturulması amaçlanmıştır. Grup 3'te, pankreatit oluşturulmadan 24 saat önce İP yolla serum fizyolojik (SF) uygulanmıştır (MS-SNP+SF).

Tedavi gruplarında (Grup 4 ve 5), ADA 2 mg/kg ve 4 mg/kg İP uygulamasının AP tedavisindeki etkinliği araştırılmıştır. MS-SNP prosedüründen 24 saat önce Grup 4'teki hayvanlara 2 mg/kg ADA (MS-SNP+ADA 2 mg/kg), Grup 5'tekilere ise 4 mg/kg ADA (MS-SNP+ADA 4 mg/kg), İP olarak verilmiştir. ADA verilmesinden 48 saat sonra ise sakrifikasyon yapılmıştır.

Grup 6 ve 7'de tedavi edici ajan ADA'nın çalışmamızda kullanılan 4 mg/kg ve 2 mg/kg dozlarında tek başına AP yapabilme olasılığı araştırılmıştır. ADA'nın belirtilen dozlarda İP yolla uygulanmasının 48. saatinde hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Çalışma gruplarına Tablo 1'de yer verilmiştir.

Mikroskopik skorlama ve histoloji

Sakrifikasyon sonrası pankreas tamamen çıkartılmıştır. Histolojik inceleme amaçlı pankreas dokusu %10 formaldehitte 48 saat fiksasyon ve dereceli etil alkol serilerinden geçirilerek xylol ile şeffaflandırılmış ve parafine gömülmüştür. Parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyanmış ve doku kesitleri ışık mikroskobunda incelenmiştir. Pankreatiti değerlendirmek için pankreas dokusunda ödem, inflamasyon, nekroz, kanama ve ekstrapankreatik yağ nekrozu parametrelerine bakılmıştır. Histopatolojik incelemede Spormann ve ark.[14] tariflenen kriterler kullanılmıştır. Sonuçlar hayvanların ait oldukları grupları bilmeyen iki farklı patolog tarafından bağımsız değerlendirilmiş, fikir birliği sağlanamayan olgular daha sonra birlikte incelemeye alınmıştır.

Biyokimyasal inceleme

Sakrifikasyon sonrası alınan mikst arteriovenöz kan örneklerinde pankreatik amilaz aktivitesi Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında enzimatik kolorimetrik metodla Cobas Integra EPS pankreatik amilaz kiti (Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Germany) kullanılarak çalışılmıştır. Kan örnekleri 2500 rpm hızında 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Serum pankreatik amilaz (P. amilaz) aktivitesi ölçülmüş ve sonuçlar U/L biriminden belirtilmiştir.

Tablo 1. Çalışma gruplarının oluşturulması

Grup No	*n*	0. Saat	24. Saat	48. Saat
1	10	İşlem yapılmadı	SHAM	Sakrifikasyon
2	10	İşlem yapılmadı	MS-SNP	Sakrifikasyon
3	10	Serum fizyolojik İP	MS-SNP	Sakrifikasyon
4	10	ADA 2 mg/kg İP	MS-SNP	Sakrifikasyon
5	10	ADA 4 mg/kg İP	MS-SNP	Sakrifikasyon
6	10	ADA 4 mg/kg İP	SHAM	Sakrifikasyon
7	10	ADA 2 mg/kg İP	SHAM	Sakrifikasyon

Kısaltmalar. SHAM, SHAM Laparotomi; MS-SNP, Modifiye SHOP modeli ile şiddetli nekrotizan pankreatit; ADA, Adalimumab; İP, İntraperitoneal.

İstatiksel analiz

İstatistiksel analizler Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) yazılımı (versiyon 17.0) kullanılarak yapıldı. Sürekli değişkenler ortalama ± standart sapma (SD) olarak ifade edildi. Biyokimyasal ve histopatolojik bulguları değerlendirmek ve gruplar arası farklılığı belirlemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. İkili grup karşılaştırmaları için post-hoc analiz Tukey testi ile yapıldı. Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirildi, $P < ,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Preoperatuar ya da peroperatuar mortalite gözlenmemiştir. Postoperatuar dönemde sadece Grup 2 ve 3'te 3'er, Grup 4 ve 5'te ise 2'şer rat ölmüştür. Gruplar arası mortalite oranları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Sadece insizyon yapılan kontrol grubu (Grup 1) ile ilaç ya da serum fizyolojik uygulanmayan pankreatit modeli grubumuz (Grup 2) arasında tüm patolojik ve biyokimyasal parametrelerde anlamlı farklılık saptanmıştır (Grup 1 ve 2 sırası ile: P.amilaz: 1838,2 ± 233,6 ve 13160 ± 3208,9 U/L; ödem: 0 ve 2,66 ± 0,5; inflamasyon: 0 ve 2,17 ± 0,4; nekroz: 0 ve 3,67 ± 1; kanama: 0 ve 4,67 ± 0,8; yağ nekrozu: 0 ve 5,33 ± 0,8; total patoloji skoru: 0 ve 18,5 ± 1,2; tümü için $P < ,05$) (Tablo 2, Şekil 1).

Grup 1 ile Grup 6 ve 7 karşılaştırıldığında gerek P. amilaz gerekse de histopatolojik belirteçler arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (Tablo 2, Şekil 1).

Deneysel ADA etkinliğini araştırdığımız Grup 4 ve 5, Grup 2 ile kıyaslandığında pankreatik ödem, inflamasyon, nekroz, kanama, yağ nekrozu ve total patoloji skorları düşük tespit edilmiş olup Grup 5'teki düşüklük tüm parametreler açısından anlamlı bulunmuştur ($P < ,05$). Grup 4'te ise yalnızca pankreatik ödem, yağ nekrozu ve total patoloji skorlarındaki düşüklük istatiksel olarak anlamlı olup, inflamasyon, nekroz ve kanama parametrelerinde Grup 2 ve 4 arasında saptanan fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır (Tablo 2). İncelenen pankreas dokusunda tespit edilen histopatolojik bulgular Şekil 2a-d'de gösterilmiştir.

Grup 2 ile karşılaştırıldığında P. amilaz değerleri, Grup 5'te düşük tespit edilmiş ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 2).

Grup 5'te Grup 4'e kıyasla P. amilaz, inflamasyon, nekroz, kanama, yağ nekrozu ve total patoloji skorları düşük saptanmış olup, bu farklılık yalnızca kanama parametresi için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 2).

Tartışma

Çalışmamızın amacı ratlarda oluşturulmuş AP modelinde bir TNF-α inhibitörü olan ADA'nın etkinliğini araştırmaktır. Deneysel etkinliğini araştırdığımız ADA'nın 2 mg/kg ve 4 mg/kg dozlarında uygulandığı AP gruplarında pankreas dokusunda ödem, inflamasyon, nekroz, kanama, yağ nekrozu ve total patoloji skorları ADA uygulanmayan gruba göre düşük saptanmıştır. AP'de gelişebilecek histopatolojik hasarın önlenebilmesi için ADA'nın özellikle 4 mg/kg dozunda uygulanması istatistiksel olarak anlamlı derecede etkili bulunmuştur. ADA'nın 2 mg/kg dozunda uygulanması ile, yalnızca pankreas ödemi ve total patoloji skorlarında saptanan düşüklükler anlamlı bulunmuştur. Araştırmamızda, yalnızca 4 mg/kg ADA tedavisi uygulanan grupta P. amilaz değerlerinde düşüklük saptanmış, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

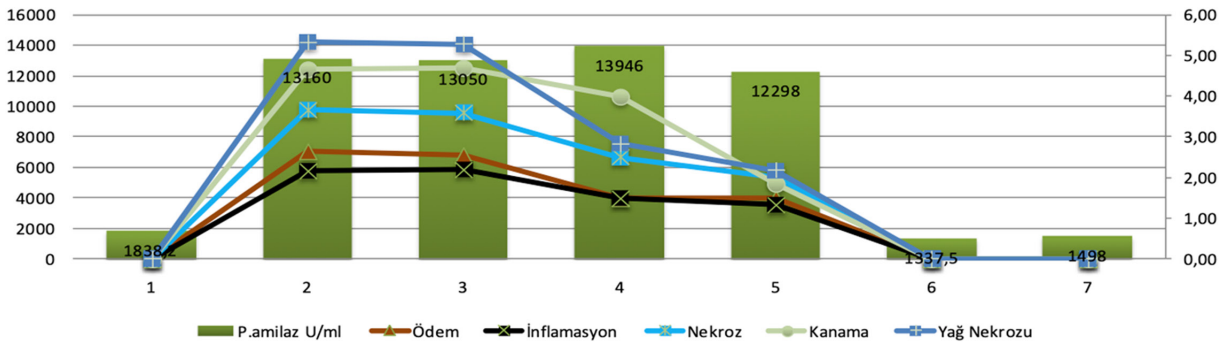
İnsanlarda TNF blokörlerinin AP yaptığına dair olgu bildirimleri mevcut olduğundan[15,16] çalışmamıza fazladan iki grup eklenmiş ve kullanılan 2 mg/kg ve 4 mg/kg dozlarında ADA'nın tek başına pankreatit indüksiyonuna katkıda bulunmadığı da gösterilmiştir.

AP, sahip olduğu yüksek morbidite ve mortalite potansiyeli nedeni ile günümüzde önemli bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir. Tanımlanmasının üzerinden bir asırdan fazla süre geçmiş ve tedavisine ilişkin birçok deneysel ve klinik araştırma yapılmış olmasına karşın patofizyolojisi tam olarak anlaşılmadığından, spesifik bir tedavisi mevcut değildir. AP patogenezinde yerleşik bir role sahip olan inflamatuvar mediyatörlerin etkilerini bloke ederek doğal seyri değiştirebilecek ilaçların arayışı sürmektedir. Deneysel çalışmalar, TNF'yi bloke ederek inflamasyonun en aza indirilebileceğini ve pankreas hasarının sınırlandırılabileceğini göstermiştir. Ancak tedavide TNF antikorlarının kullanıldığı bir klinik çalışma mevcut değildir. Monoklonal TNF-α antikoru olan IFX, akut ödematöz ve şiddetli nekrotizan pankreatitte hayvan modellerinde denenmiş, biyokimyasal ve histopatolojik bulgularda istatistiksel olarak anlamlı düzelme saptanmıştır.[17] Hayvan çalışmalarında, monoklonal veya poliklonal anti-TNF-α antikorları ile tedavinin AP indüksiyonundan 1-3 saat sonra serum TNF-α aktivitesindeki artışı önlediği, pankreas dokusunda nötrofil infiltrasyonunu ve myeloperoksidaz aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. Sonuçta TNF-α antikorları, serum amilaz aktivitesini ve pankreas dokusundaki histopatolojik değişiklikleri önleyerek, pankreatitin şiddetini azaltmış ve genel sağkalımı arttırmıştır.[18,19] Benzer şekilde Hughes ve arkadaşları, anti-TNF antikorunun ratlarda AP ile ilişkili komplikasyonları iyileştirdiğini göstermiş,[20] Grewal ve ark.[18] ise TNF-α'nın poliklonal blokajını kullanarak

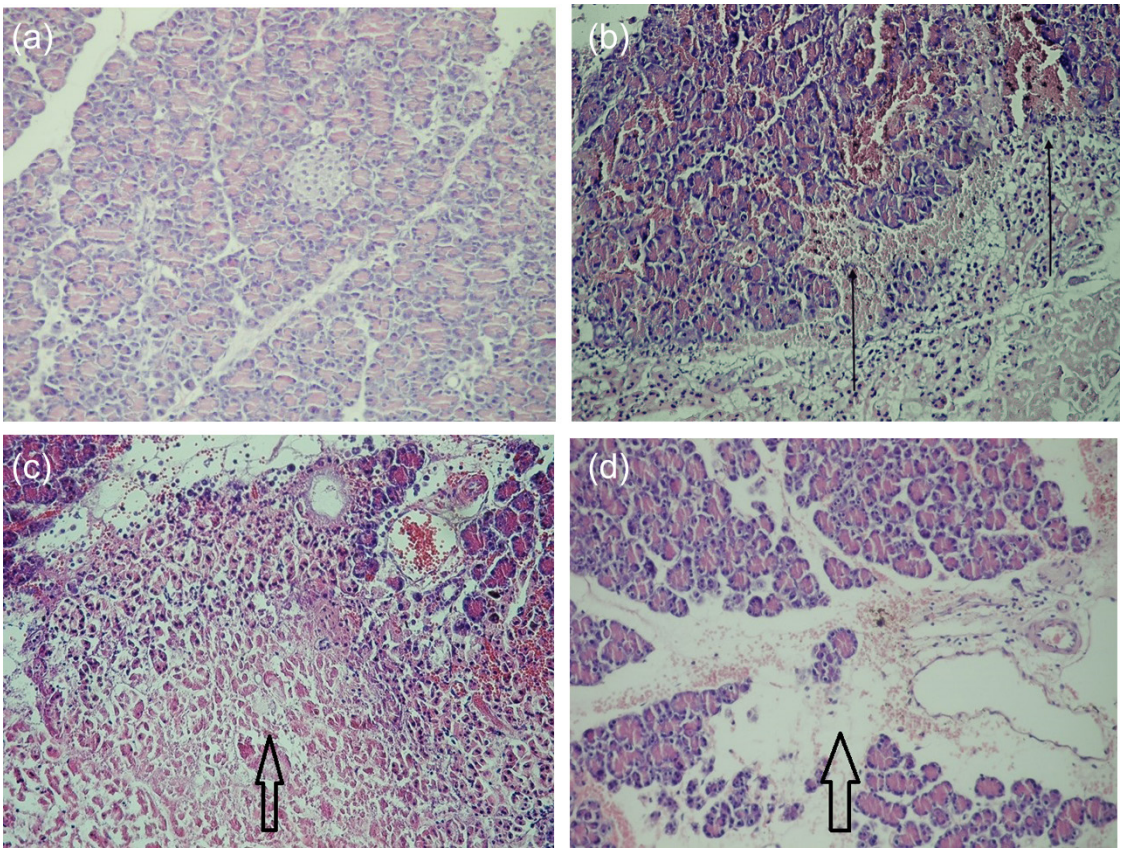
Tablo 2. Grupların biyokimyasal ve histopatolojik analizi

Parametreler	Grup 1 Kontrol ($n=10$)	Grup 2 MS-SNP ($n=7$)	Grup 3 MS-SNP + SF ($n=7$)	Grup 4 ADA 2 mg/kg + MS-SNP ($n=8$)	Grup 5 ADA 4 mg/kg + MS-SNP ($n=8$)	Grup 6 ADA 4 mg/kg ($n=10$)	Grup 7 ADA 2 mg/kg ($n=10$)	*p*
P.Amilaz (U/mL)	1838,2 ± 233,6	13160 ± 3208,9	13050 ± 3112,3	13946 ± 1393,1	12298 ± 2133,8	1337,5 ± 204,3	1498 ± 82,2	<,01[a] , <,01[b] <,01[c] , <,01[d], <,01[g] , <,01[h], <,01[k] , <,01[l], <,01[n] , <,01[p], <,01[r] , <,01[s]
Ödem	0	2,66 ± 0,5	2,54 ± 0,5	1,5 ± 0,5	1,5 ± 0,5	0	0	<,01[a], <,01[b] <,01[c], <,01[d] , <,01[e], <,01[f], <,01[g] , <,01[h] <,01[i] , <,01[j], <,01[k] , <,01[l], <,01[n] ,<,01[p] <,01[r] , <,01[s]
İnflamasyon	0	2,17 ± 0,4	2,21 ± 0,4	1,5 ± 0,5	1,33 ± 0,5	0	0	<,01[a], <,01[b] <,01[c],<,01[d], <,01[f], <,01[g] , <,01[h], <,01[j], <,01[k] , <,01[l] <,01[n] , <,01[p] <,01[r] , <,01[s]
Nekroz	0	3,67 ± 1	3,59 ± 1	2,5 ± 0,8	2 ± 1,5	0	0	<,01[a], <,01[b] <,01[c], <,01[d], <,02[f], <,01[g] , <,01[h], <,02[j], <,01[k] , <,01[l] <,01[n] , <,01[p] <,001[r] ,<,001[s]
Kanama	0	4,67 ± 0,8	4,71 ± 0,8	4 ± 1,7	1,83 ± 2,1	0	0	<,01[a] , <,01[b] <,01[c], <,01[f], <,01[g] , <,01[h], <,01[j], <,01[k] , <,01[l], <,02[m], <,01[n] , <,01[p]
Yağ nekrozu	0	5,33 ± 0,8	5,28 ± 0,9	2,83 ± 1,6	2,17 ± 1,3	0	0	<,01[a], <,01[b], <,01[c], <,001[d], <,01[e] , <,01[f], <,01[g] , <,01[h], <,01[i] , <,01[j], <,01[k] , <,01[l], <,01[n] , <,01[p] <,001[r] ,<,001[s]
Histopatolojik Toplam skor	0	18,5 ± 1,2	18,4 ± 1,3	12,33 ± 3,7	8,83 ± 5,5	0	0	<,01[a], <,01[b], <,01[c], <,01[d], <,01[e] , <,01[f], <,01[g] , <,01[h], <,01[i] , <,01[j], <,01[k] , <,01[l], <,02[m], <,01[n] , <,01[p], <,01[r] , <,01[s]

*Tabloda yalnızca anlamlı çıkan *p* değerlerine yer verilmiştir.
[a]Grup 1-2, [b]Grup 1-3, [c]Grup 1-4, [d]Grup 1-5, [e]Grup 2-4, [f]Grup 2-5, [g]Grup 2-6, [h]Grup 2-7, [i]Grup 3-4, [j]Grup 3-5, [k]Grup 3-6, [l]Grup 3-7, [m]Grup 4-5, [n]Grup 4-6, [p]Grup 4-7, [r]Grup 5-6, [s]Grup 5-7
MS-SNP, Modifiye SHOP modeli ile şiddetli nekrotizan pankreatit; SF, Serum fizyolojik; ADA, Adalimumab; P.amilaz, Pankreatik amilaz.



Şekil 1. Gruplara göre değişkenlerin grafiği



Şekil 2. A-D. (a) Normal pankreas dokusu (kontrol grubu) (H&Ex200), (b) Pankreas dokusunda nekroz (Okla işaretli alanlar) (H&Ex200), (c) Pankreas dokusunda nekroz ve inflamasyon (Okla işaretli alanlar) (H&Ex200), (d) Pankreas dokusunda ödem (Okla işaretli alanlar) (H&Ex200)

biyokimyasal parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı iyileşme olduğunu göstermiştir.

Deneysel AP modelinde ADA'nın tedavideki olası etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada ADA İP yolla 50 mg/kg dozunda uygulanmış, pankreatit ise biliopankreatik kanala %3'lük sodyum taurokolate'ın retrograd enjeksiyonu ile oluşturulmuştur.[21] Mortalite bildirilmeyen çalışmada, ADA kullanılmasıyla biyokimyasal ve patolojik verilerde istatistiksel olarak anlamlı düzelme saptanmıştır.

Çalışmamızda kimyasal ajan (İP cerulein) ve cerrahi ligasyon kombinasyonu ile (SHOP) ağır bir pankreatit formu oluşturulmuştur. Öyle ki oluşturulan pankreatit modeli ile hastalık gruplarında %30, tedavi gruplarında ise %20 mortalite gözlenmiştir. Mortalite oranları AP modelimizin ağırlığına işaret ederken, sadece insizyon yapılan SHAM kontrol grubu ile tedavisiz kalan pankreatit grubumuz arasında tüm patolojik ve biyokimyasal parametrelerde görülen anlamlı farklılık modelimizin iyi işlediğini göstermektedir.

Kullanmış olduğumuz SHOP modeli ile yapılan önceki çalışmalarda 24. saatte P. amilaz değerleri tepe noktadayken, 72. ve 96. saatte yapılan sakrifikasyonlarda pankreas dokusu incelendiğinde yaygın fibrozis ve kollojen doku birikimi tespit edilmiş ancak P. amilaz değerleri normale dönmüştür. Bu veriler ışığında; çalışmamızda oluşturulmak istenen şiddetli nekrotizan pankreatit gereği, pankreatik fibrozis ve kollojen dokunun gelişimini önlemek için ratlar 24. saatte sakrifiye edilmiştir.

Pankreasın ekzokrin sekresyonunun bozulması AP'nin önemli bir özelliğidir. AP'de 6-12 saatte amilaz değeri hastaların %85'inde yükselmekte ve yükseklik 3-5 gün sürmektedir. Benzer şekilde deneysel pankreatit modellerinde de amilaz salınımında belirgin artış olduğu ve bu artışın hasarlı hücrelerden enzim salgılanmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.[22-25] Bizim çalışmamızda da benzer şekilde AP oluştuktan sonraki 24 saat içinde P.amilaz seviyelerinde belirgin artış görülmüştür. Ancak günler içinde normale dönen amilaz değerleri ile kıyaslandığında, histopatolojik düzelmenin daha erken dönemlerde, saatler içinde, gerçekleştiği deneysel çalışmalarla gösterilmiştir.[26] Çalışmamızda izlem süresinin 24 saat ile sınırlı kalması P. amilaz değerlerinde hedeflenen düşmenin gözlemlenememesine yol açmış olabilir. Bu düşüşün Yılmaz ve ark.[21] çalışmasına kıyasla bizim çalışmamızda oluşmamasının bir diğer nedeni uygulanan ADA dozları olabilir. Bu çalışmada bizim çalışmamıza kıyasla hafif bir pankreatit kliniği oluşturulmuş ve ADA 50 mg/kg olarak uygulanmıştır. Bizim çalışmamızda ise ADA literatürdeki hayvan çalışmaları göz önünde bulundurularak 2 ve 4 mg/kg dozlarında kullanılmıştır.[12,13] ADA'nın özellikle 4 mg/kg uygulaması ile ödem, nekroz, inflamasyon, yağ nekrozu, kanama ve total patoloji skorları anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Ancak muhtemelen hem uyguladığımız pankreatit modelinin ağırlığı hem de izlem süresinin kısıtlı olması nedeniyle benzer etki serum P. amilaz düzeyinde gözlemlenmemiştir.

Bir başka deneysel çalışmada, metotreksat ile oluşturulmuş AP modelinde ADA uygulaması sonrası asiner hücrelerde inflamasyon, ödem ve nekrozda azalma ile birlikte Langerhans adacıklarında insülin ve somatostatin pozitif hücrelerde bir artış da gösterilmiştir.[27]

Yakın tarihte yapılmış bir başka çalışmada; sertolizumabın Na-taurokolat ile indüklenen AP tedavisindeki etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmada, AP'de pankreas dokusunda TNF-α'nın belirgin şekilde arttığı ve anti-TNF-α tedavisinin hem patolojik hem de biyokimyasal parametrelerde belirgin iyileşme sağladığını gösterilmiştir.[28]

Literatürdeki diğer çalışmalara bakıldığında; nekrotizan pankreatitte ADA tedavisinin histolojik lezyon skorlarını, biyokimyasal parametreleri ve doku hasarını iyileştirdiği, etanerceptin pankreas fibrozunda azalma sağladığı ve sertolizumabın AP'de biyokimyasal ve histolojik iyileşme sağladığı gösterilmiştir.[17,21,28] Bizim çalışmamızda da benzer şekilde, AP'de ADA'nın özellikle 4 mg/kg uygulaması ile pankreatik ödem, nekroz, inflamasyon, yağ nekrozu, kanama ve total patoloji skorlarında beklenen yükseklik önlenmiştir.

Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları mevcuttur. ADA tümü ile humanize bir antikor olmasına rağmen, kullanıldığı endikasyona bağlı olarak ADA ile tedavi edilen hastaların %5-54'ünde ADA'ya karşı antikor gelişimi saptanmıştır.[29] Bu antikorlar yalnızca ADA'nın etkisini sınırlamakla kalmayıp gelişen yan etkilerden de sorumludur. Çalışmamızda ADA'ya karşı antikor mevcudiyeti araştırılmaması bir kısıtlılıktır.

Sonuç olarak, deneysel AP modelinde ADA uygulanması pankreası histopatolojik değişikliklerden, morfolojik ve fonksiyonel hasardan korumuştur. Tüm bu veriler ışığında; anti-TNF'lerin gelecekte AP tedavisinde kullanımıyla ilgili ümit verici sonuçlar elde edilmiş olmakla birlikte bu amaca yönelik benzer çalışmalar yapılmalı, farklı modeller ve farklı anti-TNF dozlarıyla sonuçlar doğrulanmalıdır.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Yeditepe Üniversitesi'nden (Tarih: 9 Temmuz 2010, Karar No: 121) alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir – F.F.Y., Y.E.; Tasarım – F.F.Y., Y.E.; Denetleme – C.P., Y.E.; Kaynaklar – B.E., N.Ç., J.Ç.; Malzemeler – B.E., N.Ç., J.Ç.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – F.F.Y.; Analiz ve/veya Yorum – F.F.Y., Y.E.; Literatür Taraması – F.F.Y., T.E.; Yazıyı Yazan – F.F.Y., T.E., Y.E.; Eleştirel İnceleme – C.P., Y.E.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Yeditepe University (Date: July 9, 2010, Decision No: 121).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept – F.F.Y., Y.E.; Design – F.F.Y., Y.E.; Supervision – C.P., Y.E.; Resources – B.E., N.Ç., J.Ç.; Materials – B.E., N.Ç., J.Ç.; Data Collection and/or Processing – F.F.Y.; Analysis and/or Interpretation – F.F.Y., Y.E.; Literature Search – F.F.Y., T.E.; Writing Manuscript – F.F.Y., T.E., Y.E.; Critical Review – C.P., Y.E.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

References

1. Zhang XP, Lin Q, Zhou YF. Progress of study on the relationship between mediators of inflammation and apoptosis in acute pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 2007;52:1199-1205. [CrossRef]
2. Tsujimoto M, Yokota S, Vilcek J, Weissmann G. Tumor necrosis factor provokes superoxide anion generation from neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986;137:1094-1100. [CrossRef]
3. Yadav D, Whitcomb DC. The role of alcohol and smoking in pancreatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7:131-145. [CrossRef]
4. Hamada S, Masamune A, Kikuta K, et al. Nationwide epidemiological survey of autoimmune pancreatitis in Japan. *Pancreas*. 2014;43:1244-1248. [CrossRef]
5. Messori A, Rampazzo R, Scroccaro G, et al. Effectiveness of gabexate mesilate in acute pancreatitis. A metaanalysis. *Dig Dis Sci*. 1995;40(4):734-738. [CrossRef]
6. Cavallini G, Frulloni L. Somatostatin and octreotide in acute pancreatitis: the never-ending story. *Dig Liver Dis*. 2001;33:192-201. [CrossRef]
7. Shen C, Assche GV, Colpaert S, et al. Adalimumab induces apoptosis of human monocytes: a comparative study with infliximab and etanercept. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;21:251-258. [CrossRef]
8. Wong M, Ziring D, Korin Y, et al. TNF-alpha blockade in human diseases: mechanisms and future directions. *Clin Immunol*. 2008;126:121-136. [CrossRef]
9. Murayama KM, Barent BL, Gruber M, et al. Characterization of a novel model of pancreatic fibrosis and acinar atrophy. *J Gastrointest Surg*. 1999;3:418-425. [CrossRef]
10. Kempeni J. Preliminary results of early clinical trials with the fully human anti-TNFalpha monoclonal antibody D2E7. *Ann Rheum Dis*. 1999;58:I70-I72. [CrossRef]
11. den Broeder A, van de Putte L, Rau R, et al. A single dose, placebo controlled study of the fully human anti-tumor necrosis factor-alpha antibody adalimumab (D2E7) in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2002;29:2288-2298.
12. Martínez-Fernández de la Cámara C, Hernández-Pinto AM, Olivares-González L, et al. Adalimumab reduces photoreceptor cell death in a mouse model of retinal degeneration. *Sci Rep*. 2015;5:11764. [CrossRef]
13. Akgun Y, Bakirdogen S, Kadioglu Kocak MG, et al. Efficacy of adalimumab therapy in experimental rat sclerosing encapsulated peritonitis model. *Croat Med J*. 2019;60:431-438. [CrossRef]
14. Spormann H, Sokolowski A, Letko G. Effect of temporary ischemia upon development and histological patterns of acute pancreatitis in the rat. *Pathol Res Pract*. 1989;184:507-513. [CrossRef]
15. Werlang ME, Lewis MD, Bartel MJ. Tumor necrosis factor alpha inhibitor-induced acute pancreatitis. *ACG Case Rep J*. 2017;4:e103. [CrossRef]
16. Gunawan F, Fayyaz B, Mihardja TO. Etanercept - A culprit agent in acute pancreatitis? *J Commun Hosp Intern Med Perspect*. 2019;9:147-149. [CrossRef]
17. Oruc N, Ozutemiz AO, Yukselen V, et al. Infliximab: a new therapeutic agent in acute pancreatitis? *Pancreas*. 2004;28:e1-e8. [CrossRef]
18. Grewal HP, Mohey el Din A, Gaber L, Kotb M, Gaber AO. Amelioration of the physiologic and biochemical changes of acute pancreatitis using an anti-TNF-alpha polyclonal antibody. *Am J Surg*. 1994;167:214-8. [CrossRef]
19. Tekin SO, Teksoz S, Terzioglu D, et al. Use of infliximab in treatment of acute pancreatitis. *Bratisl Lek Listy*. 2015;116:167-172. [CrossRef]
20. Hughes CB, Grewal HP, Gaber LW, et al. Anti-TNF therapy improves survival and ameliorates the pathophysiologic sequelae in acute pancreatitis in the rat. *Am J Surg*. 1996;171:274-280. [CrossRef]
21. Yilmaz M, Tekekoglu S, Herek O, et al. Ameliorative effect of adalimumab on experimentally induced acute pancreatitis in rats. *Pancreas*. 2010;39:1238-1242. [CrossRef]
22. Niederau C, Niederau M, Lüthen R, et al. Pancreatic exocrine secretion in acute experimental pancreatitis. *Gastroenterology*. 1990;99:1120-1127. [CrossRef]
23. Bragado MJ, San Román JI, González A, et al. Impairment of intracellular calcium homoeostasis in the exocrine pancreas after caerulein-induced acute pancreatitis in the rat. *Clin Sci (Lond)*. 1996;91:365-369. [CrossRef]
24. García M, Barbáchano EH, Lorenzo PH, et al. Saline infusion through the pancreatic duct leads to changes in calcium homeostasis similar to those observed in acute pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 2009;54:300-308. [CrossRef]
25. Yilmaz M, Topsakal S, Herek O, et al. Effects of etanercept on sodium taurocholate-induced acute pancreatitis in rats. *Transl Res*. 2009;154:241-249. [CrossRef]
26. Berthet B, Guillou N, Brioche MI, et al. Influence of somatostatin on acute pancreatitis in rats. *Eur J Surg*. 1998;164:785-790. [CrossRef]
27. Mercantepe T, Kalkan Y, Tumkaya L, et al. Protective effects of tumor necrosis factor alpha inhibitors on methotrexate-induced pancreatic toxicity. *Adv Clin Exp Med*. 2018;27:715-720. [CrossRef]
28. Kosekli MA, Herek Ö, Ozmen Ö, Sahinduran S. Ameliorative effect of certolizumab on experimentally induced acute necrotic pancreatitis in rats. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2019;65:204-210. [CrossRef]
29. Bartelds GM, Krieckaert CLM, Nurmohamed MT, et al. Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA*. 2011;305:1460-1468. [CrossRef]