T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Ali Rıza SOYLU

SAFRA YOLU BAĞLANMIŞ SIÇANLARDA ANTİTROMBOTİK AJAN DALTEPARİNİN HEPATİK FİBROZİS GELİŞİMİNİ ÖNLEMEDEKİ ROLÜ

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Süleyman ERDOĞDU

EDİRNE 2010

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında değerli fikirleriyle bana yol gösteren tez danışmanım Doç. Dr. Ali Rıza SOYLU'ya, bilgi ve desteğini esirgemeyen İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gülbin DÖKMECİ'ye, eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan İç Hastalıkları Anabilim Dalın'da görevli tüm hocalarıma, uzman ve asistan arkadaşlarıma, Çocuk Cerrahi Anabilim Dalın'dan Doç. Dr. Ümit N. BAŞARAN'a, Histoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet KANTER'e, uzman biyolog Cevat AKTAŞ'a, biyolog Mustafa ERBOĞA'ya, tüm deney hayvan laboratuar çalışması süresince bana destek veren Dr. Beril KARAHAN'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **KARACİĞER HİSTOFİZYOLOJİSİ** 3
- **EKSTRAHEPATİK KOLESTAZ VE KARACİĞER FİBROZİSİ** 4
- **D-DİMER** 19
- **HİDROKSİPROLİN** 21
- **ALFA DÜZ KAS AKTİN (α-SMA)** 21
- **TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖR BETA (TGF-β)** 22
- **FİBRİNOJEN** 22
- **KARACİĞER FİBROZİS TEDAVİSİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR** 23
- **ANTİTROMBOTİK TEDAVİ VE DALTEPARİN** 25

GEREÇ VE YÖNTEMLER 32

BULGULAR 38

TARTIŞMA 53

SONUÇLAR 60

ÖZET 61

SUMMARY 63

KAYNAKLAR 65

EKLER

KISALTMALAR

ACE: Angiotensin converting enzyme (Anjiotensin dönüştürücü enzim)

ARB: Angiotensin receptor blockers (Angiotensin reseptör blokerleri)

ALT: Alanin amino transferaz

α-SMA: Alfa-smooth muscle actin (Alfa düz kas aktin)

ALP: Alkalen fosfataz

AST: Aspartat amino transferaz

ATP: Adenozin trifosfat

AT-3: Antitrombin-3

Con A: Conconavalin A

CCL_4: Karbon tetraklorür

CTGF: Connective tissue growth factor (Bağ doku büyüme faktörü)

DD: D-dimer

DMAH: Düşük moleküler ağırlıklı heparin

DNA: Deoksiribonükleik asid

ECM: Ekstrasellüler matriks

ELISA: Enzyme immunoassay

EM: Elektron mikroskop

FDA: Food and Drug Administration

FGF: Fibroblast growth factor (Fibroblast büyüme faktörü)

GGT: Gama glutamil transpeptidaz

HGF: Hepatocyte growth factor (Hepatosit büyüme faktörü)

HIF: Hypoxia inducible factor (Hipoksi ile indüklenebilir transkripsiyon faktörleri)

HS:	Heparan sülfat
HSH:	Hepatik stellate hücre (Hepatik yıldız hücre)
IL-10:	İnterlökin-10
IFN-γ:	İnterferon-gama
İP:	İntraperitoneal
MMP:	Matriks metallo proteinaz
NASH:	Nonalkolik steatohepatit
NO:	Nitrik oksit
NF-κβ:	Nuclear factor-kappa
PDGF:	Platelet derived growth factor (Trombosit kökenli büyüme faktörü)
PMNL:	Polimorfonükleer lökosit
PPAR-γ:	Peroksizom proliferatör aktivatör reseptör-gamma
SS:	Standart sapma
SYB:	Safra yolu bağlı
TFPI:	Tissue factor pathway inhibitor (Doku faktör yolak inhibitörü)
TGF-β:	Transforming growth factor-beta (Transforme edici büyüme faktörü)
TIMP:	Tissue inhibitor of metalloproteinase (Doku metalloproteinaz inhibitörü)
TNF-α :	Tümör nekroz faktör-alpha
VEGF:	Vascular endothelial growth factor (Vasküler endotel büyüme faktörü)

GİRİŞ VE AMAÇ

Safra kanalı ligasyonu, sıçanlarda deneysel fibrozis tablosu oluşturmak için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (1,2). Tıkanan safra yollarından, safranın geriye doğru birikmesi ile safra ve safra ile atılan toksik maddeler başta karaciğer olmak üzere diğer organlarda da hasar verici etkilere neden olur. Safra yollarındaki staz ve basınç artışı, safra kanallarının proliferasyonuna yol açar. Uzamış safra kanalı tıkanması hepatositlerde köpüksü dejenerasyonun yanı sıra parankimde lokal bozukluklara yol açar (3). Kronik kolestatik bozukluklar sonucunda, fibrotik doku portal kanallar etrafında artış gösterir (4). Sirozun başlangıç şekli olan hepatik fibrozis, kronik karaciğer hastalarında oluşan ciddi karaciğer zedelenmesinin bir sonucudur ve özellikle Disse aralığında kollajen ve ekstrasellüler matriks (ECM) proteinlerinin birikimi ile karakterizedir (5,6). Safra kanalı tıkanmalarının etiyolojisinde en sık karşılaşılan patolojiler safra yolları taşları, daralmalar ve tümörlerdir.

Karaciğer fibrozisinin gelişimini engellemek, durdurmak ve geri çevirmek için çok sayıda deneysel çalışma yapılmaktadır. Fibrozisin tedavisinde kabul edilmiş standart yöntem bulunmamaktadır. Çeşitli ilaçlar, antioksidan maddeler, antimitojenik faktörler, bitki ekstratları fibrozisi önlemek veya tedavi etmek için kullanılmıştır (7).

Kronik karaciğer hasarlarında karaciğerde progressif fibroz ve nodüller gelişerek zamanla siroz ve ölümle sonuçlanır. Karaciğerde gelişen bu kronik iltihap ve nodüllerin karaciğerin küçüklü büyüklü damarlarında tromboza neden olup hastalığı şiddetlendirdiği ileri sürülmektedir. Bu trombozlar hücre nekrozuna ve yok olmasına neden olup sonuçta sirozu hızlandırdığı düşünülmektedir.

Bizim bu çalışmamızda amaç sekonder biliyer siroz oluşturduğumuz sıçanlarda antitrombotik ajan dalteparin vererek koruyucu etkilerininin olup olmadığını biyokimyasal, ışık mikroskopik ve immünohistokimyasal yöntemler ile incelemek ve bu konuda yapılan benzer çalışmalar ile karşılaştırmaktır, bu şekilde zamanla sirozun seyrini hafifletmeyi amaçlıyoruz. Eğer projemiz olumlu sonuç verirse yani hepatik fibrozis ve dolayısıyla siroz gelişimi azalırsa insanları etkileyen kronik hepatit B, hepatit C, otoimmün hepatit gibi pek çok hastalığın ileri aşamalarında tedavilerine antitrombotik ajanlar eklenip survileri uzatılabilir.

GENEL BİLGİLER

KARACİĞER HİSTOFİZYOLOJİSİ

Karaciğer, vücudun en büyük karın içi organı ve bezidir. Kollajen ve elastik lif içeren Glisson kapsülü ile sarılı olarak sağ 7.-11. kaburgaların arkasına yerleşen karaciğer, hipokondrium ve epigastrium bölgesinde yer alarak sol hipokondrium bölgesine doğru uzanır (8-10). Karaciğer içinde safra kesesi ve vena cava inferiorun olduğu çukurlar ile sağ ve sol loblara ayrılır. Karaciğere akan kan, kalp debisinin yaklaşık %25'i kadardır. Ayrıca karaciğer vücudun toplam kanının %15'ini içerir (11). Karaciğer, a. hepatika propria (%20-%30) ve v. portae hepatis (%70-%80) olmak üzere iki kaynaktan beslenir. Hilus portal ven ve hepatik arterin giriş, sağ ve sol hepatik kanallar ile lenfatiklerin çıkış yeridir (12).

Safra kesesi karaciğerin visseral yüzündeki fossa vesicae biliarise yerleşmiş, 7-10 cm uzunluğunda, armut şekline benzeyen ve safranın konsantre hale getirilip depolandığı bir organdır. Fundus, collum ve corpus olmak üzere üç kısma ayrılır (13).

Sıçan karaciğeri insandakine benzer olarak sol, orta, sağ ve kaudal olmak üzere dört ana loba ayrılır. Karaciğer 4,5×2,5×0,8 cm boyutlarında olup en büyük lob 350 gr'lık bir hayvanda yaklaşık 4,3 gr ağırlığındaki sol lob olup ikinci en büyük lob olan 3,4 gr ağırlığındaki orta lobla birlikte tüm karaciğer in yaklaşık %70'ni oluşturur. Sıçanlarda da karaciğere kan hepatik arter ve portal ven olmak üzere iki kaynaktan gelir. Dönen kan ise karaciğerin içinden geçen vena kava inferior yolu ile boşalır. Vena kava inferior'un karaciğerin aşağısında kalan ve alt taraf kanını toplayan kısım infrahepatik, karaciğerin yukarısında kalıp diyaframı delerek toraksa giren kısmı ise suprahepatik olarak tanımlanır. Sıçanlarda farelerin aksine safra kesesi yoktur. Hepatik kanal karaciğer hilusundan çıktıktan sonra portal veni çaprazlayıp pankreas kanalları ile birleşip duedonuma bağlanır (14).

Karaciğer, gastrointestinal sistemden emilen besinlerin metabolize edildiği ve depolandığı organdır. Karaciğer, yaşamsal birçok işlev yapar. Karaciğer metabolizmanın düzenlenmesi, plazma proteinleri, büyüme faktörü, hormon ve vitamin üretimi, A, D, B_{12} gibi vitaminlerin ve demirin depolanması; hormonların, ilaçların ve toksik maddelerin parçalanarak inaktif metabolitlere dönüştürülmesinde görev alır. Karaciğer ayrıca protein metabolizmasında, esansiyel olmayan aminoasit yapımında da görev alır (11). Karaciğerin büyük bir fonksiyonel rezervi ve rejenerasyon kapasitesi vardır ve fulminan hepatik hastalıklar dışında bütün hastalıklarda rejenerasyon gerçekleşebilir. Eğer bağ dokusu çatısı sağlam kalmışsa masif hepatosellüler nekroz meydana gelse bile karaciğer tam veya tama yakın olarak iyileşebilir (15). Bir diğer görevi de metabolizmaya katılan safranın yapımıdır. Büyük kısmı kan hücrelerinin ve bileşenlerinin metabolizması sonucu oluşan safranın salgılanması ise karaciğerin ekzokrin fonksiyonudur. Karaciğer hepatositlerinde üretilen safranın iki önemli işlevi vardır. Birincisi, yağların sindirimi ve emilimi, diğeri ise kandan bilirubin ve kolesterol gibi çeşitli önemli yıkım ürünlerinin atılmasıdır (16).

Safra kolesterolün dışarı atılmasının tek yoludur. Bu şekilde karaciğer hücreleri serum kolesterol düzeyinin düzenlenmesinde önemli görev alır. Her gün duodenuma 250–1500 ml arasında safra girer (11). Safra üretimi sürekli olurken safra sekresyonu gıda alınımı ile uyarılan barsaklardan salınan kolesistokinin hormonunun safra kesesini kasması ve oddi sfinkterini gevşetmesi ile gerçekleşir. Fizyolojik koşullarda yiyecek alımı olmaz iken, Oddi sfinkteri kapalıdır. Safra, safra kesesinde depolanır, burada suyun emilimi ile safra yoğunlaştırılır. Günde yaklaşık olarak 500 ml salgılanan safra enterohepatik dolaşım ile bağırsaklardan geri emilerek karaciğer tarafından tekrar salgılanır. Safra tuzları, safra pigmentleri ve pankreatik sıvıya benzeyen alkali elektrolit çözeltisiden oluşmuştur. Büyük çoğunluğu su olan safranın altın rengi görünümünden, hemoglobin'in yıkım ürünleri olan bilirubin ve biliverdin sorumludur (17).

Safra kanallarının tıkanmasında, bilirubin oluşumu normaldir ancak oluşan bilirubin kandan bağırsaklara geçemez. Serbest bilirubin karaciğer hücrelerine geçerek konjuge (bağlı) hale çevirilir. Konjuge bilirubin ya dolgun safra kanalcıklarının yırtılması ile kana geçer ya da doğrudan lenf damarları ile karaciğerden ayrılır. Plazmada bulunan bilirubin çoğunlukla konjuge tiptedir. Safra akımının tam tıkanmasında safra bağırsaklara hiç akmadığından, bakteriler tarafından ürobilinojene çevrilemez ve idrarda gözlenmez. Dışkı, safra pigmenti içermediği için beyazdır. İdrarda önemli miktarda konjuge bilirubin gözlenir (16). Barsak içeriğinde safra bulunmadığı zaman yemeklerle alınan yağın %50'si emilemez ve bu durum

yağda eriyen A, D, E, K gibi vitaminlerin ciddi eksikliğine yol açar (11,17). Lipidler ve karbonhidratlar vücudun öğünler arasındaki enerji gereksinimini karşılamak için trigliserid ve glikojen halinde karaciğerde depolanır, ayrıca karaciğerde lipidler ve aminoasidlerden glukoneogenez adı verilen yolla glikoz sentezi yapılmaktadır (15).

Karaciğerin fonksiyonel ünitesi birkaç mm uzunluğunda 0,8-2 mm çapında ve silindirik yapıda olan 50.000-100.000 adet bulunan karaciğer lobülüdür (16). Karaciğer lobül yapısının üç adet kavramsal değerlendirilmesi bulunur. Bunlar yapısal parametrelere dayalı karaciğer lobülünün klasik kavramı, diğeri portal lobül kavramı ve sonuncusu karaciğer asinusu kavramıdır. Karaciğer lobülü birbirleriyle anastomoz yapan ve sinüzoid boşlukları ile çevrili hepatosit plaklarından oluşmaktadır. Karaciğer lobülünün ortasında hepatik arterin ve portal venin dallarından gelen ve sinüzoidlerde birbirine karışan kanı toplayan merkezi bir ven - venül yer alır. Hepatik arterin ve portal venin dalları, safra kanalı ile birlikte altıgen karaciğer lobülünü çevreleyen portal alanda yer alan klasik portal triadı oluşturur (8). Portal lobülde portal triad merkezi eksende yer alıp hepatosit parenkiminden safrayı toplamaktadır. Tüm bu kavramlardan karaciğer asinusu kavramı; karaciğerin yenilenme koşullarını, metabolik aktiviteyi ve siroz gelişimini anlamak açısından daha uygundur (8). Her bir asinüs; iki santral ven arasında yer alan oval bölge olarak tanımlanır (18). Kan, asinüs merkezinden hepatik venlere doğru akar. Arteriyel kanın venöz sinüzoidler boyunca akışı üç bölgeye ayrılır. Toksik madde alımında en çok hasarı birinci bölgedeki hepatositler görürken, hipoksi durumunda ise üçüncü bölgedeki hepatositler en çok etkilenir (8). Sinüsoid duvarlarını çevreleyen endotel hücreleri arasında, hepatositlere komşu Disse aralığına açılan fenestra denilen geniş boşluklar bulunmaktadır. Bunlar barsaklardan gelen makromoleküllerin hepatosite girişine izin verir. Endotel hücreleri oksidatif hasardan ciddi şekilde etkilenmektedirler (19).

Portal triad yakınındaki damarlara en yakın olan, asinüs merkezi olarak adlandırılan perisinüsoidal alan birinci bölge olarak tanımlanır. Birinci bölge, oksijen ve besin maddesi yönünden en zengin kısımdır (17). Üçüncü bölge, v. sentralise en yakın olan bölgedir, ikinci bölge ise bu iki bölge arasında yer alır.

Karaciğerde beş türde hücre bulunmaktadır. Bu hücreler hepatositler, endotel hücreleri, Kupffer hücreleri, stellat hücreler ve safra kanalı epitel hücreleridir. Tüm hücrelerin %80'ini hepatositler oluşturur ve bu hücrelerin hepsi oksidatif stresle ilişkili hücrelerdir (19). Karaciğerin, endokrin ve ekzokrin görev yapan fonksiyonel hücresi hepatosittir. Hepatositler, sinüzoid boşluklar ile çevrili, birbirleriyle anastomoz yapan hücre dizileri oluştururlar. Bir

hepatositin bazolateral ve apikal bölgesi vardır. Bazolateral bölge çok sayıda mikrovillüs içerip Disse aralığına ve sinüzoid boşluğuna bakar. Bu bölge kan kaynaklı madde emilimi ve plazma proteinlerinin salgılanmasına katkıda bulunur. Disse aralığındaki fazla sıvı, lobül dış kısmında yer alan Mall aralığı tarafından toplanır. Apikal bölge ise safranın geri kaçışını önlemek için kenarları tıkayıcı bağlantılarla kapatılmış olan safra kanalikülünün kenarlarını saran, mikrovillüslerle kaplı bir girinti şeklindedir. Safra kanalikülü bu bölgeyi tanımlar. Karaciğer sinüzoidleri, lobül kenarından v. sentralise doğru kan akımına sahiptir ve çapları kapillerden geniştir. Duvarı kesintisiz olmayıp başlıca, endotel ve Kupffer hücresi içerir. Endotel hücreleri sıkı bir yapıya sahip olmayıp sitoplazmaların'daki delikler sayesinde kandan madde geçişine izin verirler. Kupffer hücreleri, kan monositlerinden köken alan, endotel hücreleri arasında bulunan, sitoplazmik uzantıları olan fagositoz yeteneğine sahip hücreleridir. Hepatositleri sinüzoitteki kandan Disse aralığı (perisinüzoidal aralık) ayırır. Bu aralıkta, yoğun madde geçişi gerçekleşir, kollajen ve retiküler lifler yer alır. Disse aralığında, A vitamini metabolizması ve depolanmasında görev alan yıldızsı hücreler (stellat) olarak da adlandırılan ito hücreleri bulunur. Patolojik durumlarda bu hücreler kollajen üreten miyofibroblast benzeri hücrelere dönüşürler. Tip I kollajen dışında; laminin, proteoglikan ve büyüme faktörlerini de salgılar.

Safra kanalikülleri, karaciğerin ekzokrin salgısı olan safranın hücreler arası iletildiği kanalcıklardır. Bu kanalcıklar, karaciğer lobülünün plakları boyunca anastomoz yapan kompleks bir ağ oluşturur ve portal alanda sonlanır. Bu nedenle safra, kan akışının tersi yönünde, yani klasik lobul merkezinden periferine doğru akar. Kanalcıkların duvarlarını oluşturan karaciğer hücreleri arasında safra salgısının sızıntısını önleyen zonula adherens (sıkı tipte bağlantı) bağlantı yapıları bulunur. Safra, safra kanaliküllerinden lob içi safra kanalcıklarına oradanda lobül dışındaki Hering kanalını geçerek portal alandaki safra kanallarına veya kanalcıklarına boşalır. Safra kanalcıkları karaciğer içi safra kanallarında birleşirler. Bu kanallar giderek genişleyip, birleşerek sağ ve sol hepatik kanalları oluşturarak karaciğeri terk eder ve duodenum lümenine açılır (8,18,20).

EKSTRAHEPATİK KOLESTAZ VE KARACİĞER FİBROZİSİ

Ekstrahepatik Kolestazis

Hepatik fibrozis etyoloji ayırt etmeksizin kronik karaciğer hastalığı olan hemen hemen tüm hastalarda görülen bir süreçtir. Fibrozis ekstrasellüler alanda fibriller kollajenlerden

zengin ECM'nin aşırı birikmesi nedeniyle oluşmakta ve genellikle siroz diye adlandırdığımız duruma yol açmaktadır (21). Kronik karaciğer hastalığı ve ilgili komplikasyonları, dünya genelinde mortalite ve morbidite nedenleri arasında üst sıralarda yer almakta ve sıklığı halen artmaktadır. Günümüzde ilerlemiş fibrozis için mevcut olan tek etkili yöntem karaciğer transplantasyonudur (22). Ancak en iyi koşullara rağmen transplantasyon birçok zorluğu ve komplikasyonları olan pahalı bir seçenektir. Bu yüzden hepatik fibrozisin önlenmesi veya tedavi edilebilmesi için medikal tedavi arayışları gittikçe önem kazanmaktadır. Özellikle son yıllarda bir toplum sağlığı problemi haline gelen nonalkolik steatohepatit (NASH) ve onun siroza yol açtığının gösterilmiş olması bu konunun önemini daha da arttırmıştır (23). Günümüzde hepatik fibrozisin aktif ve dinamik bir süreç olduğu, bağ dokusunun yapım ve yıkımı arasında bir dengesizlik sonucu geliştiği ve ECM birikiminin sanılandan daha reversibl olduğu kanıtlarla gösterilmiştir (23,24).

Karaciğer dışındaki ya da porta hepatis içerisindeki büyük safra yollarının tıkanmasına ekstrahepatik veya cerrahi kolestaz denilmektedir. Bunun karşıtını intrahepatik veya medikal kolestaz oluşturur. Transplant cerrahlarınca çeşitli "medikal" kolestaz sebeplerinin düzeltilmesiyle ve girişimsel gastroenterologlar ve radyologlarca da çeşitli "cerrahi" sarılık sebeplerinin tedavi edilmesiyle birlikte bu ayrım artık pek gerçekci kabul edilmemektedir (25). Ek olarak, ekstra ve intrahepatik obstrüksiyon arasındaki ayrım da özellikle hilar duktusların dahil olmaları halinde, daima sıkı bir ayrım da değildir. Büyük kanal obstrüksiyonunu ortaya çıkaran asıl hastalıklardan bazıları Tablo 1'de özetlenmiştir (26-37). Primer sklerozan kolanjit, kazanılmış sklerozan kolanjit ve rekürren pyojenik kolanjit lokalize striktürlere yol açıp ekstrahepatik biliyer yolu ön planda etkileyebilir.

Geniş Safra Kanalı Obstrüksiyonun Patolojisi

Eldeki bilgiler, hayvan deneylerinden olduğu kadar, çok sayıdaki biyopsi örnekleriyle ilgili erken dönem çalışmalardan da kaynaklanmaktadır (38,39). Bu değişikliklerin kesin bir kronolojisinin saptanması ise, ardışık spesimenlerin elde edilemediği insanoğlunda oldukça zordur. Ek olarak, karaciğerdeki değişiklikler sadece obstrüksiyonun süresi ve derecesine değil aynı zamanda da süperimpoze olan enfeksiyon ve mekanik obstrüksiyonun kendisinin rolüne de bağlıdır. Histolojik değişiklikler ise erken ve geç belirtiler olarak gruplandırılabilir.

A-Erken lezyonlar: En erken değişiklikler genellikle perivenüler bilirübinostazisi takiben portal alan ödemi ve inflamasyonundan oluşmaktadır. Bilirübinostazis perivenüler bölgelerde başlar. Hepatosit stoplazmalarında ince bilirübin granüllerinin görülmesi ile ve

çeşitli dilate ve keskin interselüler boşluklarla birlikte safra tıkaçları ya da konsantrasyonları ile karakterize olan bir durumdur.

Portal traktus ödemi erkenden gelişmektedir ve bu durum daha çok küçük terminal dallanmalarda bildirilmektedir. Orta-boyuttaki portal traktuslarda ise bu ödem kollajen fiberlerinin konsantrik bir periduktal lamellar dizilimine sebep olmaktadır (40). Biliolenfatik reflü ise portal ödemden, fibroblastların aktivasyonlarından histiyositler ve nötrofil lökositlerin baskın olduğu inflamatuar hücrelerin infiltrasyonundan sorumlu tutulmaktadır. Duktular reaksiyon erkenden gelişmekte ve de safra-yolu sitokeratinleri 7 ya da 19 açısından immün boyama ile daha iyi gösterilebilmektedir (41). Reaktif kanalcıklar, küboidal hücrelerden oluşmuş ve periodic acid-Schiff (PAS-D) pozitif bir bazal membranla çevrili bir lümen ile tanınmaktadırlar (38). Ekstrahepatik obstrüksiyona sahip biyopsi spesimenlerindeki portal bölgelerin %82'sinde reaktif kanalcıklar ve eşlik eden polimorfonükleer nötrofil infiltrasyonu ile karakterize kolanjiolit görülür (42).

Tablo 1. Büyük kanal obstrüksiyon nedenleri

-Koledokolitiyazis (sıklıkla safra kesesi taşlarına bağlı)
-Tekrarlayan piyojenik kolanjit
-Primer sklerozan kolanjit
-Bilier striktür (safrayolları cerrahisi sonrası)
-İnflamatuar polip
-Penetran travma
-Hepatik ve duodenal arterde anverizma
-Parazitik infeksiyon (fascıola hepatica, clonorchis sinensis, ascariasis lumbrıcoides, strongyloides stercoralıs)
-Pankreatit, pankreatik psödokist
-Penetran duodenal ülser
-Mirizzi sendromu
-Annuler pankreas
-Amiloid birikimi
-İskemik kolanjit/anatomik striktür
-Neoplasm (papiller adenom, ampuller adenokarsinom, safrayolu karsinomu, klatskın tümörü, hepatik karsinom, karsinoid tümör, pankreas başının primer ve metastatik tümörü)

B-Geç lezyonlar: Devam eden obstrüksiyonla beraber, parankimal ve portal değişiklikler daha çok ortaya çıkmakta ve kolat stazı ile birlikte, biliyer periportal aralık aktivitesi meydana gelmektedir. Bununla birlikte, ekstrahepatik obstrüksiyonda bilirübinostazis varlığı daha süreğen bir biçimde öne çıkmaktadır. İnterselüler safra tıkaçları sayıca ve büyüklük açısından artmakta ve bazı koyu çökeltiler (konkrement) daha geniş hale gelmekte ve zamanla kolestazis periportal zona uzanmaktadır. Değişik boyutlardaki lümenlerinin boş olarak gözükebildiği ya da daha hafif safra-boyalı materyal ya da daha yoğun kıvamlı safra çökeltilerini de içerebildiği "kolestatik karaciğer-hücresi rozetlerinin" sayılarında bir artış mevcuttur. İzole (ya da gruplar halinde), tıkaçlara ya da çökeltilere komşu olan ya da biliyer çökeltilerle herhangi bir topografik ilişkisi olmayan hepatositler ise genişlemişlerdir ve de sitoplazmalarının daha ince bir retiküler ağa indirgendiği, bazen de bilirübinle dolu olan ve ‘‘tüysü dejenerasyon’’ olarak da adlandırılan bir rarefaksiyona sahip olabilmektedirler.

Portal yolakların yanında birbiriyle birleşen karaciğer hücre gruplarının tüysü dejenerasyonları ve ardından gelen litik nekrozları ise safra infarktları olarak adlandırılır (43). Geniş safra infarktları ekstrahepatik kolestazis açısından tanısaldırlar. Geniş safra infraktları düzensiz boşluklarla birlikte litik nekrozlar ve gevşek dizilimli safra ile dolu retikülin fiberler ve nekrobiyotik hücreler göstermektedirler ki bunlar tüysü dejenerasyon gösteren bir hepatosit zonuyla çevrili haldedirler (44). Safra infarktlarının biriken safra içeriklerinin, özellikle de safra tuzlarının toksik etkileri ile kombine artmış bir biliyer basınca ait hasar yapıcı etki nedeniyle oluştuğu düşünülmektedir (45,46). Safra infarktlarına ait nekrotik bölgeler büyük ölçüde fibröz skarlaşma ile yer değiştirirler. Safra kanallarındaki geniş çökeltiler ise döşeyen epitelin nekrozuna ve safranın ekstravazasyonuna neden olabilmektedirler. Bu tür biliyer ekstravazasyonlar ise, sıklıkla multinükleer yabancı cisim dev hücrelerinden oluşan fagositik bir reaksiyonu ortaya çıkarmaktadırlar. Geniş safra infarktları ve safra ekstravazasyonları, daha çok geç değişiklikler olmaları ve şimdilerde de erkenden teşhisleri ile birlikte küratif bir cerrahi ya da bir stentin yerleştirilmesiyle obstrüksiyonun hafifletilmesi nedeniyle genellikle oldukça nadir gözükmektedirler.

Büyük kanal obstrüksiyonunda kanal ve kanalcıkların lümenleri düzensiz biçimde dilate olmakta ve de döşeyen hücreleri de anizositoz, sitoplazmik vakualizasyon, nüklear piknozis ve epitelyal soyulma gibi çeşitli dejeneratif değişiklikler gösterebilmektedirler. Daha geniş interlobüler safra kanalları ise tortuozite ve dallanmaya ilişkin, bazen de döşeyen hücrelerinin hasarlarına ya da epitelin soyulmasına ilişkin bulgular gösterebilmektedirler.

Lümen ise değişik biçimlerde boş halde ya da mukoid materyalle ya da nötrofilik polimorflarla birlikte ya da olmaksızın biliyer presipitlarla dolu halde olabilmektedir. Daha geniş biçimde koyulaşmış olan biliyer çökeltiler ise epitelyal dizilimin ülserasyonuna yol açabilirken, diğer bölgelerde de mikropapiller projeksiyonlara sahip epitelyal hiperplazi varlığı da gösterebilmektedirler. Periduktal fibrozis ise, periduktal kapiller pleksustan gelen duktal kan akımını bozarak, sekonder iskemik kolanjite genellikle yol açar ve progresif duktal atrofi ile sonuçlanır.

C-Süperimpoze enfeksiyon, süpüratif kolanjit: Yoğun nötrofilik polimorf koleksiyonlarının kanal ve kanalcıkları kapatmaları ve lümenlerinde birikmeleri halinde asendan enfeksiyondan şüphelenilmelidir. Lümende pü varlığı bazen döşeyen epitelin hasarıyla ilişkili olabilmekte ve ciddi enfeksiyon varlığında da abseler şeklinde gözlenebilmektedir. Bu son sayılan durumda ise, genellikle antibiyotiklerin ulaşamadığı, bakterilerin serbestçe üreyebildikleri korunaklı bölgelerin oluşturulduğu, sıklıkla infeksiyonu kolaylaştıran bir iskemik komponent de mevcuttur (47). Bunu kavitasyonlar ve biliyer abseler (biloma) izleyebilmektedir.

D-Değişikliklerin geriye dönüşebilirlikleri: Safra yolu obstrüksiyonunun hafifletilmesi, değişken hızlarda parankimal ve portal değişikliklerin regresyonuna yol açmaktadır (48). Aşırı miktarlarda periportal fibrozis ve sekonder biliyer siroz, çocuklarda bazen obstrüksiyonun hafifletilmesi sonrasında gözle görülür bir rezolüsyonun gözlenmesine rağmen büyük ölçüde irreversibldirler. Bu lezyonların obstrüksiyonun hafifletilmesi sonrasında geriye dönüşebilirlikleri deney hayvanlarında iyi bir biçimde gösterilmiştir (49-51). Dejenere ve nekrotik hepatositler birkaç gün içerisinde hızlı bir rejenerasyon süreci ile yer değiştirmektedirler. Tüysü dejenerasyon odağı, perivenüler safra tıkaçları ve makrofaj pigmentasyonu ise haftalarca sürebilmektedir. Neokanalcıklar ise apopitozis yoluyla kaybolabilmektedirler (52). Portal yolaklarda gözüken inflamatuar değişiklikler ise bazen kalabilmekte ve sonuç olarak da, yolakların daha kalıcı olarak hafifçe genişlemeleri ile sonuçlanan bir hiyalinize kollajen birikimi meydana gelebilmektedir. Karaciğerin tam olarak fonksiyonel bir iyileşmesinin sağlanması ise safra yolağı obstrüksiyonunu takiben belirgin bir süre alabilmektedir.

Sekonder Biliyer Siroz

A-Patogenez ve morfoloji: Sekonder biliyer siroz, ekstrahepatik safra obstrüksiyonun göreceli nadir bir komplikasyonudur. Geçmişte geniş serilerde bu durum %8,6'larda bildirilirken şimdilerde erken görüntüleme yöntemleri, cerrahi ya da girişimsel radyolojik teknikler ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı ile birlikte oldukça azalmıştır. Sekonder biliyer siroz patogenezi, obstrüksiyonun kendisine ait rölatif rolüne ve yaygın biçimde eşlik eden kolanjit varlığına karşın tartışmalıdır. Ek olarak, ilerlemiş biliyer sirozlu bazı karaciğerlerde gözlenen parankimal kollaps gelişiminde de portal oklüzif flebitinin bir rolü olabilir.

Ostrüksiyon tek başına sekonder biliyer siroza sebep olabilir, komplet ekstrahepatik obstrüksiyonda karaciğer sirozunun gelişmesi için gerekli olan süre değişkendir ve obstrüksiyonun sebebine, ilişkili enfeksiyona ve siroz teşhisi açısından kullanılan kritere bağlı olarak da değişkenlik göstermektedir. Ekstrahepatik biliyer atrezili infantlarda siroz 5-6 ay sonra gelişmektedir (53). Altmış erişkinin alındığı bir seride, Scobie&Summerskill (54) biliyer obstrüksiyon başlangıcı ve biliyer sirozun doğrulanması arasındaki ortalama intervalin: ortak safra yolu striktürlü hastalarda 7,1 yıl, ortak safra yolu taşlarına sahip hastalarda 4,6 yıl ve de malign obstrüksiyonlu hastalarda ise 0,8 yıl olduğunu bulmuşlardır.

Ekstrahepatik mekanik obstrüksiyona bağlı olarak gelişen gerçek bir sekonder biliyer siroz oldukça nadirdir. Benign obstrüksiyonlar genellikle cerrahi ile hafifletilmekte ve inoperabl malignensi durumunda ise obstrükte kanalın stentlenmesi ile geçici safra drenajına izin verilmekte ve genellikle de siroz gelişmesinden çok önce kaşeksi, metastazlar ve/veya septik komplikasyonlar nedeniyle de ölüm gerçekleşmektedir. Biliyer siroz en sık, kronik obstrüktif kolanjiyopatilere sekonder, özellikle de genelde cerrahi ya da girişimsel radyolojiye uyum göstermeyen primer ya da kazanılmış sklerozan kolanjiin olduğu bir sekel şeklinde gözükmektedir. Bu durum dolayısıyla, kronik kolestazisle ilişkili biçimde tanımlanmış olan siroz morfogenezi ile benzerdir. Eş zamanlı periportal hepatosit kaybı ve eşlik eden fibroplazi ile birlikte gözüken duktular reaksiyon komşu portal yolakları birleştiren mezenşimal kenarlara ait portoseptal fibröz genişlemelere yol açar. Hem duktular hücreler, hem de aktive hepatik stellat hücreler tip IV kollajen ve lamininden zengin gevşek ve hücresel bağ dokunun döşenmesine katkıda bulunurlar (55). Konnektif doku büyüme faktörü ve periduktal mast hücreleri bu süreçte önemli alabilirler (56,57). Bunu daha sonra kalıcı aktif degradasyon aktivitesiyle birlikte tip III fiberlerinin çökmesi (artmış kollajen turnoveri ve reversibl

fibrozis) ve daha sonra da degradasyon aktivitesinin tükenmesi ile birlikte de tip I fiberlerinin progresif biçimde kalıcı çökmeleri (irreversibl fibrozis) takip etmektedir (44).

Kronik intrahepatik kolestazisde gözlenen progresyon ile birlikte, öncelikle portal-portal fibröz bağlantılar intrahepatik vasküler ilişkilere zarar vermezler. Kalınlaşmış karaciğer hücresi plaklarını oluşturan diffüz rejenerasyon yaygındır ve fibrozis ile birlikte siroz olmadan portal hipertansiyona yol açar (37). Periportal/periseptal hepatositlere oluşan hasar ise, obstrüksiyon sonrasında erken evrelerde deneysel olarak gösterilen maksimal biyosentetik aktivitede bir bozukluğun varlığını yansıtmaktadır (58). Muhtemelen portal kan yoksunluğuyla ilişkili olarak hepatositlerin daha yoğun bir biçimde kayıpları ise sirozda bulunan intrahepatik şantlarla ve sonunda da nodüler rejenerasyonla beraber köprüleşme septasının oluşmasına yol açmaktadırlar.

B-Patoloji: Karaciğer boyutları artmakta, sadece hastalığın son evrelerinde subnormal bir oranda büzülme göstermektedir (59). Yüzeyi düz, ince granüler ya da nodülerdir. Kıvamı ve granülaritesi siroz evresiyle birlikte değişkenlik göstermektedir. Karaciğer palpasyonda tahta gibi serttir. Kesit alınırken, genişlemiş portal yolaklarla ilişkili olan küçük gri ya da mavi alanlarla noktalanmış biçimde kesit yüzeyi sarı, yeşilimsi-gri ya da koyu gri şekilde gözükebilir. Küçük hemorajiler, yeşil ya da gri nekrotik lekeler ve haricen küçük infarktlar görülebilir. Safra kanalları bazen belirgin biçimde distandü bir biçimde açık ya da koyu, sıklıkla da kıvamlı bir safra ile dolu olabilirler. Bazı vakalarda, intrahepatik kanallar basınç altında beyaz, yumurta akı gibi bir safra ile dolu olabilirler (59). Hilum yanında bulunan geniş kanallara genellikle artmış miktarlarda bağ doku da eşlik eder.

Histolojik bulgular hastalığın evresi ile orantılı değişkenlik gösterir. Ekstrahepatik kolestazise ait özelliklerle birlikte, erken dönemde biliyer fibrozis ve geç dönemde siroz şeklinde görülür. Safra stazı ise, irregüler şekilli nodüllerin periferini gösterir bir biçimde diffüz, ya da baskın olarak da periseptal biçimde olabilmektedir. Mikroskobik bilirübinostazis ise karaciğer hücrelerinin tüysü dejenerasyonlarıyla, safra infarktlarıyla ve de safra kaçaklarıyla ilişkili olabilmektedir; bu son bahsedilen durum ise sirozun obstrüktif bir sebebine ilişkin karakteristik bir bulgudur ancak iğne biyopsisi spesimenlerinde nadiren görülmektedir. Ödematöz fibröz septaların içinde, mezenşimal ve inflamatuar hücre azlığı ile birlikte polarize ışık altında çift ışık kırınımı gösteren kaba, hiyalinize kollajen demetlerinden oluşmuş yoğun bir bağ doku mevcuttur. Bunlar orijinal portal bağ dokusu ve septanın eski derin yerleşimli kısımlarını oluştururlar ve tip I kollajen içerirler. Bu durum mezenşimal ve

inflamatuar hücreler içeren gevşek örülü retikülin fiberleri ile marjinal biçimde uzanan potansiyel bir reversibl bölge olan reaktif kanalcıkları gösterir. İnflamatuar eksuda genellikle nötrofil lökositleri içermeye devam eder. Tanısal bir bakış açısıyla, belirgin olanlar ise duktular yapıların iyi bilinen lümenleriyle birlikte görülmesidir. Bu yapılardaki ve kanallardaki biliyer atıklar, özellikle de ilişkili bir sepsis varlığında ortaya çıkabilmektedirler. Sekonder biliyer sirozun geç evrelerinde ise hem kanallar hem de kanalcıklar da gözden kaybolabilirler (38). Geriye kalan kanallar ise sıklıkla konsantrik periduktular fibrozis ile karakterizedir. Rejeneratif nodüller, sıklıkla bir yapboz parçasını andıran tek ya da multipl lobüllerden oluşmaktadırlar (43). Bu nodüller, paralel fiberlerle ve parankim aralığında bulunan tipik ödem zonu ve duktular proliferasyon ya da "halo" ile beraber serpijinöz (yılanvari) konnektif doku bantları ile ayrılmaktadırlar. Bu bölgedeki karaciğer hücreleri çikolata stazı ve bilirübinostazis gösterebilir ve bakır bağlayıcı proteine ait orsein-pozitif depozitler, bakır rodanin-pozitif granüller ve Mallory cisimciklerini içerirler.

Daha önceden de belirtildiği gibi, sekonder biliyer siroz bakteriyel enfeksiyonla komplike olabilmektedir. Enfeksiyonun ciddi olması halinde flebit ve kolanjit, sıklıkla da safrayla boyalı olan abseler ortaya çıkabilmektedir.

Vasküler Yeniden Şekillenme

Sirotik duruma yol açan kronik karaciğer hasarı gelişiminin merkezinde vasküler değişiklikler yer almaktadır (60). Endotelyal hücre porozitesindeki (porlaşma) değişimler, tromboz nedeniyle oluşan vasküler patens kaybı ve sinüzoidal seviyede ve daha büyük damarlarda da karaciğer vasküler kan akımının reorganizasyonundaki değişimler vasküler değişikliklerde kilit noktaları oluştururlar.

A-Endotelyal porozite: Normal karaciğerde, sinüzoidal endotelyal hücreler bazal membrandan yoksundurlar ve endotelyal hücre bölgesinin %2-%3'ünde yaklaşık 100 nm çapındaki fenestrasyonlar göstermektedirler (porozite). Ekstraselüler matriksin Disse aralığında çökmesine sinüzoidal endotelyal hücrelerdeki fenestrasyonların kaybı da eşlik etmektedir (61). Progresif fibrozis ile birlikte, endotelyal fenestrasyon çapları yavaşça azalmaktadır ancak bununla birlikte porozite bölgeleri de %0,5'in altına düşmektedir (62). Stellat hücreleri tarafından Disse aralığında aberran ekstraselüler matriksin çökmesi ile birlikte bu sinüzoidal aralık, hepatositler ve plazma arasında çözülmüş madde değişimi açısından bir kanal oluşundan çok bir kapilleri andırmaktadır (61). Özellikle proteinlere ait

(örn; albumin, pıhtılaşma faktörleri, lipoproteinler) olan hepatosellüler sekresyonlar büyük ölçüde bozulmuşlardır.

B-Vasküler tromboz: İkinci vasküler hasar da trombozdur. Anjiyografik ve ultrasonografik çalışmalarda, sirotik hastaların %0,6'sı ila 16,6'sında portal ven trombozu ve otopside sirotik karaciğerlerin %39'unda gros biçimde görünür portal ven fibrozisi ya da trombozu saptanmıştır (63,64). Otopside incelenen sirotik karaciğerlerin %74'ünde 0,2 mm'den küçük çaptaki hepatik venlere ait venookluziv lezyonlar saptanmıştır (65,66). Karaciğer transplantasyonunda, çıkarılmış karaciğerlerdeki portal venlerin %36'sında ve hepatik venlerin %70'inde obliteratif lezyonların olduğu saptanmıştır (67). Portal vene ait obliteratif lezyonların dağılımları değerlendirildiğinde ise, her birisinin kendi köken aldıkları bölgelerden multifokal trombüs yayılımı kapsamlarıyla tutarlı olacak bir biçimde hepatik vende bulunanlardan daha üniform haldeydiler. Portal ven lezyonları, sirotik nodüllerin boyutlarında öne çıkan bölgesel varyasyonlar ile ilişkilidir. Hepatik ven lezyonları ise birleşik fibrozis ve parankimal tükenme bölgeleri ile ilişkilidir. Sonuç olarak, sirozda orta ve geniş portal ven ve hepatik ven trombozları sık görülür ve bu trombozlar parankimal tükenmeden tam bir siroza ilerleyişte önemli bir rol oynarlar.

Siroz açısından vasküler trombozun bir orijin olduğuna ilişkin daha ileri destek ise Budd-Chiari sendromu çalışması sayesinde sağlanmıştır (68). Bu sendroma sahip hastalardan rezeke edilen 15 karaciğerin altısında, hepatik ven trombozunun yanı sıra ciddi portal ven trombotik obliterasyonunun varlığı da gösterilmiştir. Karaciğerlerin her birisinde hepatik venleri portal yolaklara köprüleştiren bir fibröz septa ile birlikte venoportal siroz varlığı da mevcuttu. Portal ven trombozunun olmadığı 3 karaciğerde ise sadece venosentrik bir siroz paterninin olduğu gösterilmiştir. Geriye kalan 6 karaciğerde ise karışık bir venosentrik/venoportal siroz paternine eşlik eden ılımlı fokal portal ven obliterasyonu mevcuttu. Dolayısıyla, tek başına hepatik ven trombozunun varlığı siroz oluşumu açısından yetersiz gibi gözükmektedir. Bunun üstüne süperpoze olan bir portal ven trombozu ise venoportal köprüleşme fibrozisini tetiklemektedir. Bu yazarlar sonuç olarak orta-geniş boyutlu hepatik ven ve portal ven (0,2 ila 0,3 mm çapa sahip) trombozlarının, siroza sebep olan diğer hastalıklarda da önemli bir rol oynadığını ileri sürmüşlerdir.

C-Sinüzoidal kan akımı: Siroz gelişimi sırasında, sonuç olarak ortaya çıkan sinüzoidal akım dinamiklerinde dramatik değişiklikler meydana gelmektedir (69). Birincisi,

portal yolakların ve bunların vasküler dallarının sklerozu ile presinüzoidal vasküler direnç artmaktadır. Stellat hücrelerin miyofiberler sentezlemeleri ile miyofibroblasta dönüşmesi ve bu "miyofibroblastların" tonik kontraksiyonlarının da sinüzoidal vasküler kanallarda daralmaya neden olmaları sebebiyle sinüzoidal vasküler direnç artmaktadır. Lobülün perivenüler bölgesinde oluşan fibrozis ise, postsinüzoidal vasküler direnç oluşturarak dış vasküler akımı kısmi biçimde obstrükte edebilmektedir. İkincisi, portal yolaklar ve terminal hepatik venler arasında bulunan fibröz köprü septalaşmasıyla birlikte portovenöz ve arteriyovenöz şantlaşma ortaya çıkmaktadır. Özellikle de, portal yolaklar (portal ven ve hepatik arter) yoluyla karaciğere giren kan, düşük dirençli yüksek akımlı vasküler kanallar içerisinden parankimal nodülleri etkin bir biçimde bypass ederek terminal hepatik venlere doğru şantlaşmaktadırlar. Bu kanallar özellikle portal-santral köprü fibröz septasının içerisinde ortaya çıkabilmektedirler. Fibrozis siroza ilerledikçe, "hızlı" septal kanallar içerisinden şantlaşan kan akımı hepatik parankimin geri kalanını, önemli bir kan akımından neredeyse tamamen mahsur bıracak biçimde terk etmektedir (70).

Hızlı vasküler kanallar ise endotelyal hücrede fenestrasyonları ve kapillarizasyon özelliğinde bir bazal lamina gelişimini gösterir. Lobülün perivenüler bölgesinde oluşan progresif fibrozis ise, kanın bu daha düşük dirence sahip bölgelere redistrübisyonuna neden olacak bir biçimde vasküler dışa akımı kısmi olarak obstrükte edebilmektedir. İlerlemiş sirozda, hepatik kan desteğinin çoğunluğu bu hızlı vasküler kanallar yoluyla karaciğerden geçiyor gibi görünmektedir (70). Bu bulguların farelerde de desteklendiği gibi, insanlarda işaretlenmiş eritrosit ortalama transit zamanı sirozu olmayan hastalarda 19,9±3,7 saniyeden sirozlu hastalarda 12,2±4,4 saniyeye düşmektedir (71). Bu durum ise sirotik karaciğerde, karaciğer parankiminin bütününde göreceli düşük olan perfüzyon durumunda "hızlı" sinüzoidlerde gözlenen artmış kan akımının varlığını açıklayabilir. İlginç olarak, sirotik nodüllerin içerisindeki sinüzodler normal yapılarının çoğunu kazanmakla beraber uygun biçimde perfüze olmamaktadırlar.

D-Anjiyogenez, arteriyal ve venöz değişiklikler: Yeni kan damarlarının oluşumu olan anjiyogenez, kronik karaciğer hastalığında kilit bir olaydır (72). Genel olarak anjiyogenezin kilit uyaranı, doku hücrelerinde hipoksi ile indüklenebilir transkripsiyon faktörlerini (HIF) indükleyen hipoksidir (73). Nitrik oksit (NO) üretimi ise vasküler tonusun gevşemesiyle vazodilatasyonu tetiklemekte vasküler endotelyal büyüme faktörü ise (VEGF) vasküler permeabiliteyi arttırmaktadır (74). Böylece vasküler tomurcuklanmanın ilk adımı

olan vasküler yapının gevşemesi meydana gelmektedir. Bu durum, endotelyal hücre proliferasyonu açısından yolu temizleyen matriks metalloproteinazlarının hareketiyle sonucu ekstraselüler matriksin enzimatik remodelingi ile birlikte meydana gelmektedir. Bu tür bir proliferasyon ise endotelyal hücreler, stellat hücreler, hepatositler, Kupffer hücreleri ve de infiltre eden inflamatuar hücreler tarafından sekrete edilen büyüme faktörlerine cevap olarak meydana gelmektedir. Bu büyüme faktörlerinden en çok çalışılmış olanıysa VEGF'dir (75). Endotelyal hücreler santral lümenli tübüler yapıların oluşumu ile birlikte düzenli bir tarzda prolifere olmaktadırlar. Damarların üç boyutlu ağ yapılarının oluşumlarının sağlanması ise, dallanmayı, perisitlerin dahil olmalarıyla birlikte henüz olgunlaşmamış damarların stabilizasyonlarını ve de yapısal stabilizasyonu sağlayacak olan ekstraselüler matriksin ve bazal membranların birikimlerini belirleyen sinyalizasyon yolaklarının arasında bulunan karışık karşılıklı etkileşimler sayesinde meydana gelmektedir (76).

Karaciğerde anjiyogenez açısından spesifik mekanizmalar belirginleşmektedirler. Karaciğer rejenerasyonu sırasında yeni fonksiyonel sinüzoidlerin oluşumlarına yol açan fizyolojik hepatik anjiyogenez ortaya çıkmaktadır (72,77). Kronik inflamatuar karaciğer hastalığında, fibrozis ve inflamasyon ile birlikte parankimal dokuya kan ve oksijen bozuk biçimde taşınmakta, böylece de dokunun hipokside kalması sağlanmaktadır. HIF'ların indüksiyonları ile anjiyogenez ve yeni damar oluşumları başlamaktadır (78). İnflamasyonun kendisi nonhipoksik tarzda VEGF'yi de içeren anjiyogenik faktörlerin sekresyonuna ve yeni vasküler yapıların oluşumlarına yol açacak bir biçimde hepatositlerde, Kupffer hücrelerinde, stellat hücrelerde, endotelyal hücrelerde ve infiltre eden lökositlerde HIF-1 ekspresyonuna neden olabilmektedir (79).

Sonuçlar dramatik olabilmektedir. İnflame portal yolaklar görünür kapiller sistemler geliştirebilirler (78,80). Hepatik arteryal sisteme ait anjiyogenez ise, özellikle de portal venüllerin trombotik oklüzyonları da varsa kısmen ön plana çıkabilmekle birlikte hem doku tamirine olanak sağlayabilmesi açısından yararlıdır, hem de arterden zengin bir doku olarak hepatoselüler karsinomaya progresyon göstermesi açısından da bir risk faktörü olarak zararlı olabilmektedir (81). Yeni damarlar ise, peribiliyer vasküler pleksusu da içeren kronik inflamasyona uğramış portal yolaklardaki vasküler yapıların sayılarında bir artış gösterecek biçimde matürasyon gösterebilmektedirler (82-84). İnsan sirozunda, arteriyolar dallanmalar ve portal venüller arasında direkt bağlantılar ortaya çıkmaktadır (85,86). Bunlar gross anatomik seviyede değil de, daha çok vasküler sistemdeki göreceli olarak küçük olan dallanma seviyelerinde gösterilmektedir (86).

Özel etkiye sahip olan durum ise, portal yolakları terminal hepatik venlere bağlayan vaskülarize fibröz septanın gelişimidir (87). İnsan sirozunda, rejeneratif nodüllerin etrafında hem arteryal hem de venöz kökenli kanallardan oluşmuş vasküler pleksuslar öne çıkmaktadırlar. Bu değişimlerin asıl fizyolojik sonucu, portal hipertansiyon gelişimi ile ilişkili olacak bir biçimde portal venöz sistemlere hepatik arteryal basınçların geçiş yapabileceğidir (88). Afferent kan, hepatoselüler parankim hacmini neredeyse kan desteğinden mahrum bırakacak bir biçimde vaskülarize septa içerisinden şantlanmaktadır.

E-Zonasyon (bölgeleşme): Hasarlı karaciğerde bir diğer fizyolojik değişiklik hepatoselüler metabolizmadaki zonal (bölgesel) dağılımda olan değişikliklerdir (89). Normal karaciğerde, perivenüler bölgede gözlenen enzim dağılımına ait paternlerden farklılık gösteren periportal bölgedeki hepatositler ile birlikte hepatoselüler metabolizmada da bir heterojenite vardır (90). Deneysel çalışmalarda, karaciğer fibrozisiyle indüklenen karaciğer vasküler yapısında ve hepatosit mikro çevresinde ortaya çıkan değişikliklerin, gerçekten de hepatik parankimdeki metabolik organizasyon değişiklikleriyle sonuçlandığı gösterilmiştir (89,91-95). Sirotik karaciğerde, parankimal nodüllerin metabolik zonasyonlarında son derece derin değişiklikler var gibi görünmektedir. Mutlak metabolik fonksiyon kaybı ise ortaya çıkıyor gibi gözükmemektedir. Gerçekten de, nodüllerde ya da fibröz septa içerisinde sıkışmış olan hepatositler, enzimatik aktivitelerinin çoğunu korumakta ve de protein sentezi açısından da kapasitelerini idame ettirmektedirler (örn. albumin) (96). Bu bulgularla birlikte, ilerlemiş karaciğer hastalığının karakteristiği olan karaciğer fonksiyon bozukluğunun ise, rezidüal hücrelere ait metabolik aktivitede tümüyle belirgin bir azalma nedeniyle oluşmadığı öne sürülmektedir (97). Daha çok bunun, vasküler yapıdaki değişikliklerle ve de hepatositler ve kan arasındaki solubl maddelerdeki bozuk değiş tokuşlarla ve nihayet hepatosit kitlesindeki mutlak bir kaybın varlığıyla ilişkisi var gibi gözükmektedir.

Siroz

Siroz, anatomik olarak parankimi nodüllere bölen karaciğer içerisinde fibröz bir septa varlığının olması olarak tanımlanmaktadır. Gerekli elemanlar olan fibröz septa ve yapısal bozukluğun her birisi, minimalden şiddetliye dek uzanan bir spektrum içerisinde ortaya çıkmaktadır. Tanım açısından öneme sahip birçok özellik vardır. Birincisi, tümüyle karaciğer parankimal yapısı birbirine bağlı fibröz skarlarla yarılmıştır. Lokalize hepatik skarlaşma ise fibrozis oluşturmamaktadır. İkincisi, bu fibröz skarlar, portal yolakları ve sentrilobüler

terminal hepatik venleri portal-portal, portal-santral ve/veya santral-santral bir paternde bağlayan ince bandlar şeklinde ya da multipl komşu lobülleri oblitere eden geniş fibröz traktuslar şeklinde ortaya çıkabilmektedirler. Üçüncüsü ise, parankimal nodüller, hepatik parankime ait adacıkların fibrotik izolasyonları ile oluşturulmaktadırlar. Bu nodüller, mikronodüllerden (3 mm çapından az) makronodüllere (3 mm den fazla çeşitli çaplarda) kadar bir değişkenlik gösterebilirler (97).

Bazı nitelendirici tanımlar mevcuttur. Birincisi, karaciğer parankiminin fibröz izole adacıklara bölünmesi teşhis açısından gerekliyken bu adacıkların rejenerasyonu gerekli değildir. Dolayısıyla, birçok ay sonunda hızlı gelişen fibrozis ile birlikte, bu adacıkların sferik nodüllere devamlı biçimde rejenerasyonlarla genişlemeleri açısından yetersiz bir süre olsa dahi hala sirotik bir organ meydana getirilebilmektedir. İkincisi, portal yolaktan terminal hepatik vene kadar olan parankimal uzaklık ise 0,8 ila 1,5 mm arasındadır, dolayısıyla lobüler seviyedeki bir skarlaşma ile mm lik bir skala üzerinde bir nodülarite oluşumu meydana getirilebilmektedir. Bununla birlikte rejenerasyon açısından karaciğer kapasitesi devasal boyutlardadır ve daha yavaş gelişen bir fibrozis karşısında parankimal rejenerasyon ile birlikte çeşitli cm çaplarında nodüller de ortaya çıkarılabilmektedir. Üçüncüsü ise, parankimal adacıklar basit poligonlar ya da küreler şeklinde olmak zorunda değillerdir. Portal yolak temelli fibrozis sayesinde çok daha kalburlaşmış ve düzensiz bir sirotik karaciğer varlığı ortaya çıkabilir (98).

Siroz açısından bu tanımın kalitatif (niteliksel) doğası nedeniyle teşhis, keyfi (ihtiyari) sınırlara bağlı olarak konulmaktadır. Özellikle, kronik hepatitli ve fibröz skarlı bir karaciğerin hangi noktada sirotik hale geldiği keyfi olarak tanımlanmaktadır ve perkütan iğne biyopsisi ile de kolayca ortaya konamamaktadır (ki karaciğer kitlesinin 1:10000'inden azını yansıtmaktadır (98). Daha da ötesi, sirotik karaciğerler, fibröz septanın az, oldukça fazla, ince ya da geniş olması ile ve çeşitli boyut ve konturlarda ya da uniform halde nodüllerinin olması ile birlikte değişken bir şiddet spektrumuna sahiptirler. Neyse ki, perkütan karaciğer biyopsisinde elde edilen anormal bulguların tüm karaciğeri temsil edip etmediği klinik veriler sayesinde doğrulanabilir. Destekleyici klinik veriler fizik muayeneden (örn; asit, kaput medusa, spider angiom, jinekomasti) ve görüntüleme çalışmalarından ya da organın intraoperatif vizüalizasyonundan elde edilen izlenimlerden oluşmaktadır. Albumin, pıhtılaşma faktörleri, üre, alkalin fosfataz, aminotransferazlar ve bilirübin serum seviyeleri gibi laboratuar verilerindeki anormallikler, minimal hepatik hasarın olduğu sessiz bir siroza sahip olan ve de henüz hepatik yetmezlik geliştirmemiş bir hastada saptanmayabilir. Bunun tersine, masif

hepatik nekrozlu ve hepatik yetmezlikli bir hastada yukarıda sayılan parametrelerde mevcut anormalliklerin var olmasına karşın bu hasta sirotik olmayabilir. Dolayısıyla, laboratuar verileri bir siroz tanısını tek başına koydurmaz. Bazen, perkütan iğne biyopsisinde karaciğere ait ciddi bir fokal hasar histolojik olarak sirozdan ayırt edilemeyen değişiklikler ile sonuçlanabilir, bu fokal değişim ise gerçek bir siroz lehine düşünülmemelidir. Bu sorunun ortaya çıkması halinde, fibrotik bir sürecin fokal ya da diffüz olduğunun saptanması açısından klinik değerlendirmeden elde edilen ayrıntılı bilgiler ve karaciğerin genel durumu açısından elde edilen görüntüleme çalışmaları ya da karaciğerin herhangi başka bir yerinden alınan bir biyopsi oldukça önemlidir (98).

Karaciğer sirozu kelimenin tam anlamıyla hepatik skarlaşmanın son evresi anlamına gelmemektedir. Bu daha çok, bir taraftan progresif parankimal fibrozisin bir taraftan da vasküler yapı ve normal lobüler yapıda bozulmanın baskın halde olduğu dinamik, bifazik bir süreçtir. Siroz oluşturulması açısından kombinasyon gösteren üç ana mekanizma ise hücre ölümünden, aberran ekstraselüler matriks birikiminden (fibrozis) ve vasküler reorganizasyondan oluşmaktadır. Sirotik süreç genellikle hepatoselüler ölüm ile başlangıç göstermekle birlikte ancak bundan sonra uzun bir sürede bunun tutarlı ve sürekli bir biçimde devam etmesi halinde ortaya çıkmaktadır. Hücre ölümü herhangi bir karaciğer hasarında da ortaya çıkabilmekle birlikte bu durum siroz tanımına uymamaktadır. Örneğin, akut bir parasetamol (asetaminofen) aşırı dozu ciddi hepatik nekroza sebep olmakta ve hastayı öldürebilmektedir fakat yaşayanlarda kronik karaciğer hasarına sebep olmamaktadır. Bunun tersine, tek başına az miktarlarda hepatik parankimal hasardan daha fazla bir sorun yaratmayan küçük dozlarda alkol ise, uzun yıllar boyunca günlük olarak tüketildiğinde siroz oluşturabilme kapasitesine sahiptir. Hücre ölümü, fibrosiz ve vasküler trombozisle seyreden bu üç sürecin ortak neticesi parankimal tükenmedir (98).

A-Parankimal tükenme: Parankimal tükenme, şekilli hepatositlerde fokal bir kaybın olması anlamına gelmektedir. Tükenmeye ait lezyonlar bir asinüsün küçük bir kısmını kapsayabileceği gibi bir ya da daha fazla komşu asinusu ya da bir lobu tamamen dahi kapsayabilmektedir. Komşu hücre kaybı, venlerin ya da sinüzoidlerin obstrüksiyonundan kaynaklanan fokal iskeminin bir sonucudur. Tükenme lezyonlarının boyutları obstrükte damar boyutlarına bağlıdır. Küçük tükenme bölgeleri çoğunlukla bir adezyon olarak tanımlanan hepatik venlerin ve portal yolakların birbirlerine yakınlaşmaları şeklinde kolayca fark edilmektedirler. Parankimal tükenme kavramı önemlidir çünkü bu bize şunları

göstermektedir: i) parankimal tükenme direkt olarak başlangıçta hepatoselüler hasar nedeniyle ortaya çıkmamaktadır ancak lokal damarların masum hasarları nedeniyle oluşmuş bir fenomendir; ii) her parankimal tükenme lezyonunun kendine has doğal bir öyküsü mevcuttur ve erken ya da geç iyileşme evrelerinde bulunabilmektedirler; iii) karaciğer içerisinde oldukça fazla sayıda bağımsız ve birbirinden ayrı parankimal tükenme lezyonlarının birikmeleri sayesinde siroz ortaya çıkmaktadır; ve iv) oluşan sirozun şekli büyük ölçüde vasküler hasar dağılımı ile saptanmaktadır. Önemli olarak belirtilmesi gerekenlerden birisi de, sirozun ortaya çıkmasının uzun bir süre sonrasında da, sınırda fonksiyonel bir karaciğerin hayatı sürdürmeye yetersiz bir organa yavaşça dönmesine yol açacak bir biçimde parankimal tükenme varlığı devam edebilmektedir. Vasküler obstrüksiyonun patogenezi ise damarların boyutlarına bağlıdır. Çoğu küçük damar obliterasyonu, lokal inflamasyona sekonder ortaya çıkmaktadır (99,100). Tromboz her ne kadar tüm damar boyutları açısından da önemli olsa dahi, daha özel olarak orta ve büyük damar blokajlarına ait bir durumdur. Çoğu parankimal hasar 100 μm'den daha büyük damarlarda blokajların olmasıyla birlikte ortaya çıkmaktadır. Çünkü komşu sinüzoidal kollateral akım böyle büyük boyutta tıkanmayı kompanse edemez.

B-Fibrozis/sirozun geriye dönebilmesi: Her ne kadar geleneksel olarak siroz çoğu kronik karaciğer hastalığının gelişiminde son evre olarak görülse de, son yıllarda sirozun geriye dönüşünün doğruluğu konusundaki yayınlarda bir artış mevcuttur (87). Hasara ilişkin süreçlerin sonlanmasıyla birlikte sirozda geriye dönüş olabileceğini bildiren birçok klinik rapor mevcuttur (101-104). Bunlar başlangıçta tam bir siroz tablosu olan, başarılı bir tedaviden sonra karaciğer biopsisinde inkomplet septal siroz yada fibrozisin belirgin bir şekilde azaldığı herediter hemokromatozlu (105,106), otoimmün hepatitli (107) ve Wilson'lu (108) hastalardır. Fibrozisde bir azalmanın varlığı, aynı zamanda primer biliyer sirozda (109), şistozomiazis (110) ve ekstrahepatik biliyer obstrüksiyonda (111) da tespit edilmiştir. Son yıllarda özel bir ilgiye sahip olan bir durum ise hepatit C'li hastalarda fibrozisde ve sirozda regresyonun olmasıdır (112). Belirgin regresyonun elde edilmesi yıllar sürebilmektedir ve bu süre de karaciğer hastalığının altta yatan sebebine ve de ciddiyetine bağlıdır (113). Fibrozis rezolüsyonundaki ana mekanizma matriks metalloproteinazlarının aktiviteleri ile birlikte artmış olan kollajenolitik aktiviteye eşlik eden azalmış doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMP-1) ekspresyonudur. Aktive stellat hücrelerinin apopitozları da aynı zamanda fibrozis rezolüsyonunu kolaylaştırmaktadır (114). Apoptoz ise aktive stellat hücrelerindeki ölüm

reseptörlerinin stimülasyonu ve yaşamsal faktörlerde bir azalma ile beraber kolaylaştırılmaktadır.

Bununla birlikte, fibroz doku septasının önemli derecede rezorpsiyonunun olmasına rağmen, hepatik yapının normal bir duruma restorasyonu ortaya çıkmamaktadır. Daha çok bu durum, ne kadar ekstraselüler matriksin kalacağına, nerede inkomplet septal fibrozun mevcut olacağına, dolayısıyla hem parankimde hem de portal yolaklardaki fibröz dokuların hangisinde inkomplet fibröz doku rezorpsiyonunun olacağına bağlı bir durumdur. Alternatif olarak, parankimden fibröz dokunun komplet rezorpsiyonunun olması ancak ön planda portal yolak fibrozunun kalması ile birlikte hepatoportal skleroz ortaya çıkmaktadır. Parankimin iyi vaskülarize bölgelerinde hipertrofinin meydana gelmesi nedeniyle tüm fibröz dokunun rezorbe olması durumunda parankimin düzensiz vasküler desteğinin devam etmesiyle beraber, nodüler rejeneratif hiperplazi ortaya çıkmaktadır.

D-DİMER

D-dimer (DD), koagülasyon sisteminin herhangi bir nedenle aktivasyonu ile çapraz bağlarla oluşan fibrin pıhtısının plazmin tarafından yıkılması sonucu oluşur (115). Fibrinojen, 3 çift polipeptid zincirinden (Aα, Bβ ve 2γ zinciri) oluşmakta ve ortalama olarak 340,000 Da ağırlığındadır. Dış uçları Bβ ve 2γ zincirlerinin karboksi terminal uçlarından oluşup, D domain olarak adlandırılmaktadır. Sentral bölge ise E domain olarak adlandırılmaktadır. Aα ve Bβ zincir çiftlerinin amino terminal bölgelerinde 16 ve 14 aminoasidlerden oluşan fibrinopeptid A ve B (ikişer fibrinopeptid) kısımları bulunmaktadır. Fibrinojen akut faz reaktanı olup travma, hamilelik, doku inflamasyonu gibi fizyolojik doku stres durumlarında üretimi 10 katına kadar çıkmaktadır. Koagülasyon sisteminin bir şekilde aktivasyonu sonucu aktive olan trombin, fibrinojenin fibrine dönüşümünü sağlamaktadır.

Oluşan fibrin plağı daha sonra plazmin tarafından parçalanır. Bu yıkım sonucu fibrin yıkım ürünleri oluşur. Bu işlem plasminojenin pıhtıya absorbe olmasıyla başlayıp, plazmine dönüşüm ile devam eder. Plazmin özellikle fibrinin lizin içeren karboksi terminal kısmına bağlanarak, fibrini yıkmaya başlar. Fibrin polimerleri öncelikle plazmin tarafından daha büyük olan parçalara ayrılır (fragment X ve Y). Daha sonra daha küçük parçalar olan E ve DD oluşur. DD yaklaşık olarak 180 000 MW ağırlığında olup karaciğer, böbrek ve retiküloendotelyal sistem tarafından plazmadan uzaklaştırılır. Plazma DD düzeyi yaşa ve cinsiyete göre değişmekte olup normal değeri 200-500 ng/ml dir ve bazı durumlarda artış gösterir (Tablo-2).

Tablo 2. D-dimerin arttığı durumlar

Patolojik olmayan	**Patolojik**
Yaş (özellikle>65)	Arteryel-venöz tromboemboli
Irk (siyah ırkta)	Yaygın damariçi koagülopati
Sigara içenler	Malignite
Hamilelik	Enfeksiyon
Hematom	Orak hücreli anemi
Operasyon veya travma	Abruptio plasenta, preeklempsi ve eklempsi, intrauterin fetal ölüm
	Atrial fibrilasyon
	Renal ve karaciğer yetmezlikleri

Plazma DD düzeyi çeşitli yöntemlerle ölçülür. Bu yöntemlerin ortak noktası DD fragmentleri üzerindeki epitoplara karşı monoklonal antikorların kullanılmasıdır (116). Fibrinin yıkımı sırasında değişik boyutlarda fibrin yıkım ürünleri oluştuğu için ve değişik moleküler ağırlıktaki yıkım ürünlerine karşı kullanılan DD monoklonal antikorların reaktiviteside farklı olması nedeniyle, aynı kişide aynı zamanda değişik kitlerle farklı sonuçlar alınır. Genel olarak günümüzde 3 yöntemle kalitatif ve kantitatif olarak kandaki D-dimer düzeyi saptanmaktadır. Bu yöntemler enzyme immunoassay (ELİSA), lateks aglütinasyon ve tam kan aglütinasyon yöntemleridir, testin sensitivite ve spesifitesi kullanılan yönteme göre değiştiğinden, bir yöntemi diğeri ile karşılaştırmamak gerekir. En duyarlı yöntem ELİSA yöntemi olup, spesifitesi düşüktür. ELİSA yönteminin en önemli dezavantajı pahalı ve zaman alıcı bir yöntem olmasıdır. Ancak son yıllarda çıkarılan hızlı ELİSA kitleri ile zaman problemi ortadan kalkmıştır. Lateks aglütinasyon yöntemi ile daha kısa zamanda yapılması, özel teknik gerekmemesi ve ucuz olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir (117). Bu kitlerin sensitiviteleri ortalama %95 ve spesifiteleri de %50 dir. Diğer bir yöntem ise tam kan aglütinasyonuna dayanan SimpliRED D-dimer® (SimpliRED D-dimer, Agen Biomedical, Brisbane, Avustralya) ve immünokromatografi yönteme dayanan Clearview Simplify D-dimer testleridir (118). Bu testin en önemli avantajı hasta başında parmak ucundan alınan bir damla tam kan ile yapılabilmesi ve sonucu ortalama 2 dakika içinde vermesidir. Sensivitesi %85 ve spesifitesi %70'dir. DD klinikte en sık olarak venöz tromboemboli ve yaygın damariçi koagülopati tanısı ve takibinde kullanılır.

HİDROKSİPROLİN

Kollagen, doğada bulunan fibriler proteinler arasında önemli yer tutmaktadır. Derinin ana bileşeni olan kollagen, toplam vücut proteinlerinin yaklaşık 1/3'ünü oluşturmakta ve deriye mukavemet ve yüksek gerilme gücü vermektedir. Kollagende glisin, alanin, prolin ve hidroksiprolin gibi birçok aminoasit türü bulunmaktadır. Bu aminoasitlerin içinde hidroksiprolin aminoasiti yanlızca kollagende bulunur. Bu nedenle hidroksiprolin kollagen ile ilgili çalışmalarda önemli rol oynamaktadır. Kollagenin aminoasid bileşimi, globüler yapıdaki bir proteinin aminoasit bileşiminden önemli farklılıklar göstermektedir. Yüksek oranda glisin (%33) içeren kollagenin yapısında; %12 prolin ile aminoasit türevleri olan hidroksiprolin (%10) ve hidroksilizin (%1) bulunmaktadır (119). Temel kollagen molekülü, α zincir adı verilen ve her biri yaklaşık 1000 aminoasid içeren 3 adet polipeptit zincirinden oluşmaktadır. Kollagen prolin, hidroksiprolin, lizin ve glisin gibi birçok aminoasiti yapısında bulundurur. Kollagende yer alan aminoasitlerden; her üç aminoasitden biri glisin, her beş aminoasitten biri prolin veya hidroksiprolin aminoasiti olmalı ve yapı üçlü heliks veya süper heliks durumunda olmalıdır.

Sonuç olarak hidroksiprolin kollajenin yapıtaşlarından biridir ve doku kollajen birikiminin belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilen bir parametredir.

ALFA DÜZ KAS AKTİN (α-SMA)

Normal ve hastalıklı insan karaciğeri İto hücrelerinde sinuzoid ve perisinuzoidal yapının gelişimi ile bağlantılı olarak alfa düz kas aktin (α-SMA) immunoreaktivitesi araştırılmış ve hepatik stellat hücre (HSH) (ito hücreleri) tanımlamak için α-SMA ile immunohistokimyasal çalışmalar yapılmıştır. Normal yetişkin karaciğerinde ince sitoplazmik oluşumları olan perisinuzoidal hücreler yanında vasküler düz kas hücreleri ve perisitler de α-SMA için pozitiftirler. Perisinuzoidal hücreler, sinuzoidal duvar boyunca dağınık ve ayrı ayrı tabakalar oluşturmuşlardır. İmmunoelektron mikroskobu, α-SMA pozitif perisinuzoidal hücrelerin, yağ damlacıkları içeren İto hücreleri olduklarını göstermiştir (120-122). Yeni izole edilmiş İto hücrelerinin kültürde geçen süre zarfında desmin ve α-SMA ekspresyonu artmıştır. Daha uzun süre kültürde korunan Ito hücreleri, yağ damlacıklarını kaybetmekte fakat desmin ve α-SMA pozitif olarak kalmaktadırlar. In vitro ve olasılıkla in vivo aktif hale gelmiş karaciğer yıldızsı hücrelerdeki α-SMA gen ekspresyonunda meydana gelen artış, hücre proliferasyonu ile ilgili görünmektedir. α-SMA, bölünen HSH'lara işaret eden yeni bir

gösterge olabilir. α-SMA gen ekspresyonunun, in vitro hücre proliferasyonu esnasında artmış olması HSH'ın düz kas hücrelerinden ayırt edilmesini sağlayacaktır (122).

Kronik karaciğer hastalığında α-SMA pozitif HSH'lar, sayı, büyüklük ve özellikle nekroz alanlarında immün boyanma yoğunluğunda artma gösterirler. Kesintisiz bir hücresel ağ formu yaparlar. Bu hücreler, düzensiz uzamış sitoplazmik oluşumlar, mikrofılaman miktarının artması ve karakteristik yağ damlacıklarının kaybı ile beraber, şekil olarak dentritikleşmişlerdir. Böylece bunların ince yapı özellikleri miyofibroblastik hücreler ile uyumludur (121,123). Bu sonuçlar göstermiştir ki; anti- α-SMA antikoru kullanılan immünohistokimya, yetişkin insan karaciğerinde normal ve dönüşmüş HSH hücrelerinin tanımlanması için güvenli ve duyarlı bir metoddur (121,123).

TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖR BETA (TGF-β)

Karaciğer fibrozisi özellikle tip 1 kollajen olmak üzere üzere asırı düzeyde ECM bileşenlerinin üretimi ve depolanmasıyla karakterizedir. HSH'lar karaciğer fibrozisi sırasında skar dokusunun aşırı üretiminden sorumludur (124). Stellat hücreler tarafından ECM üretilmesi için dominant uyaran transforme edici büyüme faktörü (TGF-β)'dır (125). TGF-β deneysel oluşturulan fibrozis ve insan hepatik fibrozisinde artar. Bunun birçok kaynağı vardır ama en önemlisi otokrin ekspresyonudur (126). Sitokinler profibrojenik ya da antifibrojenik olarak nitelendirilmiştir. TGF-β genel olarak profibrojenik olarak kabul edilir, çünkü TGF-β doğrudan endotel hücreler ve HSH'ın ECM üretimini uyarır ve fibrozise sebep olur ve hücresel immün cevabı baskılar (127). TGF-β'nın oluşumu fibrozis hasarında HSH'ın sitokin üretimini arttırmasıyla uygunluk gösterir (128).

FİBRİNOJEN

Fibrinojen disülfid bağlarıyla bağlı üç çift peptid zincirli glikoproteindir. Zincirler Aa, Bb ve g olarak adlandırılırlar. Normalde plazmada bu zincirler heterojen olarak bulunur. Fonksiyonel farklılıkları yoktur. Fibrinojenden trombin etkisiyle Fibrinopeptid A ve Fibrinopeptid B çıkınca a, b ve g zincirleri içeren fibrin monomerleri oluşur. Fibrinojen karaciğer parankimal hücrelerinde ve daha az olarak megakaryositlerde sentezlenir, %10-15'i ekstravaskülerdir. Plazma dışında plateletlerde de fibrinojen bulunur. İn vitro olarak pürifiye fibrinojen trombinle muamele edilirse, mekanik olarak zayıf, asit ve üreye dayanıksız fibrin pıhtısı oluşur (129). Pıhtılaşma kaskadının son basamağında oluşan fibrinojen bir tromboz

belirtecidir. Hepatik fibrozisde vasküler trombotik değişimlere sekonder siroz gelişimi olması dolayısıyla immünhistokimyasal olarak karaciğer dokusunda trombozu gösterir (130).

KARACİĞER FİBROZİSİNİN TEDAVİSİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Karaciğer fibrozisinde rol oynayan mekanizmalar daha iyi anlaşıldıkça antifibrotik tedavi seçenekleri geliştirilmesi için olanaklar artmaktadır. Bununla birlikte antifibrotik tedavi konusu halen önemli bir araştırma konusudur ve henüz insanlar için onaylanmış bir antifibrotik ilaç mevcut değildir. Tedavi yöntemleri uzun yıllar kullanımlarında dahi iyi tolere edilebilir olmalı, mümkün olduğu kadar karaciğere spesifik olmalı ve karaciğer ile karaciğer dışı dokulara yan etkisi en az olmalıdır. Tedaviye aday yöntemlerin antifibrotik etkileri ve etki mekanizmaları hayvan modellerinde açıkca gösterilmelidir. Yalnızca hasar oluşumunu engellemekle kalmayıp, daha önceden hasarlanmış olan karaciğere de etkili olmaktadır (131). Tedavi stratejileri, HSH'lar merkez alınarak şu başlıklar altında sıralanabilir;

1-Primer hastalığı tedavisi veya hasarın önlenmesi

2-HSH aktivasyonunu engellemek için inflamasyonun ve konak yanıtının baskılanması

3-HSH'lerin proliferatif, fibrinojenik veya proinflamatuar fonksiyonlarının bloke edilmesi

4-Matriks proteazların aktive edilmesi veya onların inhibitörlerinin bloke edilmesi ile ECM degradasyonu

Karaciğer fibrozisinin en etkin tedavisi, karaciğer hastalığının primer sebebinin ortadan kaldırılmasıdır. Alkolik karaciğer hastalığında alkol alımının kesilmesi, hemokromatozis ve Wilson hastalıklarında asırı demir ve bakırın uzaklastırılması, kronik viral hepatitlerde HBV ve HCV'nin eradikasyonu, şistozomiyazis enfestasyonunda parazitin temizlenmesi, safra yolu mekanik tıkanıklıklarında cerrahi tedavi gibi yöntemler buna örnektir. Daha basit olarak NASH'lı hastalarda kilo verilmesi ile bile histolojik olarak düzelme sağlanabilir (131,132). Karaciğer fibrozisinin tedavisi ile ilgili olarak daha önce antifibrotik özellikleri araştırılmış olan bazı ajanlar gösterilmistir (Tablo-3) (131,133). İnflamasyonun ve immün yanıtların baskılanması ile fibrozisin azaldığı birçok yayında gösterilmistir. Kortikosteroidlerin özellikle otoimmün hepatitli hastalardaki etkileri buna örnek olarak verilebilir (134). Pegile interferon ve ribavirin ile HCV' li hastaların başarılı tedavisi sonrasında fibrozisin azaldığı bildirilmiştir (135). Bununla birlikte safra kanalı bağlanarak oluşturulan deneysel fibrozis modelinde interferon-α'nın fibrozisi azalttığı da gösterilmiştir. Bu nedenle interferon-α' nın direkt antifibrotik etkisi olduğu belirtilmektedir (136). Renin-anjiotensin sistemi'de oksidan strese yol açmak suretiyle inflamasyonun

artmasına katkıda bulunabilirler. Bu yüzden Anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri ve Anjiotensin reseptör blokerler (ARB) bu yolla antiinflamatuvar ve antifibrotik etki gösteriyor olabilirler (137,138). Pentoksifilin, tümör nekroz faktör- alfa (TNF-α) antagonistleri gibi ajanlar TNF-α aracılı inflamasyonu baskılamakta ve antifibrotik etki göstermektedirler (139). Ursodeoksikolik asit, primer biliyer siroz da muhtemelen antiinflamatuvar etkileri nedeniyle faydalı etkileri nedeniyle kullanılan diğer bir antifibrotik ajandır (140). Çeşitli antioksidanlarla yapılan çalışmalar sonucunda görülmüştür ki, HSH aktivasyonunun önlenmesinde en etkili yaklaşımlardan biri de oksidatif stresin azaltılmasıdır (141,142). İnterferon-γ hayvan modellerinde HSH aktivasyonunu engellediği gösterilmiş olan bir sitokin olmakla birlikte, klinik bir çalışmada beklenen antifibrotik etkiyi gösterememiştir (143). Peroksizom proliferatör aktivatör reseptör gamma nükleer reseptörleri (PPAR-γ), HSH'ler tarafından eksprese edilmektedir ve PPAR-γ reseptörlerine bağlanan ilaçların (tiazolidinedionlar) HSH aktivasyonunu engellediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (144,145). Adiponektin leptinin doğal kontra-regülatuvarı olup özellikle NASH'lı hastalarda olmak üzere, antifibrotik olarak faydalı olabileceği belirtilmektedir (146). Hepatik stellat hücre fonksiyonlarının bloke edilmesi, fibrozisin önlenmesinde başvurulacak önemli stratejilerden bir diğeridir. Son yıllarda büyüme faktörlerinin etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılması büyük faydalar sağlamıştır. Özellikle trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), TGF-β gibi proliferatif sitokinlerin çoğu tirozin kinaz reseptörleri aracılığı ile etki etmektedir. Bu reseptörleri bloke eden tirozin kinaz inhibitörlerinden biri olan imatinib kemoterapi ilacı olarak lösemi ve çeşitli mezenkimal kanserlerin tedavisinde kullanılmakla birlikte özellikle karaciğer fibrozisini azalttığı gösterilmiştir (147). Ek olarak γ-linoleik asit, lipooksijenaz inhibitörleri, PPAR-γ agonistleri, Hidroksi metil glutaril koenzim A (HMG CoA) redüktaz inhibitörleri, pentoksifilin ve pirfenidon gibi ajanların da bu reseptörlerin hücre içi sinyal ileti yollarını inhibe ederek karaciğer fibrozisinde etkili olduklarına dair çalışmalar bulunmaktadır (131). Soluble TGF-β reseptörleri, rekombinant Smad7 gibi TGF-β antagonistleri, TGF-β ile uyarılan ECM üretimini engelleyerek fibrozisi azaltabilmektedir (148). Antikoksidan bir bileşik olan halofuginon da kollajen ekspresyonunu inhibe eden ve antifibrotik aktivitesi olan diğer bir ajandır (149). Endotelin, HSH'lerin kontraktilite ve kan akımının azalması gibi etkilerinde önemli bir düzenleyicidir. Bosentan isimli endotelin reseptör antagonistinin deneysel modelde HSH aktivasyonunu ve fibrozisi azalttığı gösterilmiştir (150). Gliotoksin gibi HSH apoptozisini uyaran ajanların karaciğer fibrozisini azalttığı bildirilmiştir (151).

Son olarak daha önce de belirtiği gibi matriks metallo proteinaz (MMP) aktivitesinin artırılması ve doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMP) aktivitesinin baskılanması yöntemleri de karaciğer fibrozisinin önlenmesinde etkili yöntemlerdir (133,152).

Tablo-3. Karaciğer fibrozisinin tedavisi için araştırılmış olan ajanlar

Hasarın önlenmesi ve inflamasyonun azaltılması;
1-Viral hepatitler için antiviral tedavi
2-Şistozomiyazis için antihelmintik tedavi
3-Metabolik hastalıkların tedavisi(demir, bakır şelasyon gibi)
4-ARB ler, ACE inhibitörleri, Caspase inhibitörleri
5-HGF
HSH apoptozisini uyaranlar;
1-Gliotoksin
2-TIMP antagonistleri
ECM yıkılmasına yol açanlar;
1-TGF-β inhibitörleri
2-Direkt kollajenaz tedavisi
3-Kollajen çapraz bağlarının inhibisyonu veya transglutaminaz inhibitörleri
4-TIMP antagonistleri
HSH aktivasyonun engellenmesi ve aktive HSH lerin fonksiyonlarının inhibe edilmesi;
1-Antiproliferatif ajanlar
2-PDGF reseptör antagonistleri
3-FXR agonistleri
4-Antioksidanlar (sylibin vs.)
5-HMG CoA redüktaz inhibitörleri
6-Plazmin/trombin reseptör antagonistleri
7-PPARγ
8-Endotelin reseptör antagonistleri
9-Nitrik oksid sağlayıcı ajanlar
10-İntegrin
11-TGF-β antagonistleri (soluble reseptörler, nötralize edici antikorlar)
12-Kollajen sentezi ininhibitörleri
13-Pentoksifilin
14-Aldosterone antagonistleri
15-Vitamin E, PDTC
16-Smad 7 agonistleri
17-İnterferon –α

ACE: Anjiotensinojen dönüştürücü enzim**; HGF:** Hepatosit büyüme faktörü**; PDTC:** Pirolidin ditiokarbamat**; TGF-β:** Transforme edici büyüme faktörü β**; PPAR:** Peroxisome prolıferators activated reseptör**; FXR:** Farnesyl x reseptör**; PDGF:** Trombosit kaynaklı büyüme faktörü**; HMG CoA:** 3 hidroksi 3 metil glutaril koenzim A**; NGF:** Sinir büyüme faktörü**; ARB:** Anjiyotensin reseptör blokerleri**; CTGF:** Konnektif doku büyüme faktörü**; Smad 7:** Mothers against DPP homolog 7**; TIMP:** Doku matriks metalloproteinaz inhibitörleri.

ANTİTROMBOTİK TEDAVİ VE DALTEPARİN

Klasik heparin ilk defa 1916 yılında McLean tarafından sığır karaciğerinden elde edilerek tanımlanmıştır. Mast hücre granüllerinde sülfatlanmış glikozaminoglikanların

karışımı şeklinde bulunur. Değişime uğramış D-glukozamin, glukronik asit ve iduronik asit kalıntılarından oluşur. Unfraksiyone heparinler, heterojen uzunlukta polimerler halindedir.

Ticari olarak sığır ve domuzların barsak ya da akciğerlerinden elde edilir. Kimyasal ve biyolojik olarak homojen olmayıp üreticiye ya da aynı üreticide, üretim zamanına göre farklılıklar gösterir. Ortalama 15000 dalton (yaklaşık 45 monosakkarit birimi) ile moleküler ağırlığı 3000-30000 dalton arasındadır. Etkisinin başlaması hızlı olduğundan akut trombotik hastalıkların tedavisinde seçkin antikoagülandır.

Heparinin etkisi direkt olarak akut embolizmi engellemek ya da oluşmuş trombüsü parçalamak değildir. Asıl etkisi trombüs büyümesini engellemektir. Bu etkinin ardından fibrinolitik sistemin trombolitik ve embolik materyalin boyutlarını sınırlayıcı etkisi devreye girer.

Heparinin temelde iki kullanım sahası vardır:

1- Yüksek dozlarda tromboembolizmin tedavisi,

2- Düşük dozlarda tromboembolizmin profilaksisi.

Heparinin antikoagülan etkisi büyük oranda trombinin inaktivasyonuna bağlıdır. Bu antikoagülan aktivite için Antitrombin III (AT-3) olarak adlandırılan plazma kofaktörü gerekir. Heparin bir pentasakkarid sekansı içinde tek bir glikozamin parçası ile AT-3'e bağlanır ve onu aktive eder. Homojen bir molekül olmayan heparinin sadece üçte birinde bu pentasakkarid bulunur. Bu parça antikoagülan etkinin çoğundan sorumludur. Geri kalan üçte ikisi tedavi dozlarında minimal antikoagülan aktiviteye sahiptir. Ancak hem yüksek hem de düşük afiniteli heparin moleküllerinin yüksek konsantrasyonları, heparin kofaktör II olarak adlandırılan plazma proteini üzerinden trombin baskılanmasını katalize ederek antikoagülan etki gösterir (153).

Düşük molekül ağırlıklı heparinler (DMAH) klasik heparinin kimyasal, hidroliz, depolimerizasyon veya oligosakkarid sentez yoluyla elde edilen kısa heparin polimerleridir. Heparinden çok daha homojen, ortalama 4000-5000 molekül ağırlığında ve özgül aktivitededirler.

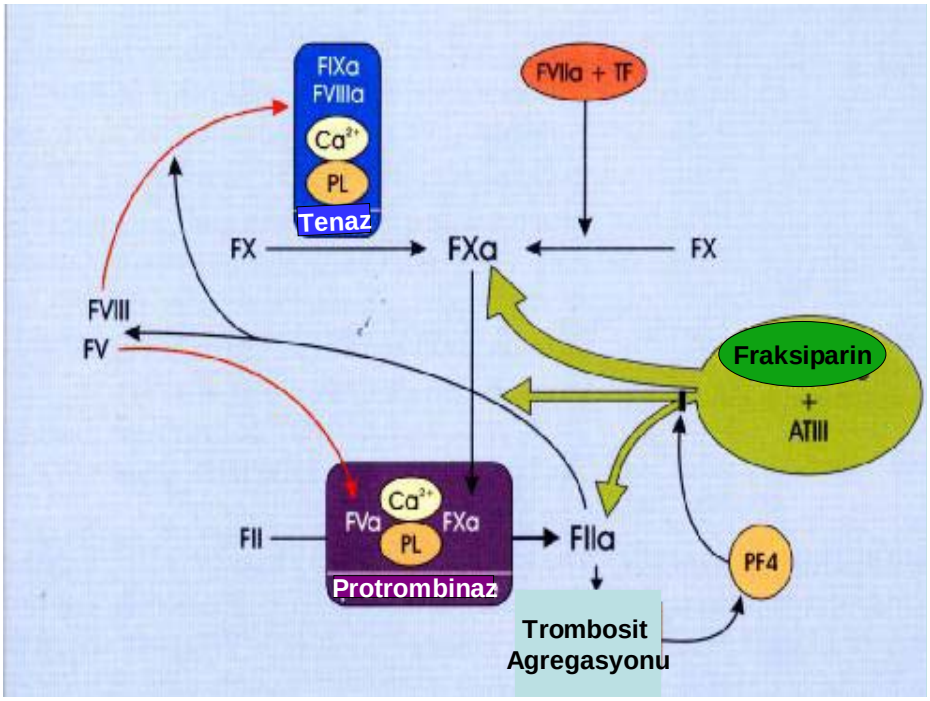
Ticari olarak kullanılan DMAH sıklıkla sığır akciğeri veya domuz gastrointestinal mukozasından elde edilirler. Ticari olarak mevcut preparatlar; ortalama molekül ağırlığı, yıkılım hızları, faktör Xa:IIa inhibisyon oranı, tepe anti Xa aktivitesi ve fiyatları açısından farklılık gösterebilirler.

Düşük moleküler ağırlıklı heparinler antikoagulan etkilerini heparine benzer tarzda, antitrombin III'e bağlanan özgün pentasakkarid yapılarla gösterirler. Trombin (FIIa)

inaktivasyon yeteneği DMAH'da heparine göre daha azdır. Heparinde anti-FXa:IIa oranı 1:1 iken, DMAH da anti-IIa aktivitesi az olduğundan bu oran 2:1, hatta 4:1'dir. DMAH'ler klasik heparine göre trombosit faktör 4'ü daha iyi inhibe ederken, trombosit fonksiyonu ve vasküler permeabiliteye etkileri daha azdır. DMAH'lerin trombosit aracılı FXa inhibisyon etkisi daha fazladır (Şekil 1).

Düşük moleküler ağırlıklı heparin plazma proteinlerine ve endotele az bağlandığından biyoyararlanımı yüksek, yarı ömrü uzun olup, farmakokinetiği tahmin edilebilir. DMAH'ler intravenöz verildiğinde 2-4 saat, ciltaltı verilirse 3-6 saatlik bir yarılanma ömrüne sahiptirler. Uzun yarılanma süresi ve iyi tahmin edilebilen farmakokinetikleri sayesinde DMAH kullanımı son derece pratik olup laboratuar testine gerek duymadan günde bir veya iki kez kullanılabilir. Ancak bazı durumlarda DMAH'e bağlı antikoagülasyonun monitorize edilmesi gerekir ki, bu da anti-FXa aktivitesini ölçmekle sağlanır. Renal yoldan atıldığından renal yetmezlikte yarılanma süresi uzar (154).

Düşük moleküler ağırlıklı heparin kullanımının avantajları şunlardır; biyoyararlanımının fazlalığı, antikoagülan etki süresinin uzun olması, rekürren venöz tromboemboli riski, daha az majör kanama, daha az tüm nedenlere bağlı ölüm, daha az trombositopeni, azalmış osteoporoz riski, ayaktan güvenle kullanım, maliyet etkinliği, sabit doz, aktive parsiyel tromboplastin time (aPTT) takibi gerektirmemesidir.



Şekil 1. TF: Tissue factor, PF4: Platelet factor 4
Düşük moleküler ağırlıklı heparinlerin etki mekanizması

Dalteparin, enoxaparin ve tinzaparinden oluşan düşük moleküler ağırlıklı heparin ürünleri birbirine çok benzer ancak aynı değildir. Ne yazık ki yalnızca bir iki çalışma direkt olarak farklı DMAH'ları karşılaştırmaktadır ve bu çalışmalar venöz tromboembolizm tedavisine sınırlı kalmaktadır. Literatürdeki çoğu çalışmada birçok endikasyon için enoxaparin kullanımını desteklemektedir.

Düşük moleküler ağırlıklı heparinler 16 sakkarit ünitesinin üzerinde uzunluğa sahip olanlar ve olmayanlar olarak karşılaştırıldığında FIIa 'yı daha uzun sakkarid ünitesi içerenler daha fazla inhibe etmektedir. Bununla birlikte, anti-FXa aktivitesinin serum düzeyinin tavşan modelinde de (155) insanlarda da (156) antitrombotik etki ile sıkı şekilde korelasyon göstermediği gösterilmiştir. Bundan başka, DMAH ların antikoagülan etkisinin sadece faktör Xa ve faktör IIa inhibisyonuna bağlı değildir. Kanıtlar DMAH kullanımının endotelden TFPI salınımını etkilediğini bunun da doku faktörünün düzeyinin azalmasına yol açtığını göstermektedir (157). Bu mekanizmalardan hangisinin daha önemli olduğu kesinlik kazanmamıştır (158).

Venöz tromboz oluşturulan sıçanlarda ven duvarında inflamatuar bir yanıt oluştuğu daha önceden ayrıntılı olarak tanımlanmıştır (159-161). Ayrıca, heparinin potansiyel bir antiinflamatuar etkisi olduğu bilinmektedir ve son yıllarda bu konu ile ilgili birçok çalışma yapılmaktadır (159,160,162). Heparinin antiinflamatuar aktivitesinin spazm ve ağrıyı gidermesi ile ilgili olduğu bildirilmekle birlikte heparinlerin antiinflamatuar etki mekanizmaları henüz yeni açıklanabilmiştir (159,163). Downing ve ark. (159) tarafından, DMAH antikoagülan etki göstermeyecek kadar düşük dozlarda bile önemli derecede antiinflamatuar etki gösterdikleri bildirilmiştir. Aynı çalışmada, DMAH'ların antiinflamatuar etkisinin antikoagülan etkisinden bağımsız olduğu da gösterilmiştir. Yine ülkemizden yapılan benzer bir çalışmada Güler ve ark. (160) dalteparin sodyumun antikogülan etkisinin olmadığı düşük dozlarda bile antiinflamatuar etkisinin olduğunu bildirmektedir. Okutan ve ark. (164) üç farklı etken madde içeren (dalteparin, enoksaparin, nadroparin) DMAH lerin kendi arasında ve standart heparin ile karşılaştırıldığında venöz tromboz antiinflamatuar etki gösterdikleri ve bu etki arasında bir fark olmadığı saptanmıştır.

Heparinin sıçanlarda ve insanlarda benzer etkileri olduğu, sıçanlarda yapılan heparin çalışmalarının insanlar içinde uygun olduğunu bildirilmektedir (165). Bu nedenle heparin ile sıçanlarda yapılan çalışmalar insanlar içinde yol gösterici olmaktadır ve kliniğe uyarlanabilmektedir.

Aşağıda Tablo 4'de DMAH ların farklı özellikleri gösterilmektedir. Fareed ve ark. (166,167) invitro ve invivo olarak DMAH'lar arasında farklılıklar olduğunu göstermişlerdir. Örneğin, enoxaparin dozunun %30'u protamin sülfat ile nötralize olurken bu oran dalteparin için %40, tinzaparin için %60'dır.

Sonuç olarak DMAH'ların kimyasal yapılarında farklılıklar bulunmaktadır (168). Benzersiz antikoagülan etkilerinin yanında invivo hücresel apopitozis arttırıcı, kanser hücrelerinin büyümesini önleyici ve inflamasyonu düzenleyici çeşitli biyolojik etkileri mevcuttur (168-170). Çeşitli çalışmalarda, DMAH'ların nötrofillerin endotel hücrelerine yapışmasını, reaktif oksijen ürünlerinin yapımını, endotelyal hücrelerde L-selektin ve P-selektin gibi hücresel adezyon moleküllerinin ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (171-173).

Tablo 4. Ticari olarak kullanımda olan düşük moleküler ağırlıklı heparinlerin özellikleri

İlaç Adı	**Ortalama Ağırlık (Da)**	**Anti-FXa/ Anti-FIIa oranı**	**Subkutanöz tedavi dozu (venöz trombozda)**
Enoxaparin	4300	~3,3-3,8	100 anti-FXa IU/kg günde iki kez veya 150 anti-FXa IU/kg günde bir kez
Dalteparin	5800	~2,8	100 anti-FXa IU/kg günde iki kez veya 200 anti-FXa IU/kg günde bir kez
Tinzaparin	5800	~1,5-2,0	175 anti Xa IU/kg günde bir kez

GEREÇ VE YÖNTEMLER

DENEY HAYVANLARI VE PROTOKOLÜ

Bu deneysel çalışma deney hayvanları etik kurulunun 2009/06.01 sayılı onayı alınarak gerçekleştirilmiştir (Ek-1). Çalışmamızda, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinden temin edilen toplam 40 adet Wistar-Albino cinsi (180-260 gr) erişkin dişi sıçan kullanıldı. Tüm denekler 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda normal oda sıcaklığında (21°C) tutuldular. Tüm denekler standart palet sıçan yemi (210 kcal/100gr/gün) ile beslendiler, musluk suyu içtiler. Düzenli olarak kafes bakımları yapıldı. Deneyde toplam 4 grup oluşturuldu.

Grup 1 (Kontrol) (n=10): Bu grupta bulunan sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmadı.

Grup 2 (Sham) (n=10): Karın boşluğu açılarak koledok kanalı serbestlendikten sonra sadece elle manüple edilerek batın kapatıldı.

Grup 3 (Ligasyon) (n=10): Karın boşluğu açılarak koledok kanalı serbestlendikten sonra, koledok kanalı duedonuma yakın bölgede üst ve alt kısımdan bağlanarak kesildi.

Grup 4 (Ligasyon+Dalteparin) (n=10): Ligasyon işlemi yapılan deneklere 50 IU/kg dozunda dalteparin deney süresince intraperitoneal (ip) verildi.

Deney süresi başında ve sonunda tüm deneklerin vücut ağırlıkları tartıldı.

SAFRA KANAL LİGASYON İŞLEMİ

Sıçanlara operasyon öncesi ketamin (Ketalar®, 10 ml, 50 mg/ml, Pfizer, ABD) (25 mg/kg, im) 50 mg/kg/ip, xylazine (Rompun® 50 ml, 23.32 mg/ml, Bayer, Almanya) 5 mg/kg/ip ile genel anestezi uygulandı. Karın bölgesi povidon-iyot (İsosol®, %10 povidon-iyot, 1 litre, Merkez Laboratuarı, Türkiye) ile bölge asepsisi sağlandıktan sonra orta hat kesisi

yapılarak karın açıldı. Safra ligasyonu işlemi Criado ve ark. (174) uyguladığı tekniğe uygun olarak karaciğer lobları ile duodenum arasında yerleşik koledok kanalı açığa çıkarıldı çevre dokulardan temizlenerek tıkanma oluşturmak amacı ile iki yerden 4,0 ipek iplikle bağlandı. Birinci düğüm hepatik kanal kavşağının hemen altından, ikinci düğüm ise pankreatik kanalın giriş yerinin hemen üstüden yapıldı. Sonra bu iki bağlantı arasından kesi yapılarak işlem gerçekleştirildi. Cilt ve cilt altı birbirinden bağımsız olarak devamlı sütürle kapatıldı. Cerrahi girişim yeri 6-7. günlerde sorunsuz olarak kapandı. Safra yolu ligasyonu yapılan 10 adet sıçana 50 IU/kg/ip Dalteparin 35 gün boyunca günde bir kez uygulandı. Otuzbeşinci günün sonunda tüm deneklere ketamin 50 mg/kg/i.p ile anestezi sağlanarak karın orta hattan tekrar açıldı ve kalpten alınan kan D-dimer düzeyi çalışılması için tüpe konularak sıçanlar sakrifiye edildi. Sıçanların karaciğerleri tümüyle çıkarıldı. Doku örnekleri, ışık mikroskop ve immünohistokimyasal inceleme için %10'luk formaldehid ve alkol-formole ayrıca %0,9 izotonik içerisine 0,5-1 cm boyutunda karaciğer dokusu hidroksiprolin bakılması amacıyla konularak tespit edildi.

BİYOKİMYASAL İNCELEME

D-dimer Düzeylerinin Belirlenmesi

Deney sonunda kalpten alınan kan örnekleri 3000 devir/dakika'da 15 dakika santrifüje edilerek serum elde edildi ve inceleme zamanına kadar -70°C derin dondurucuda saklandı. İlgili firmadan D-dimer analizi için temin edilen cihaz ve cihazdan sorumlu kişinin yardımıyla sıçan serumları; TECO GMBH marka, Dimex JR model cihazla kromojenik lazerli okuma test metodu ile, kitin reaktif özelliği ile konsantrasyon 233 ng/ml için (<%10) ve 2160 ng/ml için (%5,2), sensitivite en az 50 ng/ml ölçer şekilde, spesifitesi monoklonal antikorlardan oluşan (MA-8D3) test metodu ile çalışıldı, sonuçlar ng/ml biriminden bulundu.

Doku Hidroksiprolin Düzeylerinin Belirlenmesi

Yirmi dört saat kurutulduktan sonra 24 saat boyunca hidroklorik asid dijesyonuna tabi tutulan doku örneklerinin sıvı fazı azot gazı altında uçuruldu. Hazırlanan hidrolizattaki açığa çıkan hidroksiprolin kalıntılarının kloramin-T ile verdiği reaksiyon spektrofotometrik olarak değerlendirildi. L-hidroksiprolin ile 5, 25 ve 50 mM standart çözeltileri hazırlandı. Standart çalışmasında elde edilen eğrinin denklemi regresyon analizi ile $y = 0.013+0.021x$ olarak hesaplandı. Denklem kullanılarak örneklerdeki hidroksiprolin miktarı hesaplandı. Her bir

doku örneğinde tespit edilen hidroksiprolin miktarı dokunun kuru ağırlığına oranlanarak sonuçlar mM/gr doku olarak ifade edildi (175).

HİSTOLOJİK İNCELEME

Işık Mikroskobik İnceleme

Işık mikroskobik incelemeler için karaciğer dokuları, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Işık Mikroskopi Laboratuvar'ında işlemlendirildi. Bu amaçla karaciğer dokuları Bouin fiksatöründe 4 gün fikse edildikten sonra yıkama işlemine geçildi. Dokular 2 gün %70'lik alkolde yıkanarak, dehidratasyon işlemine geçildi. Dokular artan alkol serilerinde (%70, %90, %96, %100) 1'er saat tutuldu. Dehidratasyon aşamasından sonra saydamlaştırma basamağı için dokular 3 seri 15'er dk toluol ile muamele edildi. Gömme işleminden önce dokular yumuşak parafinde 1 gece tutuldu. Bir sonraki gün karaciğer dokuları yumuşak parafinden alınarak 1 saat sıvı sert parafinde tutularak, bloklandı. Bu bloklardan Leica RM-2245 silindirli mikrotom kullanılarak 6 μm (mikrometre) kalınlığındaki kesitler alındı. Karaciğer dokusunun genel özelliklerini ortaya koyabilmek amacıyla alınan kesitler Masson trichrome ile boyandı.
Fibrozisin histopatolojik değerlendirilmesi aşağıdaki Tablo 5 'e göre yapıldı.

Tablo 5. Fibrozisin histopatolojik değerlendirilmesi

	Skor
Fibrozis yok	0
Portal fibrozis	1
Septumlu fibrozis	2
İnkomplet siroz (nadir nodüllerle birlikte belirgin köprüleşme, porto-portal ve/veya porto-sentral köprüleşme	3
Siroz (diffüz fibrözis ve nodül oluşumu)	4

İnflamasyonun histopatolojik değerlendirilmesi aşağıdaki Tablo 6'ya göre yapıldı.

Tablo 6. İnflamasyonun histopatolojik değerlendirmesi

	Skor
İnflamasyon yok	0
Bazı veya tüm portal alanlarda hafif	1
Bazı veya tüm portal alanlarda orta	2
Bazı veya tüm portal alanlarda orta/belirgin	3
Bazı veya tüm portal alanlarda belirgin	4

İmmünhistokimyasal İnceleme

İmmünohistokimyasal inceleme için karaciğer dokusundan 6 µm kalınlığında kesitler alındı ve deparafinizasyon işlemini takiben kesitler suya indirildi. Suya indirilen kesitler antijen retrival içinde mikrodalga fırında 20 dk kaynatıldı. Oda ısısında 20 dk soğumaya bırakıldıktan sonra kesitler PBS ile yıkandı. Bu aşamadan sonra hidrojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için metanolde (Riedel-de Häen 24229) hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) ile 20 dk muamele edildi. Distile su içinde çalkalanarak kesitler Fosfat Buffer Solusyonu (PBS; pH 7,6) ile yıkandı. Özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere kesitlere %1 preimmün rabbit serum (Ultra V Block, LabVision, TA-015-UB) uygulandı. Daha sonra kesitler nemli chamber içinde 1/100 oranında sulandırılmış primer antikor ile 1 saat süre ile inkübe edildi. Kullanılan antikorlar, mouse monoclonal anti-actin, smooth muscle antibody (Cat. # MS-113-P, Neomarkers, USA), rabbit polyclonal anti-TGF-β antibody (Sc-146, Lot # 12006, Santa Cruz Biotechnology, USA) ve koyun polyclonal fibrinogen HRP antibody (ab64664, Abcam, USA) idi. Kesitler 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 20 dk sekonder antikor solüsyonunda (Biotinylated Goat Anti-Mouse, LabVision, TM-015-BN) tutuldu. 3 kez PBS'de yıkanan kesitlere 20 dk streptavidin peroksidaz solüsyonu (Streptavidin Peroxidase, LabVision, TS-015-HR) uygulandı. Kesitlere 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 10 dk 3-amino 9 etil karbazol (AEC) kromojen solüsyonu (LabVision, TA-002-HAC) uygulaması yapıldı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 5 dk Mayer hematoksilen uygulanarak zıt boyama yapıldı. Akarsuda 5 dk yıkanan kesitler kapatma solüsyonu (Mounting Medium, LabVision, TA-060-UG) konarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskobunda değerlendirmeye alındı.

Her preparata ait α-SMA pozitif hücrelerin sayısının skorlaması yapıldı. Her preparatta rasgele seçilen 10 alanda şu şekilde skorlama yapıldı; 0 = positivite yok; 1 = Damar düz kas hücreleri, sinüzoidler, prolifere olan safra kanallarının etrafı ve fibrotik septalardaki

hücrelerin %10'dan az kısmı pozitif; 2 = Damar düz kas hücreleri, sinüzoidler, prolifere olan safra kanallarının etrafı ve fibrotik septalardaki hücrelerin %11-20'lik kısmı pozitif; 3 = Damar düz kas hücreleri, sinüzoidler, prolifere olan safra kanallarının etrafı ve fibrotik septalardaki hücrelerin %21-40'lık kısmı pozitif; 4 = Damar düz kas hücreleri, sinüzoidler, prolifere olan safra kanallarının etrafı ve fibrotik septalardaki hücrelerin %40'dan fazla kısmı pozitif.

Her preparata ait TGF-β pozitif hücrelerin sayısının skorlaması yapıldı. Her preparatta rasgele seçilen 10 alanda şu şekilde skorlama yapıldı; 0 = positivite yok; 1 = Hepatositlerin %10'dan az kısmı pozitif; 2 = Hepatositlerin %11-20'lik kısmı pozitif; 3 = Hepatositlerin %21-40'lık kısmı pozitif; 4 = Hepatositlerin %40'dan fazla kısmı pozitif.

Her preparata ait damarlardaki pozitif fibrinojen reaktivitesi gösteren alanların skorlaması yapıldı. Her preparatta rasgele seçilen 10 alanda şu şekilde skorlama yapıldı; 0 = positivite yok; 1 = Damar içi alanın %10'dan az kısmı pozitif; 2 = Damar içi alanın %11-20'lik kısmı pozitif; 3 = Damar içi alanın %21-40'lık kısmı pozitif; 4 = Damar içi alanın %40'dan fazla kısmı pozitif.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

A-Biyokimyasal Sonuçlar İle İlgili İstatistiksel Analiz:

Biyokimyasal sonuçlar ve gruplar arası kilo farklarına yönelik istatistiksel değerlendirme, AXA507C775506FAN3 seri numaralı STATISTICA AXA 7,1 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Ölçülebilen verilerin normal dağılıma uygunlukları tek örnek Kolmogorov Smirnov testi ile bakıldıktan sonra normal dağılım gösterenler için gruplar arası kıyaslamalarda tek yönlü varyans analizi ve post-hoc Tamhane testi, normal dağılım göstermeyenler için ise Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann Whitney U testi kullanıldı. Grup içi kıyaslamalarda Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler olarak Median (Min-Max) değerleri ve aritmetik ortalama±standart sapma verildi. Tüm istatistikler için anlamlılık sınırı $p<0,05$ olarak seçildi.

B-Histolojik Skorlama İle İlgili İstatistiksel Analiz:

İstatistiksel analizler SPSS 11,0 programı ile gerçekleştirildi. Tüm veriler ortalama (±) standart sapma (S.S) olarak ifade edildi. Gruplar arasındaki sonuçların farklılıkları Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Anlamlı fark bulunan gruplar arasındaki

karşılaştırmalar için ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p<0,05$ olması durumunda fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

KARACİĞER MAKROSKOPİSİ

Deney süresi sonunda sakrifiye edilen deneklerin karaciğer doku örnekleri ilk olarak makroskopik olarak incelendi. Bu inceleme sonucunda kontrol grubundaki sıçan karaciğerlerinin parlak kahverengi-kırmızı renkte, yumuşak ve esnek kıvamda olduğu görüldü. Karaciğer yüzeyi ise düzgün olup pürüzsüzdü.

Ligasyon grubundaki sıçan karaciğer dokuları ise kıvamları sertleşmiş olup renkleri mat ve kahverengi olarak gözlendi. Karaciğer yüzeyi düzgün olmayıp zımpara kağıdına benzer şekilde mikronodüller içermesi dikkati çekmiştir. Karaciğer yüzeyinde bazı alanlarda nokta şeklinde koyu yeşil renkte olan safra birikimleri görüldü. Dalteparin ile tedavi edilen gruptaki karaciğer dokuları ise kontrol grubuna benzer olarak, parlak renkte ve yumuşak kıvamda olup safra birikimi ile mikronodül yapılarına rastlanmadı. Ayrıca tüm deneklerde koledok kanalının karaciğere komşu olan kısmı safra birikimine bağlı olarak dilate olduğu izlenmiş olup bu bulgu bize safra yolu ligasyon tekniğini doğru olarak uyguladığımızı göstermektedir. Çalışmamızda ligasyon grubundan bir sıçan 30. gününde safra kacak peritoniti nedeniyle çalışma dışı bırakıldı, ligasyon+ilaç grubundan bir sıçan çalışmanın 16. gününde batın içi apse nedeniyle çalışma dışı bırakıldı.

IŞIK MİKROSKOPİK BULGULAR

Çalışmamızda; kontrol grubundaki sıçanların Masson trichrome boyalı karaciğer kesitleri ışık mikroskobunda incelendiğinde; normal karaciğer dokusu görüldü (Şekil 2).

Sham grubundaki sıçanların Masson trichrome boyalı karaciğer kesitleri ışık mikroskobunda incelendiğinde; portal alanda nadiren lenfosit infiltrasyonu görülmesine rağmen, normale yakın bir karaciğer dokusu gözlendi (Şekil 3).

Ligasyon grubundaki sıçanların Masson trichrome boyalı karaciğer kesitleri ışık mikroskobunda incelendiğinde; normal parankimal yapının bağ dokusu artışı sonucu fibröz septumlarla çevrili nodüler yapıya dönüştüğü ve hepatosit dizilerinin bu nodüller içinde adacıklar şeklinde kaldığı görüldü. Portal alanlarda belirgin köprüleşmeyle beraber hem porto-portal hem porto-sentral köprüleşme ile birlikte inkomplet siroz ve nekrotik alanların varlığı saptandı. Ayrıca sinüzoidlerdeki genişlemeyle birlikte portal alanlarda mononüklear hücre infiltrasyonu ve safra kanalı proliferasyonu ve genişlemesi görülmektedir (Şekil 4).

Ligasyon+ilaç grubundaki sıçanların Masson trichrome boyalı karaciğer kesitleri ışık mikroskobunda incelendiğinde; fibrozisin önemli ölçüde azalmasıyla birlikte bazı portal alanlarda kısa fibroz, septumlu veya septumsuz fibrozis ile birlikte artan parankima içinde hepatosit dizilerinin nodüller bir adacık içinde olduğu görüldü. Ayrıca portal alanlardaki mononüklear hücre infiltrasyonu ve safra kanalı proliferasyonu ve nekrotik alanlarda önemli derecede azalma tesbit edildi (Tablo 7, Şekil 5).

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Alfa Smooth Muscle Actin

Kontrol ve sham gruplarına ait karaciğerlerde yapılan incelemelerde, pozitif α-SMA reaktivitesi sadece damarların düz kas hücrelerinde görüldü (Şekil 6, 7).

Ligasyon grubuna ait karaciğerlerde yapılan incelemelerde, pozitif α-SMA reaktivitesi damarların düz kas hücreleriyle birlikte sinüzoidlerin, prolifere olan safra kanallarının etrafında ve fibrotik septalarda gözlendi (Şekil 8).

Ligasyon+ilaç grubuna ait karaciğerlerde yapılan incelemelerde ise ligasyon grubuna göre pozitif α-SMA reaktivitesinde belirgin bir azalmanın olduğu gözlendi (Tablo 7, Şekil 9).

Transforming Growth Factor Beta

Kontrol ve sham grubuna ait karaciğerlerde yapılan incelemelerde, hepatositlerin sitoplazmasında çok zayıf bir pozitif TGF-β reaktivitesinin olduğu saptandı (Şekil 10, 11).

Ligasyon grubuna ait karaciğerlerde yapılan incelemelerde, yoğun reaktivitenin daha çok vena sentralis etrafında olmak üzere tüm hepatositlerde kuvvetli pozitif TGF-β reaktivitesi

gözlenirken, ligasyon+ilaç grubunda ise yoğun reaktivitenin ligasyon grubunda olduğu gibi daha çok vena sentralis etrafında olmak üzere hepatositlerde orta şiddette bir reaktivitenin olduğu görüldü (Tablo 7, Şekil 12, 13).

Fibrinojen

Kontrol grubuna ait karaciğerlerde yapılan incelemelerde, pozitif fibrinojen reaktivitesi gözlenmezken, sham grubunda ise karaciğer dokusundaki damarlarda zayıf pozitif bir reaksiyonun olduğu saptandı (Şekil 14, 15).

Ligasyon grubuna ait karaciğerlerde yapılan incelemelerde ise, damarlarda kuvvetli pozitif fibrinojen reaktivitesi gözlenirken, ligasyon+ilaç grubunda ise orta şiddette bir reaktivitenin olduğu dikkati çekti (Tablo 7, Şekil 16, 17).

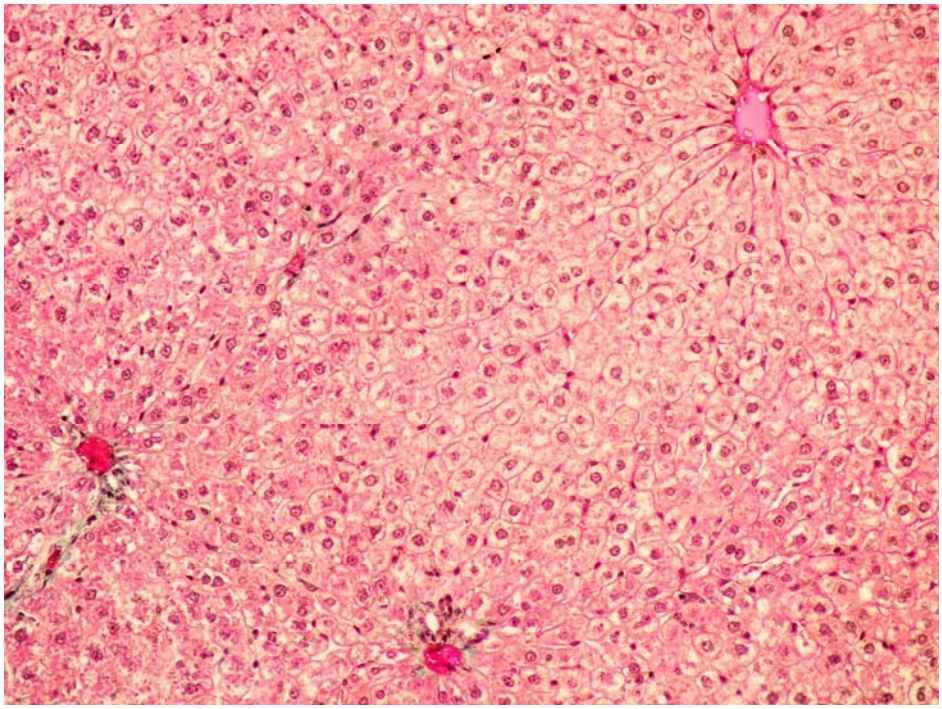
Tablo 7. Kontrol, sham, ligasyon ve ligasyon+ilaç grupları arasındaki ışık mikroskobisi incelemesinde inflamasyon ve fibrozis skorları ve karaciğer dokusu alfa düz kas aktin, transforme edici büyüme faktörü, fibrinojen immünreaktivitelerinin yoğunluğunun istatistiksel olarak karşılaştırılması

	Kontrol	**Sham**	**Ligasyon**	**Ligasyon+ilaç**
Fibrozis	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.84 ± 0.23[a]	1.43 ± 0.13[b]
İnflamasyon	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.01	2.68 ± 0.20[a]	1.35 ± 0.10[b]
α-SMA	0.10 ± 0.01	0.38 ± 0.05 [c]	2.83 ± 0.22[a]	0.74 ± 0.08[d]
TGF-β	0.08 ± 0.01	0.36 ± 0.04 [c]	2.79 ± 0.20[a]	0.71 ± 0.07[d]
Fibrinojen	0.00 ± 0.00	0.34 ± 0.04 [c]	2.76 ± 0.19[a]	1.41 ± 0.11[b]

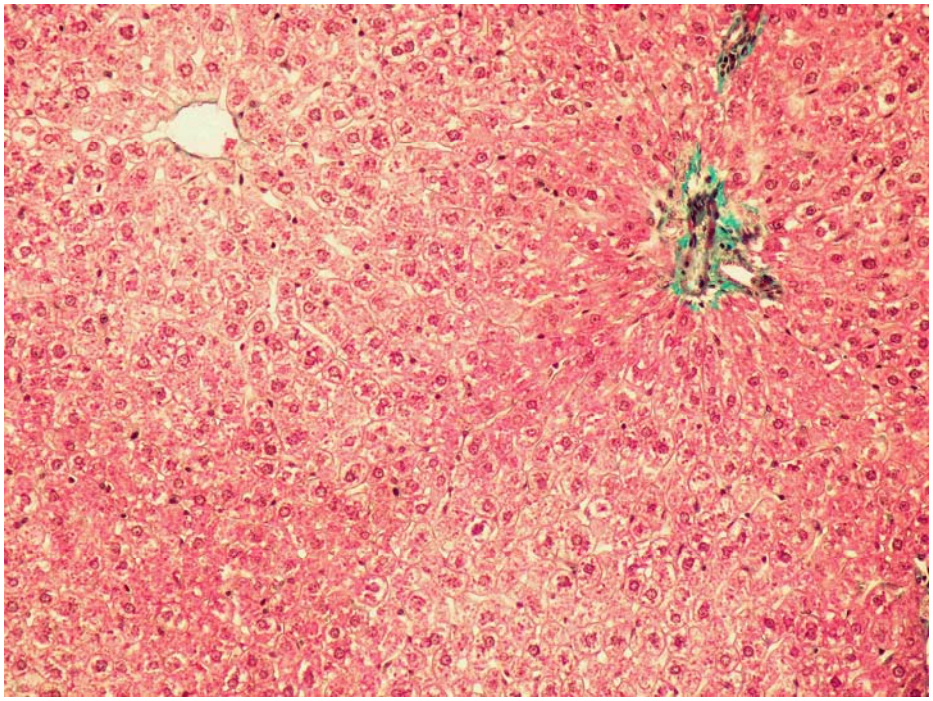
[a] P $\leq$ 0.00001 kontrol ile karşılaştırıldığında, [b] P $\leq$ 0.001 ligasyon ile karşılaştırıldığında,

[c] P $\leq$ 0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında, [d] P $\leq$ 0.0001 ligasyon ile karşılaştırıldığında.

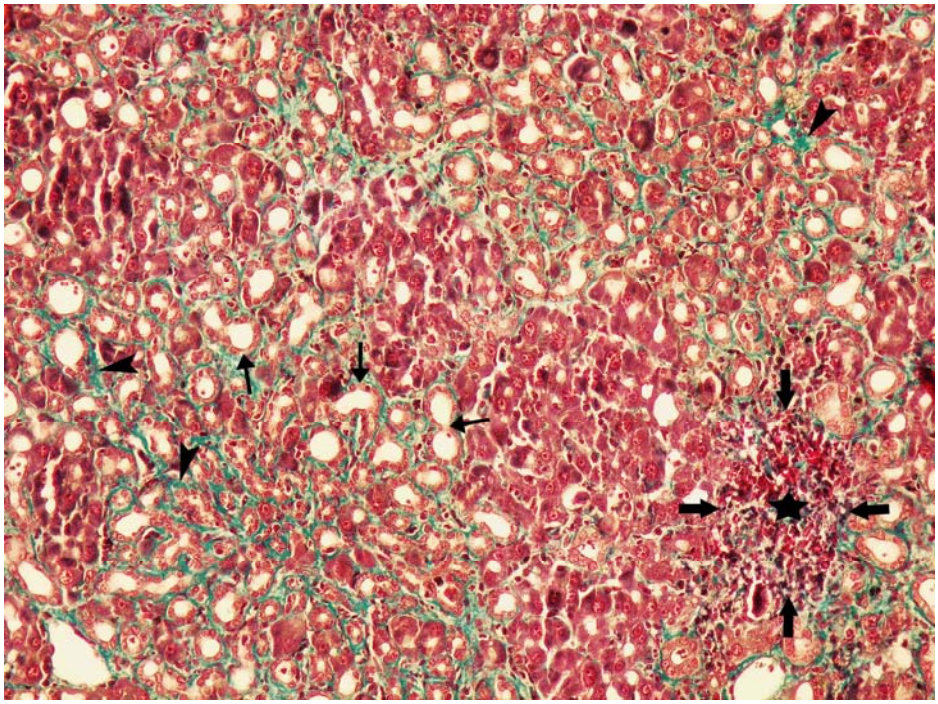
α-SMA: Alfa Smooth Muscle Actin, **TGF-β:** Transforming Growth Factor Beta



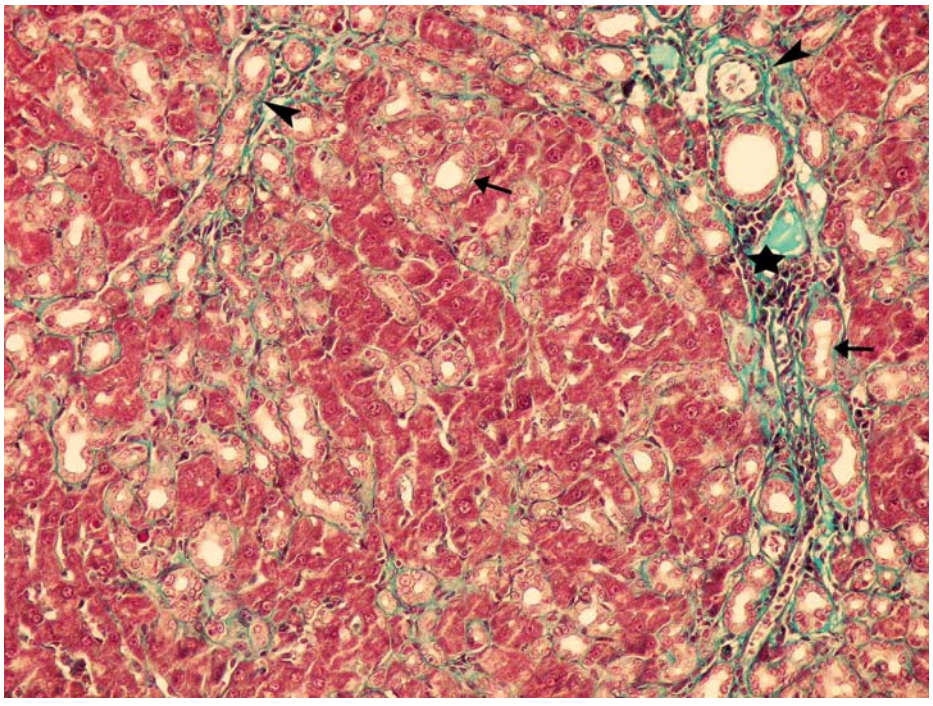
Şekil 2. Kontrol grubuna ait karaciğerin normal histolojik görünümü. Masson trichrome, X200



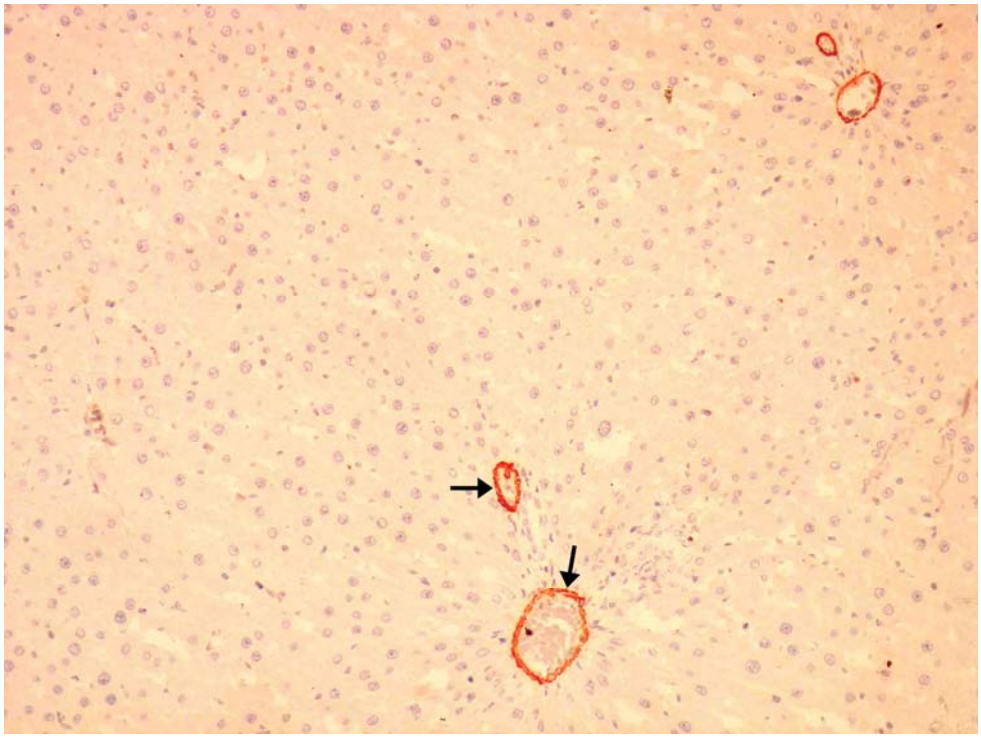
Şekil 3. Sham grubuna ait karaciğerin normal histolojik görünümü. Masson trichrome, X200



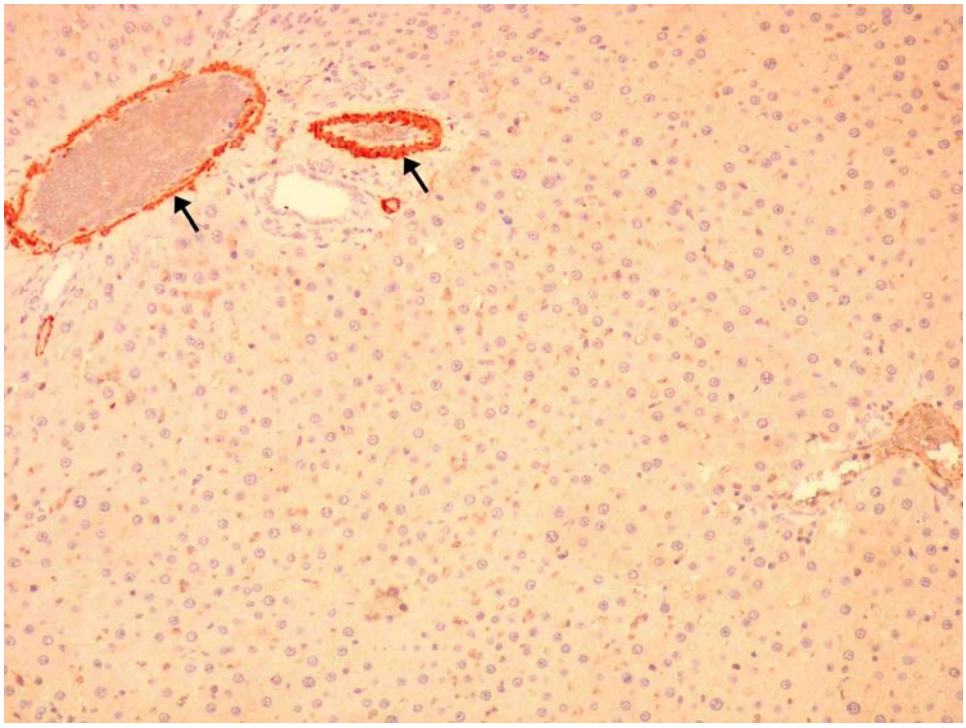
Şekil 4. Ligasyon grubuna ait karaciğerin histolojik görünümü.
Yıldız: Nekrotik alan, Okbaşı: Bağ doku, İnce Ok: Safra kanalları.
Masson trichrome, X200



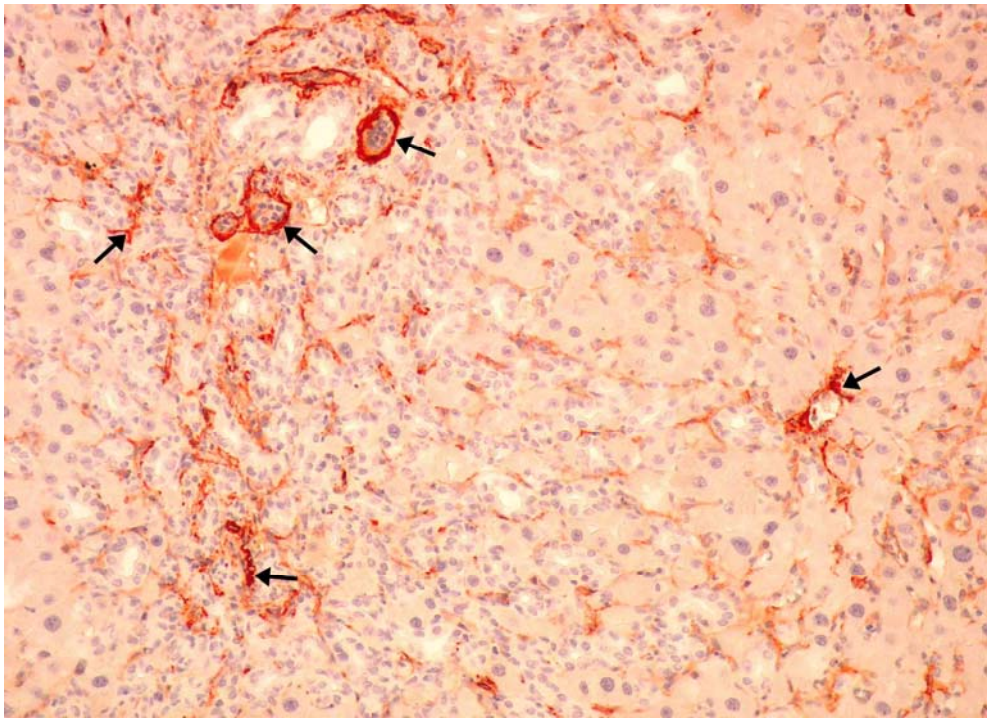
Şekil 5. Ligasyon+ilaç grubuna ait karaciğerin histolojik görünümü.
Yıldız: Mononükleer hücre infiltrasyonu, Okbaşı: Fibröz septalar, Ok: Safra kanalları. Masson trichrome, X200



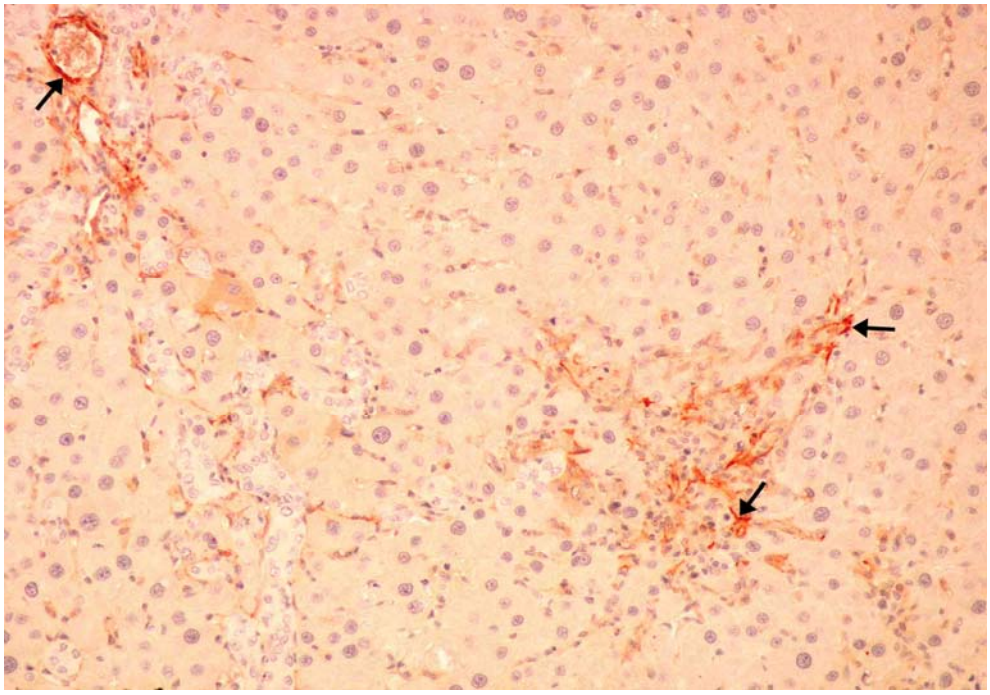
Şekil 6. Kontrol grubuna ait karaciğer kesitinde α-SMA immünboyanması.
Ok: Damar düz kas hücrelerindeki α-SMA pozitif immünreaktivite.
İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X200



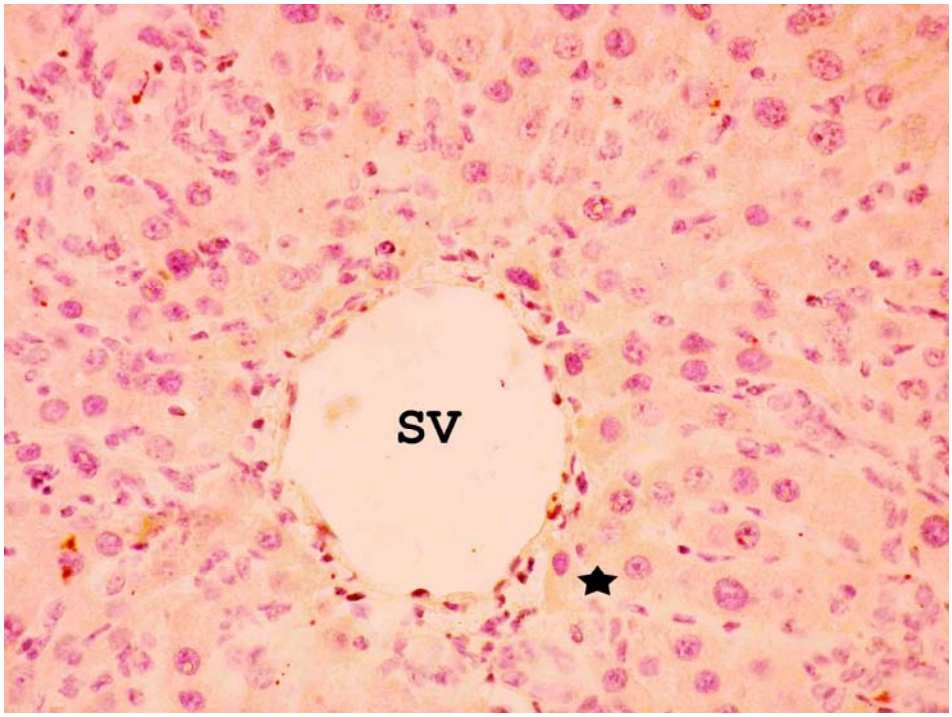
Şekil 7. Sham grubuna ait karaciğer kesitinde α-SMA immünboyanması.
Ok: Damar düz kas hücrelerindeki α-SMA pozitif immünreaktivite.
İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X200



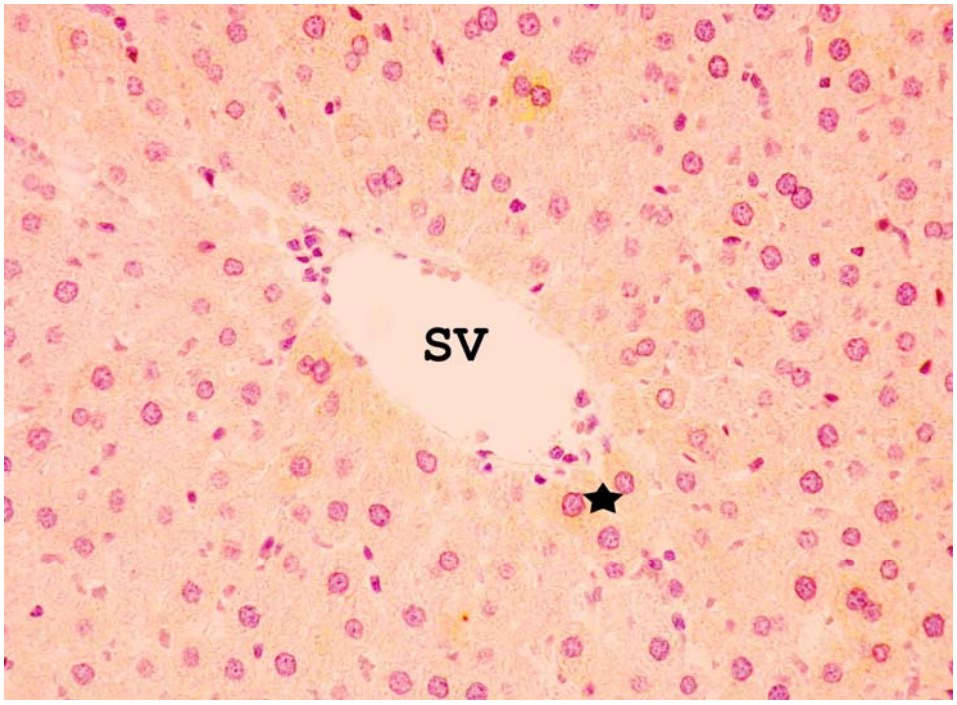
Şekil 8. Ligasyon grubuna ait karaciğer kesitinde α-SMA immünboyanması. Ok: Damar düz kas hücreleri, sinüzoidler, prolifere olan safra kanallarının etrafı ve fibrotik septalardaki çok sayıda α-SMA pozitif immünreaktivite görülmekte. İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X200



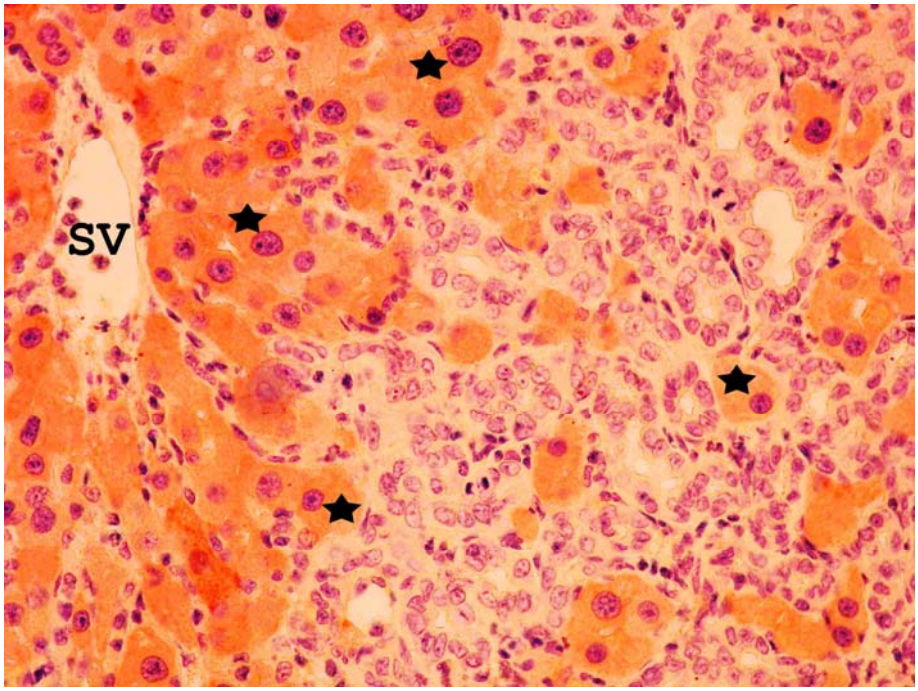
Şekil 9. Ligasyon+ilaç grubuna ait karaciğer kesitinde α-SMA immünboyanması. Ok: Damar düz kas hücreleri, sinüzoidler, prolifere olan safra kanallarının etrafı ve fibrotik septalardaki az sayıda α-SMA pozitif immünreaktivite görülmekte. İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X200



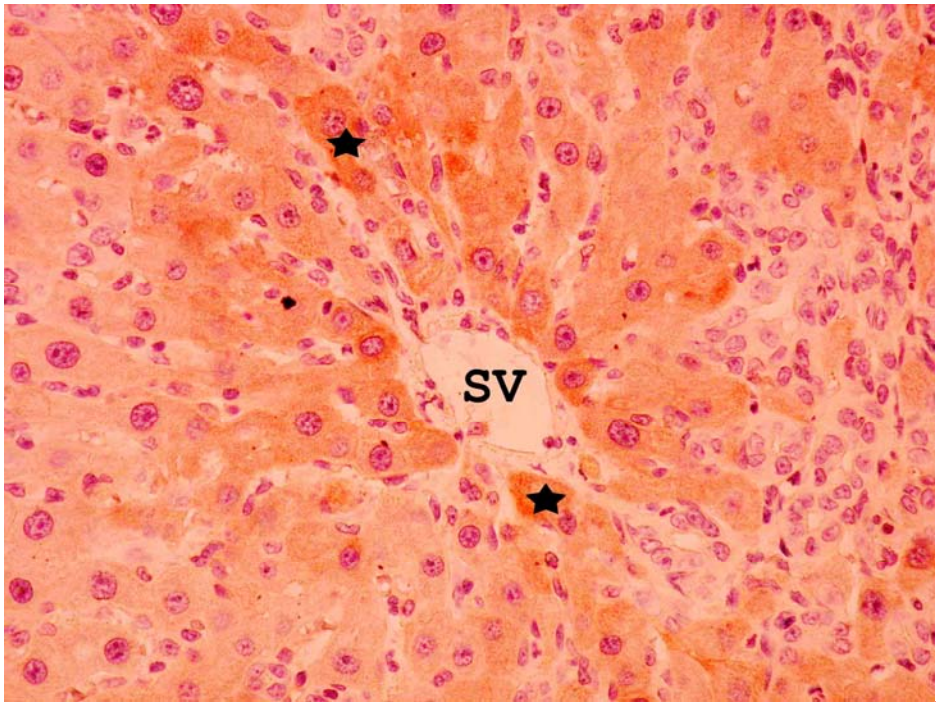
Şekil 10. Kontrol grubuna ait karaciğer kesitinde TGF-β immünboyanması. SV: Santral ven, Yıldız: Hepatositlerdeki zayıf TGF-β pozitif immünreaktivite. İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X400



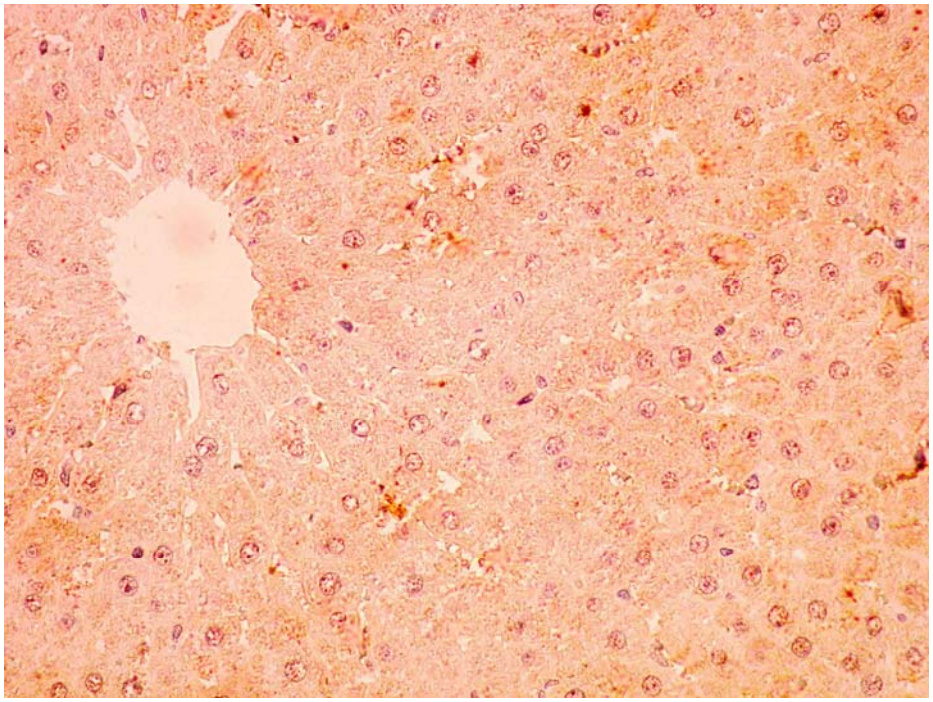
Şekil 11. Sham grubuna ait karaciğer kesitinde TGF-β immünboyanması. SV: Santral ven, Yıldız: Hepatositlerdeki zayıf TGF-β pozitif immünreaktivite. İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X400.



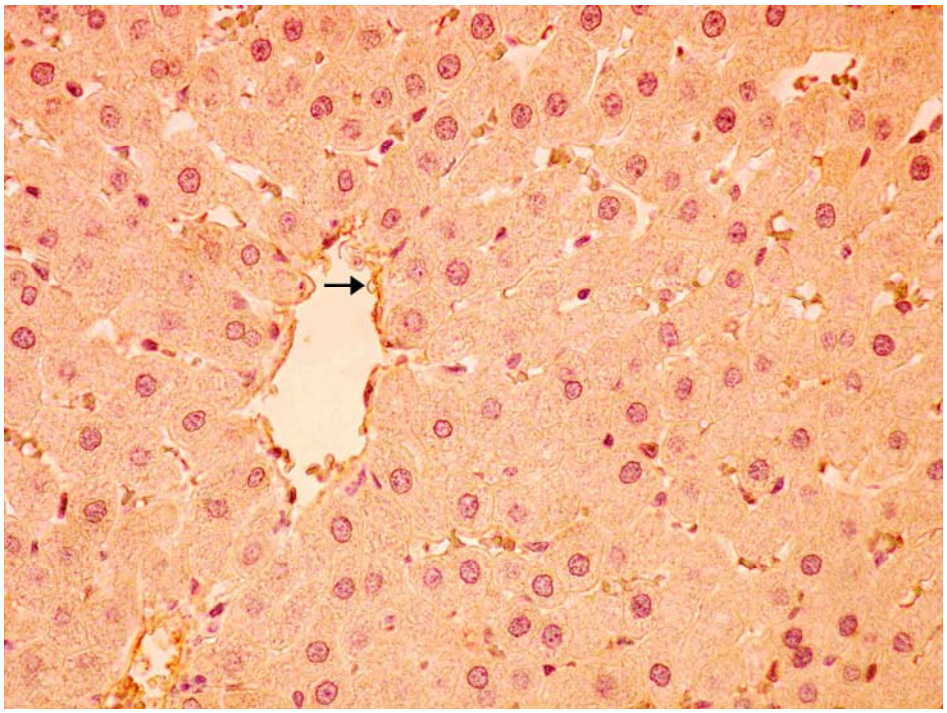
Şekil 12. Ligasyon grubuna ait karaciğer kesitinde TGF-β immün boyanması. SV: Santral ven, Yıldız: Hepatositlerdeki kuvvetli şiddette TGF-β pozitif immünreaktivite. İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X400.



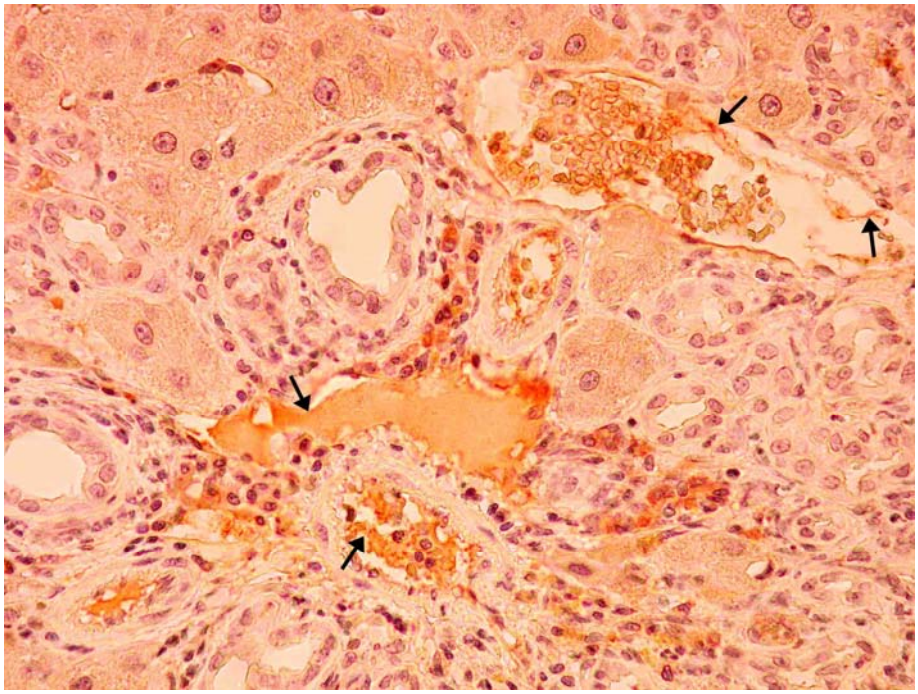
Şekil 13. Ligasyon+ilaç grubuna ait karaciğer kesitinde TGF-β immün boyanması. SV: Santral ven, Yıldız: Hepatositlerdeki orta şiddette TGF-β pozitif immünreaktivite. İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X400.



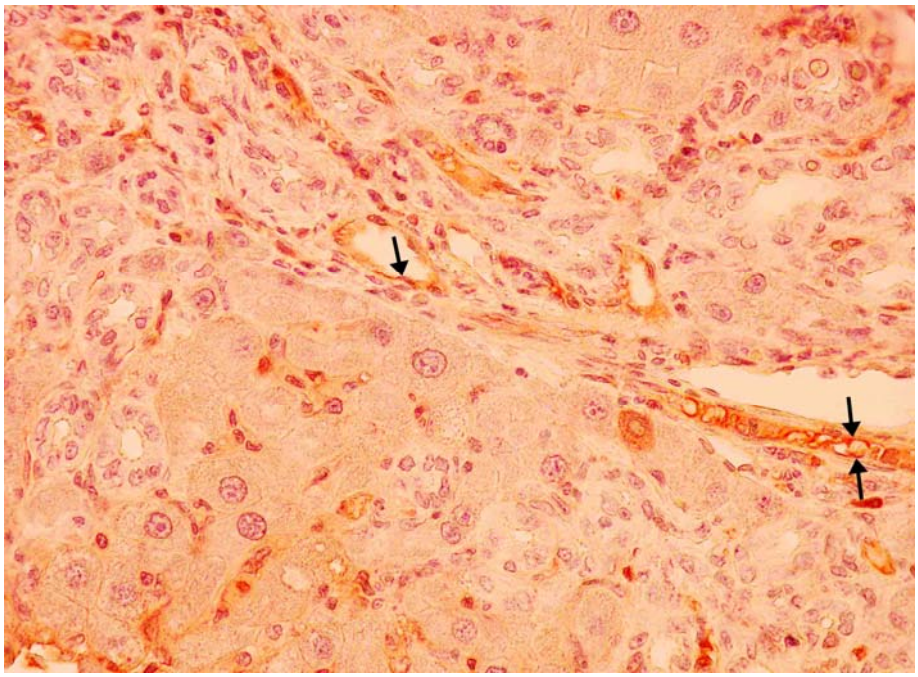
Şekil 14. Kontrol grubuna ait karaciğer kesitinde fibrinojen immünboyanması. Damar içinde fibrinojen pozitif immünreaktivite görülmemekte. İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X400.



Şekil 15. Sham grubuna ait karaciğer kesitinde fibrinojen immünboyanması. Ok: Damar içindeki fibrinojen pozitif immünreaktivite. İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X400.



Şekil 16. Ligasyon grubuna ait karaciğer kesitinde fibrinojen immünboyanması.
Ok: Damar içindeki fibrinojen pozitif immünreaktivite.
İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X400.



Şekil 17. Ligasyon+ilaç grubuna ait karaciğer kesitinde fibrinojen immünboyanması.
Ok: Damar içindeki fibrinojen pozitif immünreaktivite.
İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X400.

BİYOKİMYASAL BULGULAR

Serum D-dimer bakımından gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark olup bu fark, kontrol grubu ile ligasyon ve ligasyon+ilaç grubu ($p<0,001$), ligasyon ile sham grubu ($p<0,001$) ve ligasyon ile ligasyon+ilaç grubu ($p<0,05$) arasında saptanmıştır (Tablo 8,9).

Karaciğer doku hidroksiprolin bakımından gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark olup bu fark, kontrol grubu ile ligasyon ve ligasyon+ilaç grubu ($p<0,001$), ligasyon ile sham grubu ($p<0,001$) ve ligasyon ile ligasyon+ilaç grubu ($p<0,01$) arasında saptanmıştır (Tablo 8,9).

Giriş kilosu bakımından gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,169$) (Tablo 8,9).

Çıkış kilosu bakımından gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark olup bu fark, kontrol ile ligasyon + ilaç grubu arasında saptanmıştır ($p<0,01$) (Tablo 8,9).

Kilo kaybı bakımından gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark olup bu fark, kontrol ile ligasyon+ilaç grubu arasında saptanmıştır ($p<0,05$) (Tablo 8,9).

Tablo 8. Kontrol, sham, ligasyon ve ligasyon+ilaç grupları arasındaki serum D-dimer, karaciğer dokusu hidroksiprolin, sıçanların çalışmaya giriş çıkış kiloları ve kilo kayıplarının istatistiksel olarak karşılaştırması

Değişken	Kontrol (n=10) Ort±SS Ortanca (Min-Maks)	Sham (n=10) Ort±SS Ortanca (Min-Maks)	Ligasyon (n=9) Ort±SS Ortanca (Min-Maks)	Ligasyon+ilaç (n=9) Ort±SS Ortanca (Min-Maks)	P
D-dimer	128,00±17,75 129(89-152)*	113,10±15.50 107,50(96-145)	527,44±177,22 535(222-855)**	321,00±88,66 326(159-451)***	0,0001#
Hidroksiprolin	1,20±0,19 1,19(0,95-1,57)*	1.22±0,30 1,23(0,77-1,83)	6,97±1,38 7,08(3,99-8,27)**	4,97±0,84 5,03(3,47-6,38)∫	0,0001#
Giriş kilosu	231,20±7,84 231(219-244)	227,50±18.95 224(200-258)	215,33±20,43 218(180-244)	223,89±11,84 219(213-250)	0,169#
Çıkış kilosu	237.20±10,29 234(218-251)t	231,40±14,77 234,5(207-250)	196,56±38,39 200(142-247)	219.67±10,71 220(201-242)	0,001#
Kilo kaybı	6,00±6,18 7,0(-7-12)¶	3,9±10,66 9,0(-16-14)	-18,78±32,73 -18,0(-84-29)	-4,22±12,62 -1,0(-35-10)	0,045ǂ

#: Tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldığında (p<0,05) ve Post hoc Tamhane testi. *: Kontrol ile ligasyon ve ligasyon+ilaç grubu karşılaştırıldığında p<0,001. **: Ligasyon ile ve sham grubu karşılaştırıldığında. p<0,001. ***: Ligasyon ile ligasyon+ilaç grubu karşılaştırıldığında p<0,05. ∫: Ligasyon ile ligasyon+ilaç grubu karşılaştırıldığında p<0,01. t: Kontrol ile ligasyon+ilaç grubu karşılaştırıldığında. p<0,01. ǂ: Kruskal Wallis varyans analizi ile karşılaştırıldığında p<0,05. ¶: Kontrol ile ligasyon+ilaç grubu karşılaştırıldığında p<0,05.

Tablo 9. Grupların demografik özellikleri

Sıçan grup	Giriş kilosu (gram)	Çıkış kilosu (gram)	Hidroksiprolin (mM/gr doku)	D-dimer (ng/ml)
Kontrol-1	228	233	0,95	89
Kontrol-2	231	232	1,18	130
Kontrol-3	231	242	1,45	152
Kontrol-4	225	218	1,22	128
Kontrol-5	239	246	1,01	131
Kontrol-6	239	251	1,57	124
Kontrol-7	223	234	1,11	117
Kontrol-8	233	234	1,20	126
Kontrol-9	219	231	1,28	152
Kontrol-10	244	251	1,06	131
Ligasyon-1	218	247	5,94	535
Ligasyon-2	226	142	8,27	222
Ligasyon-4	244	226	7,97	396
Ligasyon-5	180	151	8,03	855
Ligasyon-6	208	225	6,86	626
Ligasyon-8	231	229	7,08	424
Ligasyon-9	218	200	6,56	510
Ligasyon-10	188	159	8,06	540
Ligasyon-12	225	190	3,99	639
Sham-1	219	210	1,83	131
Sham-2	258	250	1,12	105
Sham-3	233	243	1,16	110
Sham-4	200	207	1,26	125
Sham-5	256	240	1,20	145
Sham-6	237	245	1,28	103
Sham-7	229	240	1,37	96
Sham-8	217	227	1,40	110
Sham-9	215	229	0,85	103
Sham-10	211	223	0,77	103

Tablo 9 (devam). Grupların demografik özellikleri

Sıçan grup	Giriş kilosu (gram)	Çıkış kilosu (gram)	Hidroksiprolin (mM/gr doku)	D-dimer (ng/ml)
Ligasyon+ ilaç-1	219	220	5,73	354
Ligasyon+ ilaç-2	216	215	6,38	451
Ligasyon+ ilaç-3	250	242	3,47	326
Ligasyon+ ilaç-4	225	220	4,16	424
Ligasyon+ ilaç-6	219	222	4,80	342
Ligasyon+ ilaç-8	217	214	4,73	159
Ligasyon+ ilaç-9	220	220	5,10	300
Ligasyon+ ilaç-10	213	223	5,30	291
Ligasyon+ ilaç-12	236	201	5,03	242

TARTIŞMA

Karaciğer fibrozisinin progresyonunun yavaşlatılması ile kronik karaciğer hastalarında beklenen yaşam süresinin uzaması ve karaciğer transplantasyon ihtiyacının azalması beklenebilir. Son birkaç dekat içinde yapılmış olan birçok çalışma sayesinde karaciğer fibrozisinin hücresel ve moleküler mekanizmaları ayrıntılı olarak anlaşılabilmiştir (176). Karaciğer fibrozisi yapısal ve metabolik bozukluklara bağlı olarak ortaya çıkan patolojik bir tablodur ve çok sayıda faktör buna neden olabilmektedir. Hepatik stellat hücreler (HSH) fibrozisin oluşmasında anahtar rol oynamaktadır. Aktifleşen bu hücreler miyofibroblast özelliği kazanmakta, kollajen tip 1 ve 3 artışı yanında ekstrasellüler matriks artışı da ortaya çıkmaktadır (177,178). Hepatik fibrozisin, karaciğer parankim dokusunun geri dönüşümsüz olarak yıkılması ve kollajenden zengin dokunun hakimiyetine bağlı olarak ortaya çıktığı bilinmektedir (179,180). Kronik karaciğer zedelenmelerinde yara iyileşmesi cevabının bu şekilde geliştiği kabul edilmektedir (181). Hepatik fibrozis, geri döndürülebilen dönemde tedavi edilirse başarı oranı yüksektir ve siroza gidiş önlenebilir. Bununla birlikte bu kadar bilgi birikimine rağmen, karaciğer fibrozisinin tedavisi için henüz hiçbir ilaç onaylanmamıştır.

Abdel-Salam ve ark. (182) yaptıkları bir çalışmada nadroparin ve enoksaparinin kolestatik karaciğer hasarı tedavisinde yeri olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Özellikle nadroparin, koledoğu bağlanmış sıçanlarda yükselmiş olan serum bilirubin, ALP ve GGT düzeylerinde belirgin düşüşe yol açmış, hepatik nekroz ve fibrozisi ise önemli derecede önlemiştir. Böylece DMAH'ların safra yolu bağlı (SYB) sıçanlarda kolestatik doku hasarında hepatik fonksiyonları koruduğu görülmektedir. Aynı çalışmada enoksaparinin uygulanması ile SYB kontrol grubuna kıyasla hem plazma total bilirubin düzeylerinde %32,5, ALT

düzeylerinde ise %38,4'lük bir düşüş sağlanmıştır. Histolojik olarak değerlendirilen karaciğer hasarı da yine enoksaparin ile tedavi edilen sıçanlarda düşüş göstermiştir. Histomorfometrik yöntemler ile ölçülen kollajen içeren alan yüzdesinde azalma nadroparin ile %91,2, enoksaparin ile %26 olarak bulunmuştur. Bu iki DMAH etkisi arasındaki fark muhtemelen anti-Xa aktivitesi ile kontrol edildiğinde kullanılan enoksaparin dozunun nadroparin dozuna göre daha düşük olmasından dolayıdır. Abdel-Salam ve ark. (182) çalışmasının sonucu olarak, ortak safra duktusunun ligasyonu ile uyarılan bir obstruktif sarılık sıçan modelinde DMAH nadroparin ile tedavi sonucunda serum ALP ve GGT düzeyleri düşerken, enoksaparin ile tedavi sonrası serum ALT düzeylerinde düşüş gözlenmiştir. Hem nadroparin hem de enoksaparin serum bilirubin düzeylerinde düşüşe ve histolojik karaciğer hasarı ve fibrozisinde azalmaya yol açmıştır.

Bizim çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak histomorfometrik yöntem ile değil, biyokimyasal olarak doku hidroksiprolini tayini, immünhistokimyasal olarak karaciğer dokusunda α-SMA ve TGF-β ekspresyonunu ve histopatolojik olarak ışık mikroskobisinde hepatik fibrozisi azalttığını gösterdik. Hidroksiprolin kollajenin yapıtaşlarından biridir ve doku kollajen birikiminin belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilen bir parametredir (183). Çalışmamızda karaciğer dokusu hidroksiprolin düzeyleri dalteparin alan grupta almayana göre önemli derecede azalmış bulundu. Yine ligasyon grubuna ait karaciğerlerde yapılan incelemelerde, pozitif α-SMA reaktivitesi damarların düz kas hücreleriyle birlikte sinüzoidlerin, prolifere olan safra kanallarının etrafında ve fibrotik septalarda gözlendi. Dalteparin grubuna ait karaciğerlerde yapılan incelemelerde ise deney grubuna göre pozitif α-SMA reaktivitesinde belirgin bir azalmanın olduğu gözlendi. Ligasyon grubuna ait karaciğerlerde yapılan incelemelerde yoğun reaktivitenin daha çok vena sentralis etrafında olmak üzere tüm hepatositlerde kuvvetli pozitif TGF-β reaktivitesi gözlenirken, dalteparin grubunda ise yoğun reaktivitenin ligasyon grubunda olduğu gibi daha çok vena sentralis etrafında olmak üzere hepatositlerde zayıf bir reaktivitenin olduğu görüldü. Histolojik olarak dalteparin almayan ligasyon grubundaki sıçanların Masson trichrome boyalı karaciğer kesitleri ışık mikroskobunda incelendiğinde; normal parankimal yapının bağ dokusu artışı sonucu fibröz septumlarla çevrili nodüler yapıya dönüştüğü ve hepatosit dizilerinin bu nodüller içinde adacıklar şeklinde kaldığı görüldü, portal alanlarda belirgin köprüleşmeyle beraber hem porto-portal hem porto-sentral köprüleşme ile birlikte inkomplet siroz ve nekrotik alanların varlığı saptandı, ayrıca sinüzoidlerdeki genişlemeyle birlikte portal alanlarda mononüklear hücre infiltrasyonu ve safra kanalı proliferasyonu ve genişlemesi

görüldü. Dalteparin alan ligasyon grubunda ki sıçanların Masson trichrome boyalı karaciğer kesitleri ışık mikroskobunda incelendiğinde ise fibrozisin önemli ölçüde azalmasıyla birlikte bazı portal alanlarda kısa fibroz, septumlu veya septumsuz fibrozis ile birlikte artan parankima içinde hepatosit dizilerinin nodüller bir adacık içinde olduğu görüldü, ayrıca portal alanlardaki mononüklear hücre infiltrasyonu ve safra kanalı proliferasyonu ve nekrotik alanlarda önemli derecede azalma tesbit edildi. Dolayısıyla doku hidroksiprolin tayini, α-SMA ekspresyonu, TGF-β ekspresyonu ve masson trichrome ile yaptığımız histopatolojik incelemede hepatik fibrozun dalteparin tedavisi ile azaldığını gösterdik.

Her ne kadar Abdel-Salam ve ark. (182) DMAH'lerin hepatik fibroz ve siroza gidişi engellediğini gösterseler de bu ilaçların etki mekanizmaları açısından herhangi bir patogenetik mekanizma ileri sürmemişlerdir. Yapılan çalışmalar sirozda orta ve geniş portal ven ve hepatik ven trombozlarının sık görüldüğünü ve bu trombozların parankimal tükenmeden tam bir siroza ilerleyişte önemli bir rol oynadığını göstermiştir (184). Siroz gelişimine yol açan kronik karaciğer hasarlarında süreğen hepatik fibroz ve buna bağlı vasküler yapı organizasyonunun bozulması ve dolayısı ile vasküler trombozlar yer yer lokal doku hipoksilerine yol açar (185). Yine sirotik nodüller ve birikmiş kollajen doku minör ve major damarlarda mikrotromboz ve makrotrombozlara yol açar. Trombozlara sekonder nekroz, vasküler staz ve hipoksi ise inflamasyon gelişimine neden olur (186). Dalteparin ile mikro ve makrotrombozların engellenerek inflamasyon ve netice itibariyle siroza gidişin önlendiğinin gösterilmesi bu çalışmanın temel amacı idi. Nasıl ki Budd-Chiari hastalığında hepatik venlerdeki tromboz engellenirse veya trombolitiklerle tromboz açılırsa siroza gidiş önlenebilirse, bizim çalışmamızda da mikro ve makrotrombozlar önlenerek siroza gidiş önlenmiş veya kısmen azaltılmıştır (187). Aynı durum sağ kalp yetmezliğine bağlı kardiyak siroz için de geçerlidir. Karaciğerdeki staz diüretik veya pozitif inotroplarla medikal veya cerrahi olarak azaltıldığında siroza gidiş engellenebilmektedir.

Bizim çalışmamızda serum DD düzeylerinin dalteparin tedavisi ile düştüğü ve dalteparin almayan ligasyon grubuna ait karaciğerlerde yapılan incelemelerde fibrinojen boyama ile damarlarda kuvvetli pozitif fibrinojen reaktivitesi gözlenirken, dalteparin alan ligasyon grubunda daha az şiddette bir fibrinojen reaktivitenin olduğunun saptanması SYB deneysel modelinde trombozların azaldığını desteklemektedir .

Herskoviz ve ark. (188) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada farelerde heparin ve DMAH ile ön tedavinin immün aracılı, Concanavalin A (Con A) ile indüklenmiş hepatite karşı koruyucu etkisi incelenmiştir. Con A inokule edilen ve DMAH ön tedavisi

almış olan farelerde karaciğer enzimlerinde yükselme ve proinflamatuvar sitokinlerin salınımı önlenmiş ve Con A ile indüklenmiş hepatit sırasında salınan ve antiinflamatuvar özellikleri olan IL-10 4 kat artmıştır. DMAH'ın Con A ile indüklenmiş karaciğer hasarındaki etki mekanizması TNF-α'nın inflamasyonda merkezi rolü itibariyle T lenfositleri ve makrofajlardan TNF-α üretiminin down regüle edilmesini içerebilir. Diğer bir olasılık heparin ile ilişkili moleküllerin TNF-α üretimi ve sekresyonu üzerindeki etkilerinden ziyade inflamasyonun fizyolojisini etkilemelerinden ötürü antiinflamatuvar etkileridir. DMAH uygulaması ile bir antiinflamatuvar sitokin olan IL-10 üretiminde 4 katlık bir artış gözlenmiştir. IL-10 potent bir pleotropik antiinflamatuvar sitokin olup T helper Tip 1 hücrelerinde, monosit/makrofajlarda ve polimorfonükleer hücrelerde proinflamatuvar sitokinlerin sentezini inhibe eder ve T hücre aktivasyonunu azaltır (189-191). IL-10'un majör kaynaklarından biri karaciğerdir ve endojen IL-10'un deneysel hepatotoksisitedeki yeri birçok fare çalışmasında gösterilmiştir (192,193). Bunlar arasında lipopolisakkarid (LPS) ve galaktozamin ile indüklenmiş hepatotoksisite (193) ve Con A ile indüklenmiş hepatit sayılabilir (194). DMAH ile ön tedavi yapılmış Con A verilmiş farede IL-10'daki artış ve TNF-α daki azalma yanıtı, endojen IL-10'un muhtemelen TNF-α sekresyonunu kısıtlayarak Con A ile indüklenmiş hepatotoksisiteyi azalttığını düşündürmektedir. Con A ile indüklenmiş hepatitte heparin ile ilişkili bileşiklerin hepatoprotektif etkilerinin bir diğer muhtemel mekanizması CD4+T lenfositlerin kan damarlarından migrasyonu ve subendotelyal ECM'nin penetrasyonunun inhibe edilmesidir. Aktive T lenfositlerin ekstravaze olması ve komşu inflamatuvar alanlara infiltrasyonu ECM'nin HS moleküllerini yıkan heparanaz gibi ECM yıkıcı enzimlerin sekresyonu ile ilişkilidir (195). Bunun yanında, heparin HS ile moleküler benzerliği nedeni ile ECM'nin heparanaz aracılı yıkımını inhibe eder ve böylece kandan ekstrasellüler alanlara hücre migrasyonunu inhibe eder (196). Deneysel immün aracılı hepatik hasarın aktive T hücrelerinin ekstravazasyonu ve migrasyonunu gerektirmesi nedeni ile heparin ve DMAH, Con A ile indüklenmiş karaciğer hasarının başlangıcını önleyebilir. Heparinlerin antikoagülasyon amaçlı kullanılmasına karşın bu çalışmadaki sonuçlar karaciğerdeki immün aracılı patolojik durumların inhibisyonu amaçlı kullanılabileceklerini düşündürmektedir. Her ne kadar biz çalışmamızda heparinin trombozu azaltarak hepatik fibrozu ve siroza gidişi önlediğini ileri sürsek de, Herskoviz ve ark. (188) tarafından yapılan bu çalışmada bulunduğu gibi IL-10 artışı ve/veya lökosit migrasyonunun inhibisyonu da patogenezde rol oynamış olabilir. Çalışmamızın sonuçlarına göre bu durum ekarte

edilemediği için, heparin alan SYB deneysel modellerinde serum IL-10 düzeyi ve lökosit migrasyonun araştırıldığı yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Abe ve ark. (197) dalteparinin karaciğerde kronik karbontetraklorid (CCL_4) uygulaması ile oluşan fibrogeneze karşı önleyici etkisi gösterildi. Bu çalışmada CCL_4 ile muameleden sonra dalteparinin nekro-inflamatuvar yanıta etkisinin olmadığı gösterildi. CCL_4'ün hepatotoksik etkileri, CCL_4'ün hepatosit içerisindeki sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) tarafından triklorometil radikali oluşacak şekilde hızla yıkılması ve böylece lipid peroksidasyonu ve membran hasarı oluşması şeklindedir (198,199). Bunu takiben aktive Kupffer hücreleri toksik mediyatörler üretir (örneğin inflamatuvar sitokinler, reaktif oksijen ara bileşikleri ve eikozanoidler) ve böylece parankimal hücrelerde hasar gelişir (200). CCL_4 ile indüklenmiş lipid peroksidasyonunun simultane olarak dalteparin enjeksiyonundan etkilenmediği kanıtlanmıştır ve bu da dalteparinin ne CYP2E1 inhibitörü olarak, ne de bir antioksidan olarak etki göstermediğini düşündürmektedir. Bunun tam aksine, dalteparin tek bir CCL_4 enjeksiyonu sonrası serum HGF düzeylerini arttırmaktadır. Bu bulgu, daha önceden heparinin plazma HGF düzeylerini arttırarak parsiyel hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunu arttırması ile paraleldir (201). Heparinin serum HGF düzeylerini up-regüle etmesindeki mekanizmalar hem üretimi arttırmak hem de ECM bağlı HGF'yi serbestleştirmek şeklindedir. Heparinin çeşitli hücre tiplerinde direkt olarak HGF üretimini arttırdığı bildirilmiştir (202). HGF, bir matriks-ilişkili form olan tek zincirli inaktif bir prekürsör olarak (pro-HGF) üretilir ve aktivasyonu için proteolitik olarak yıkılması gereklidir ve heparinin hücre yüzeyi ya da ECM'den HGF salınımını kolaylaştırdığı gösterilmiştir (203-205). Bu iki yolla dalteparinin HGF'nin up-regüle edilmesi sureti ile karaciğerde rejeneratif yanıtları arttırdığı sonucu çıkarılabilir. Diğer yandan, HGF'nin çeşitli organlarda TGF-β ile ters etkileşim ve MMP aktivitelerinin up-regüle edilmesi gibi birçok karmaşık mekanizmalar ile fibrogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (206, 207). Bu çalışmada, dalteparinin hem akut hem de uzun dönemde CCL_4 uygulamasını takiben serum HGF düzeylerini up-regüle ettiği gösterilmiştir. Bu bulgular, dalteparinin hepatik fibrogenezi HGF indüksiyonu üzerinden önleyebileceğini desteklemektedir. Herskoviz ve ark. (188) çalışmasında antiinflamatuar etkisi saptanan dalteparinin, Abe ve ark.'nın (197) bu çalışmasında CCL_4'ü takiben gelişen nekroinflamatuvar yanıtı hafifletmemektedir ve böylece dalteparinin anti-inflamatuvar özellikleri olmasa da anti-fibrogenetik özellikleri olduğu görülmektedir. Dalteparinin anti-fibrogenetik etkilerinin mekanizması HGF up-regüle edilmesi, transforming büyüme faktörü TGF-β'in ise down regüle edilmesi ve HSH üretiminin direkt olarak inhibe olması ile

açıklanabilir. Bu çalışmadan farklı olarak SYB metodu ile oluşturduğumuz hepatik fibrozis modeli çalışmamızda, dalteparin verdiğimiz grupta karaciğerde α-SMA boyama ile HSH proliferasyonun inhibisyonunu ve immün boyamada TGF-β düzeyinin düşerek fibrozisin azaldığını gösterdik fakat HGF düzeyine bakmadık, bunun için SYB sıçanlarda HGF düzeyine bakılabilir bu konuda yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Güncel olarak Shi ve ark (208) tarafından yapılan bir çalışmada heparin ve DMAH'ın kronik hepatit B'li hastalarda hepatik fibroziste faydalı olduğu gösterilmiş ve bu bilgi heparin ve DMAH'ın kronik karaciğer hastalığı bulunan hastalarda klinik olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür. Kanamaya yatkınlık bakımından DMAH'ın fraksiyone olmayan heparine göre daha düşük risk taşıdığına dikkat çekilmektedir. Bu avantaj, koagülasyon faktör sentezinde azalma ve trombositopeni gelişiminden dolayı ilerlemiş karaciğer hastalığı bulunan hastalarda klinik kullanımda önem kazanmaktadır. Böylece dalteparinin birçok kronik karaciğer hastalığında hepatik fibrozun önlenmesinde umut vadeden bir terapötik ajan olabilir. Bu konuda yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Deneysel olarak Con A ve CCL_4 ile oluşturulmuş hepatik fibrozisde denenmiş olan dalteparinin daha önce safra yolu ligasyonuna bağlı gelişen hepatik fibrozis üzerinde etkinliği konusunda çalışma olmadığından biz bu çalışmayı SYB modelinde gerçekleştirdik. Diğer taraftan sıçanlarda SYB modeli insanlarda ekstrahepatik safra yolu tıkanmasına sekonder gelişen hepatik fibroz ve sirozun histopatolojik ve klinik yönlerini en güzel taklit eden deneysel modeldir (209). Bu model araştırmacılara ortalama 4 hafta sonunda sirozla sonuçlanarak hepatik fibrozisin bütün gelişimsel evrelerini detaylıca çalışma olanağı verir. Bizim çalışmamızda bunu desteklemektedir, karaciğerin histopatolojik incelemesinde hepatik fibrozis ve nodül gelişimi gözlenmiştir. Ayrıca SYB modelinde diğer siroz modellerine göre komplikasyonlar ve mortalite daha düşük görünmektedir. Bizim çalışmamızda da mortalite düşük olup sadece ligasyon grubundan bir sıçan 30. gününde safra kacak peritoniti nedeniyle ve dalteparin grubundan bir sıçan çalışmanın 16. gününde batın içi apse nedeniyle çalışma dışı bırakılmıştır. Normalde kilo kaybının hem ligasyon hem de dalteparin alan ligasyon grubunda olması beklenirken, çalışmamızda sadece dalteparin alan ligasyon grubunda kilo kaybı saptanması bir çelişki oluşturmaktadır. Bu durum iki yolla açıklanabilir; bunlardan birincisi dalteparin alan grup ilaç yan etkisi nedeniyle kilo kaybetmiş olabilir. Diğeri ise dalteparin almayan ligasyon grubundaki sıçanlar daha sirotik oldukları için daha çok su, tuz tutulumuna maruz kaldıklarından, bu grupta kilo kaybının istatiksel olarak anlamlı derecede ortaya çıkması engellenmiş olabilir.

Sonuç olarak farklı DMAH'ların farklı çalışmalarda değişik yollarla oluşturulmuş hepatik fibrozis üzerine etkinlikleri mevcut olup kendi çalışmamızda dalteparinin bu etkisi gösterilmiştir. Hepatik fibrozisin ve sirozun önlenmesinde DMAH'ların etkisi multifaktöryel gibi görünmektedir. Karaciğer dokusunda IL-10 artışı, lenfosit migrasyonunun engellenmesi, HGF artışı bu nedenlerden bazılarıdır. Bu çalışmada ise SYB sıçanlarda vasküler trombozların dalteparin ile önlenmesinin hepatik fibrozis gelişimini engelleyebileceği saptanmıştır. Günümüzde hepatik fibrozisin tedavisi üzerine çok sayıda çalışma olmakla birlikte tedavi için daha fazla kanıta ihtiyaç olduğu açıktır, bu deneysel çalışmamız bu açıdan yol göstericidir.

SONUÇLAR

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı, Biyokimya Anabilim Dalı, Histoloji Anabilim Dalı ile Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın sonucunda;

1. Serum DD düzeyleri dalteparin alan ligasyon grubunda sadece ligasyon yapılan gruba göre daha düşük saptandı.
2. Karaciğer doku hidroksiprolin düzeyleri dalteparin alan ligasyon grubunda sadece ligasyon yapılan gruba göre daha düşük bulundu.
3. Işık mikroskobisi altında histopatolojik incelemede nekroinflamatuar aktivite ve Masson trichrome boyamada fibrozis skoru değerlendirmesi dalteparin alan ligasyon grubunda sadece ligasyon yapılan gruba göre daha düşük bulundu.
4. Karaciğer dokusunun immünhistokimyasal boyamasında α-SMA reaktivitesi dalteparin alan ligasyon grubunda sadece ligasyon yapılan gruba göre önemli derecede azalmıştır.
5. Karaciğer dokusunun immünhistokimyasal boyamasında TGF-β reaktivitesi dalteparin alan ligasyon grubunda sadece ligasyon yapılan gruba göre önemli derecede azalmıştır.
6. Karaciğer dokusunun immünhistokimyasal boyamasında fibrinojen reaktivitesinin dalteparin alan ligasyon grubunda sadece ligasyon yapılan gruba göre önemli derecede azalmıştır.

ÖZET

Sirozda orta ve geniş portal ven ve hepatik ven trombozları sık görülür ve bu trombozlar parankimal tükenmeden tam bir siroza ilerleyişte önemli bir rol oynarlar. Bu çalışmada antitrombotik ajan dalteparinin hepatik fibrozis ve siroz gelişimi önlemedeki etkinliği incelenmiştir.

Kırk adet Wistar-Albino cinsi erişkin sıçan çalışmaya dahil edilmiş; sağlıklı kontrol (n=10), sham (n=10), safra yolu ligasyonu (n=10) ve safra yolu ligasyonu+dalteparin (n=10) (50 IU/kg/gün intraperitoneal) olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır. Otuzbeşinci gün sonunda bütün sıçanlar sakrifiye edilmiştir. Karaciğerdeki vasküler trombozların varlığını tayin etmek ve dalteparinin etkinliğini saptamak için bütün hayvanların serumlarında D-dimer düzeyi, karaciğer dokularında ise immünhistokimyasal olarak fibrinojen boyama yapıldı. Işık mikroskobisi altında histopatolojik incelemede nekroinflamsyonun derecesi ve hepatik fibrozisin evresi değerlendirilmiştir. Karaciğerdeki hepatik fibrozisi saptamak ve dalteparinin etkinliğini değerlendirmek için biyokimyasal yöntemle doku hidroksiprolin tayini, immünhistokimyasal boyama ile alfa düz kas aktin, transforme edici büyüme faktörü beta reaktivitesi bakılmıştır.

Otuzbeş günlük dalteparin tedavisi ile safra yolu bağlanmış sıçanlarda serum D-dimer düzeyinin düştüğü ($p<0,05$) ve karaciğer dokusu fibrinojen reaktivitesinin azaldığı ($p<0,001$) saptandı. Benzer şekilde 35. günün sonunda histopatolojik incelemede nekroinflamatuar aktivite derecesi ve fibrozis skorları azalmış ($p<0,001$) bulundu. İmmünhistokimyasal boyamada alfa düz kas aktin ($p<0,0001$) ve transforme edici büyüme faktörü beta ($p<0,0001$) reaktivitesi dalteparin tedavisi ile daha düşük bulundu. Biyokimyasal olarak bakılan doku hidroksiprolin düzeyleri dalteparin tedavisi ile azaldı ($p<0,01$).

Sonuç olarak, safra yolu bağlı sıçanlarda dalteparin tedavisi karaciğer dokusunda tromboz, inflamasyon ve hepatik fibroz gelişimini engeller.

Anahtar kelimeler: Hepatik fibrozis, tromboz, dalteparin

THE EFFICIENCY OF ANTITHROMBOTIC DALTEPARIN ON RETARDATION OF HEPATIC FIBROSIS IN BILIARY OBSTRUCTED RATS

SUMMARY

Enlarged portal vein and hepatic vein thrombosis are common complications of cirrhosis and these thromboses play an important role in the development of complete cirrhosis before the failure of the paranchyme. In this study, the effects of an antithrombotic agent dalteparin on the prevention of hepatic fibrosis and the development of cirrhosis.

Forty Wistar-Albino adult rats are enrolled in this study, and divided into four groups as healthy controls (n=10), sham (n=10), bile duct ligation (n=10) and bile duct ligation + dalteparin (50 IU/kg/day via intraperitoneal route) (n=10). At the end of thirthy-five days all rats have been sacrificed. Serum levels of D-dimer as well as immunohistochemical fibrinogen staining was performed in the liver tissue samples of all animals to determine the presence of vascular thrombosis in the liver and the effectivity of dalteparin. The degree of necro-inflammation and the grade of hepatic fibrosis were evaluated histopathologically with light microscobe. Tissue hydroxiproline with biochemical methods and α-Smooth muscle actin, Transforming growth factor-β reactivity with immunohistochemical methods were evaluated to determine the hepatic fibrosis and the effectivity of dalteparin.

The serum levels of D-dimer ($p<0,05$) and the fibrinogen reactivity within the liver tissues ($p<0,001$) were observed to be decreased in the bile duct ligated animals after thirty-five days dalteparin treatment. Similarly, the degrees of the necroinflammatory activity and fibrosis scores were observed to be decreased ($p<0,001$) with the histopathological evaluation

at the end of thirty-five days. With the immunohistochemical staining, the reactivities of α-Smooth muscle actin ($p<0,0001$) and Transforming growth factor-β ($p<0,0001$) were observed to be decreased with dalteparin treatment. The levels of tissue hydroxiproline determined with biochemical methods were also decreased with dalteparin treatment ($p<0,01$).

As a result, dalteparin treatment prevents the development of thrombosis, inflammation and hepatic fibrosis in the liver tissues of bile duct ligated rats.

Key words: Hepatic fibrosis, thrombosis, dalteparin

KAYNAKLAR

1. Eken H, Öztürk H, Öztürk H, Büyükbayram H. Dose-related effects of dexamethasone on liver damage due to bile duct ligation in rats. World J Gastroenterol 2006;12:5379-83.

2. Wu J, Norton PA. Animal models of liver fibrosis. Scand J Gastroenterol 1996;31:1137-43

3. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Robbins Temel Patoloji, Çeviri Editörü: Çevikbaş U, 7. baskı, İstanbul, Nobel, 2003:16;596-9.

4. Pinzani M. Liver fibrosis. Springer Semin, Immunopathol, 1999;21:475-90.

5. Shimizu I, Ma YR, Mizobuchi Y, Liu F, Miura T, Nakai Y, et al. Effects of sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. Hepatology 1999;29:149-60.

6. Baroni GS, D'Ambrosio L, Curto P, Casini A, Mancini R, Jezequel AM, et al. Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. Hepatology 1996;23:1189-99.

7. Tahan G, Tarcin O, Tahan V, Eren F, Gedik N, Sahan E, et al. The effects of N-acetylcysteine on bile duct ligation induced liver fibrosis in rats. Dig Dis Sci 2007;52:3348-54.

8. Abraham L. Kierszenbaum. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Çeviri Editörü: Demir R, Ankara, Palme Kitabevi, 2006;17:467.

9. Williams P, Warwick R, Dyson M, Bannister LH: Gray's Anatomy. 37th ed, Edinburgh. Churchill Livingstone, 1992;1384-96.

10. Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM: Gray's Anatomy for Student. Çeviri Editörü: Yıldırım M, Ankara, Güneş Kitabevi, 2007;4:285-306.

11. Guyton AJ, Fizyoloji, Çeviri Editör: Türk Fizyolojik Bilimler Derneği. 5. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 2008; 428-9, 585-94.

12. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic Histology. 7th Ed. İstanbul. Appleton & Lange,1993:380-94.

13. Moore KL, Agur AMR. Temel Klinik Anatomi, Elban A Çeviri editörü: Elban A, 2.Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 2006;3:168-80.

14. Bayramiçli M, Deneysel Mikrocerrahi, 1. baskı, İstanbul: ARGOS, 2005;6:684-7.

15. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. Basic Pathology. 6th ed. W.B. Philadelphia. Saunders Company, 2000:516-9.

16. Guyton, Hall, Tıbbi Fizyoloji, Çeviri editörü : Çavuşoğlu H, 10. baskı, İstanbul, Nobel, 2001;724,749-52.

17. Ganong WF, Tıbbi Fizyoloji, Çeviri Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, 20.baskı, İstanbul: Nobel, 2002;26:483-9.

18. Tekelioğlu M. Özel Histoloji, İnce Yapı ve Gelişme. Ankara, Antıp A.Ş. 2002;79-86.

19. Şentürk H. Serbest radikal hasarının hepato-biliyer sistem hastalıklarındaki rolü Kocatepe Tıp Dergisi 2004:5;1-8.

20. Junqueira LC, Carneiro J, RO Kelley, Temel Histoloji, Aytekin Y (Çeviri editörü), Barış Kitapevi 1998;16:307-22.

21. Friedman SL. Liver fibrosis — from bench to bedside. J Hepatol 2003;38:38–53.

22. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. J Clin Invest 2007;117:539–48.

23. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest 2005;115:209–31.

24. Bortolotti F, Guido M. Reversal of liver cirrhosis: a desirable clinical outcome and its pathogenic background. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2007;44(4):401-6.

25. Lidosfsky SD. Jaundice. In:Bacon BR, O'Grady JG, Di Bisceglie AM, Lake JR (Eds), Comprehensive clinical hepatology. Mosby Elsevier ;2006:83-99.

26. Kadrademir S, Astarcıoğlu H, Sokmen S. Mirizzi's syndrome: diagnostic and surgical considerations in 25 patients. J Hepatobiliary Pancreat Surg 2000;7:72-7.

27. Benger JR, Thompson MH. Annular pancreas and obstructıve Jaundice. Am J Gastroenterol 1997;92:713-4.

28. Terada T, Hirata K, Hisada Y, Hoshii Y, Nakanuma Y. Obstructive jaundice caused by the deposition of amyloid-like substance inthe extrahepatic bile ducts in patient with multipl myeloma. Histopathology, 1994; 24: 485-7.

29. Colina F, Garcia-Prats MD, Moreno E. Amputation neuroma of the hepatic hilum after orthotopic liver transplantation. Histopathology, 1994;25:151-7.

30. Gerhards MF, van Gulik TM, Bosma A. Long-term survival after resection of proximal bile duct carcinoma (Klatskin tumors). World J Surg, 1999;23:91-6.

31. Tanoue K, Kanametsu T, Matsumata T, Shirabe K, Sugimachi K, Yasunaga C, et al. Successful surgical treatment of hepatocellular carcinoma invading into biliary tree. HPB Surg, 1991;4:237-44.

32. Chan C, Medina-Franco H, Bell W, Lazenby A, Vickers S. Carcinoid tumor of the hepatic duct presenting as a Klatskin tumor in an adolescent and review of the literature. Hepatogastroenterology, 2000;47:519-21.

33. Howard ER, Heaton N. Benign extrahepatic bile duct obstruction. In: Howard ER, ed., Surgery of liver disease in children. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1991:94-101.

34. Davenport M, Howard ER. Spontaneous perforation of the bile duct in infancy. In: Howard ER, ed., Surgery of liver disease in children. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1991:91-3.

35. Spitz L, Orr JD, Harries JT. Obstructive jaundice secondary to chronic mid-gut volvulus. Arch Dis Child, 1983;58:383-5.

36. Martinez-Urrutia MJ, Vasquez-Estevez J, Larrauri J, Diez Pardo JA. Gastric heterotopy of the biliary tract. J Ped Surg, 1990;25:356-7.

37. Ruymann FB, Raney RB, Crist WM, Lawrence W, Lindberg RD, Soule EH, et al. Rhabdomyosarcoma of the biliary tree in childhood. A report from the intergroup rhabdomyosarcoma. Cancer, 1985;56:575-81.

38. Shorter RG, Baggenstoss AH. Extrahepatic cholestasis. III . Chronology of histologic changes in the liver. Am J Clin Pathol, 1959;32:7-10.

39. Christoffersen P, Poulsen H. Histological changes in human liver biopsies following extrahepatic biliary obstruction. Acta Pathol Microbiol Scand (suppl), 1970;212:150-7.

40. Bianchi L,Meinecke R. Hisologie des Leberpunktates und Ikterus. In:Beck K (Ed), Ikterus. Stuttgart: Schattuer Verlag, 1968 p.351-6.

41. Van Eyken P, Sciot R, Desmet VJ. A cytokeratin immünohistochemical study of cholestatic liver disease: evidence that hepatocytes can Express ‘bile duct-type’ cytokeratin. Histopathology 1989;15:125-36.

42. Matzen P, Junge J, Christoffersen P, Poulsen H. Reproducibility and accuracy of liver biopsy findigs suggestive of an obstructive cause of jaundice. In: Brunner H, Thaler H (Eds), Hepatology, a Festschrift for Hans Popper. New York: Raven Pres;1985 p.285-93.

43. Desmet VJ. Morphologic and histochemical aspects of cholestasis. In: Popper H, Schaffner F (Eds), Progress in liver diseases, vol. 4, New York: Grune Stratton; 1972:ch 7,97-132.

44. Desmet VJ. Cholestasis: extrahepatic obstruction and secondary biliary cirrhosis. In: Macsween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ, Burt AD, Portmann BC, (Eds), Pathology of the liver, 3rd ed. Edinburgh: Churcill Livingstone, 1994 p.425-76.

45. Heimann R. Factors producing liver cell necrosis in experimental obstruction of the common bile duct. J Pathol Bacteriol, 1965;90:479-85.

46. Gall EA, Dobrogorski O. Hepatic alterations in obstructive jaundice. Am J Clin Pathol 1964;41:126-39.

47. Portmann B, Koukoulis G. Pathology of the liver allograft. In: Berry CL, Ed. Current topic in pathology, vol. 92. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag,1999:61-105.

48. Bunton GL, Cameron R. Regeneration of liver after biliary cirrhosis. Ann NY Acad Sci 1963;111:412-21.

49. Abdel-Aziz G, Lebeau G, Rescan PY. Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat. Am J Pathol 1990;137:1333-42.

50. Yokoi H. Morphologic changes of the liver in obstructive jaundice and its reversibility-with special reference to morphometric analysis of ultrastructure of the liver in dogs. Acta Hepatol Jpn 1983;24:1381-91.

51. Melzer E, Krepel L, Ronen J, Bar-Meir S. Recovery of hepatic clearance and extraction following a release of common bile duct obstruction in the rat. Res Exp Med 1992;192:35-40.

52. Bhathal PS, Gall JAM. Deletion of hyperplastic biliary epithelial cells by apoptosis following removal of the proliferative stimulus. Liver 1985;5:311-25.

53. Desmet VJ, Callea F. Cholestatic syndromes of infancy and childhood. In: Zakim D, Boyer TD (Eds), Hepatology. A textbook of liver disease, vol 2nd ed. Philadelphia:Saunders, 1990:1355-95.

54. Scobie BA, Summerskill WHJ. Hepatic cirrhosis secondary to obstruction of the biliary system. Am J Dig Dis 1965;10:135-46.

55. Griffiths MR, Shepherd M, Ferier R, Schuppan D, James OFW, Burt AD. Light microscopic and ultrastructural distribution of type VI collagen in human liver: alterations in chronic biliary disease. Histopathology 1992;21:335-44.

56. Sedlaczek N, Jia JD, Bauer M, Herbst H, Ruehl M, Hahn EG, et al. Proliferatif bile duct epithelial cells are a major source of connective tissue growth factor in rat biliary fibrosis. Am J Pathol, 2001;158:1239-44.

57. Koda W, Harada K, Tsuneyama K. Evidence of the participation of peribiliary mast cells in regulation of the peribiliary vascular plexus along the intrahepatic biliary tree. Lab Invest 2000;80:1007-17.

58. Lee E, Ross BD, Haines JR. Effect of experimental bile duct obstruction on critical biosynthetic functions of the liver. Br J Surg 1972;59:564-8.

59. Cameron SR, Hou PC. Biliary cirrhosis. Edinburgh: Oliver Boyd, 1962;52.

60. Rappaport AM, MacPhee PJ, Fisher MM, Philips MJ. The scarring of the liver acini (Cirrhosis). Tridimensional and microcirculatory considerations. Virchows Arch (A), 1983;402:107-37.

61. Bonkovsky HL, Ponka P, Bacon BR. An update on iron metabolism: summary of the Fifth International Conference on Disorders of Iron Metabolism. Hepatology 1996;24:718-29.

62. Mori T, Okanoue T, Sawa Y. Defenestration of the sinusoidal endothelial cell in a rat model of cirrhosis. Hepatology 1993;17:891-7.

63. Gaiani S, Bolondi L, Li Bassi S. Prevalence of spontaneous hepatofugal portal flow in liver cirrhosis. Clinical and endoscopic correlation in 228 patients. Gastroenterology 1991;100:160-7.

64. Hou PC, McFadzen AJS. Thrombosis and intimal thickening in the portal system in cirrhosis of the liver. J Pathol Bact 1965;89:473-80.

65. Goodman ZD, Ihsak KG. Occlusive venous lesions in alcoholic liver disease. A study of 200 cases. Gastroenterology 1982;83:786-96.

66. Burt AD, Macsween RN. Hepatic vein lesions in alcoholic liver disease: retrospective biopsy and necropsy study. J Clin Pathol 1986;39:63-7.

67. Wanless IR, Wong F, Blendis LM. Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: Possible role in development of parencimal extinction and portal hypertension. Hepatology 1995;21:1238-47.

68. Tanaka M, Wanless IR. Pathology of the liver in Budd-Chiari syndrome: portal vein thrombosis and the histogenesis of venocentric cirrhosis, veno-portal cirrhosis, and large regenative nodules. Hepatology 1998;27:488-96.

69. Pichiotti R, Mingazzini PL, Scucchi L. Correlations between sinusoidal pressure and liver morphology in cirrhosis. J Hepatol 1994;20:364-9.

70. Sherman IA, Pappas SC, Fisher MM. Hepatic microvascular changes associated with development of liver fibrosis and cirrhosis. Am J Physiol 1990;258:460-5

71. Syrota A, Vinot JM, Paraf A, Roucayrol JC. Scintillation splenoportography hemodynamic and morphological study of the portal circulation. Gastroenterology 1976;71:652-9.

72. Medina J, Arroyo AG, Sanchez-Madrid F, Moreno-Otero R. Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. Hepatology 2004;39:1185-95.

73. Pugh CW, Ratcliffe P. Regulation of anjiogenesis by hypoxia: role of the HIF system, Nature Med 2003;9:677-84.

74. Murohara T, Asahara T, Silver M, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. J Clin Invest 1998;101;2567-78.

75. Ferrara N, Gerber H, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nature Med 2003;9:669-76.

76. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. Nature Med 2003;9:685-93.

77. Wack KE, Ross MA, Zegarra V. Sinusoidal ultrastructure evaluated during the revascularization of regenerating rat liver. Hepatology 2001;33:363-78.

78. Garcia-Monzon C, Sanchez-Madrid F, Garcia-Buey L. Vascular adhesion moleculer expression in viral chronic hepatitis: evidence of neoanjiogenesis in portal tracts. Gastroenterology 1995;108:232-41.

79. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nature Med 1995;1:27-31.

80. Mazzanti R, Messerini L, Monsacchi L. CVH induced by hepatitis C but not hepatitis B virus infection correlates with increased liver angiogenesis. Hepatology 1997;25:229-34.

81. Ohmori S, Shiraki K, Sugimoto K. High expression of CD34-positive sinusoidal endothelial cells is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with HCV associated chronic liver diseases. Human Pathol, 2001;32:1363-70.

82. Timpl R, Wieddemann H, van Delden V. A network model for he organisation of type IV collagen molecules in basement. Eur J Biochem 1981;120:203-11.

83. Medina J, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R. Review article: immunopathogenic and therapeutic aspects of autoimmune hepatitis. Aliment Pharmacol Ther 2003;17:1-16.

84. Masyuk TV, Ritman EL, LaRusso NF. Hepatic artery and portal vein remodeling in rat liver: vascular response to selective cholangiocyte proliferation. Am J Pathol 2003;162:1175-82.

85. Popper H, Elias H, Petty D. Vascular pattern of the cirrhotic liver. Am J Clin Pathol 1952;22:717-29.

86. Hales MR, Allan JS, Hall EM. Injection-corrosion studies of normal and cirrhotic livers. Am J Pathol 1959;35:909-41.

87. Desmet VJ, Roskams T. Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. J Hepatol 2004;40:860-7.

88. Koo A, Liang IY, Cheng KK. Effect of the ligation of hepatic artery on the microcirculation in the cirrhotic liver in the rat. Aust J Exp Biol Med Sci 1976;54:287-95.

89. Sokal EM, Trivedi P, Portmann B, Mowat AP. Adaptive changes of metabolic zonation during the development of cirrhosis in growing rats. Gastroenterology 1990;99:785-92.

90. Gumucio JJ, Chianale J. Liver cell heterogeneity and liver function. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schacter D, Shafritz DA (Eds). The liver: biology and pathobiology 2nd ed. New York: Raven Pres;1988:931-47.

91. Cohen PJ. Change in the distribution of succinic dehydrogenase within the rat hepatic lobule after ligation of the common bile duct. Anat Rec 1965;153:429-43.

92. Nuber R, Teutsch HF, Sasse D. Metabolic zonation in thioacematide-induced liver cirrhosis. Histochemistry 1980;69:277-88.

93. Van Noorden CJ, Frederiks WM, Aronson DC. Changes in the acinar distrubition of some enzymes involved in carbohydrate metabolism in rat liver parenchyma after experimentally induced cholestasis. Virchows Arch B Cell Pathol 1987;52:501-11.

94. Sokal EM, Mostin J, Buts JP. Liver metabolic zonation in rat biliary cirrhosis: Distribution is reverse of that in toxic cirhosis. Hepatology 1992;15:904-8.

95. Gebhardt R, Reichen J. Changes in distribution and activity of glutamine synthetase in carbon tetracholaride-induced cirrhosis in the rat: potential role in hyperammonemia. Hepatology 1994;20:684-91.

96. Racine-Samson L, Scoazec JY, D'Errico A. The metabolic organization of the adult human liver: A comarative study of normal, fibrotic and cirrhotic liver tissue. Hepatology 1996;24:104-13.

97. Wood AJ, Villeneuve JP, Branch RA, Rogers LW, Shand DG. Intact hepatocyte theory of impaired drug experimental cirrhosis in the rat. Gastroenterology 1979;76:1358-62.

98. Crawford AR, Lin X-Z, Crawford JM. The adult human liver biopsy: a quantitative reference Standard. Hepatology 1998;28:323-31.

99. Wanless IR, Shiota K. The pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis and other fatty liver diseases: A four-step model including the role of lipid release and hepatic venular obstruction in the progression to cirrhosis. Sem Liver Dis 2004;24:99-108.

100. Wanless IR, Shimamatsu K. Phlebitis in viral and autoimmune chronic hepatitis and primary biliary cirrhosis. Possible role in the histogenesis of cirrhosis. Mod Pathol 1997;10:147.

101. Wanless IR, Nakashima E, Sherman M. Regression of human cirrhosis: morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. Arch Pathol Lab Med 2000;124:1599-607.

102. Williams R, Smith P, Spicer E. Venesection therapy in idiopathic haemochromatosis. Q J Med 1969;38:1-16.

103. Bunton GL, Cameron GR. Regeneration of liver after biliary cirrhosis. Ann NY Acad Sci 1963;111:412-21.

104. Yeong ML, Nicholson GI, Lee SP. Regression of biliary cirrhosis following choledochal cyst drainage. Gastroenterology 1982;82:332-5.

105. Powell LW, Kerr JF. Reversal of cirrhosis in idiopathic haemochromatosis following long-term intensive venesection therapy. Aust Ann Med 1970;19:54-7.

106. Blumberg RS, Chopra S, Ibrahim R, et al. Primary hepatocellular carcinoma in idiopathic hemochromatosis after reversal of cirrhosis. Gastroenterology 1988;95:1399-402.

107. Dufour JF, DeLellis R, Kaplan MM. Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. Ann Intern Med 1997;127:981-5.

108. Falkmer S, Samuelson G, Sjolin S. Penicillamin-induced normalization of clinical signs and liver morphology and histochemistry in a case of Wilson's disease. Pediatrics 1970;45:260-8.

109. Kaplan MM, DeLellis RA, Wolfe HJ. Sustained biochemical and histologic remission of primary biliary cirrhosisin response to medical treatment. And Intern Med 1997;126:682-8.

110. Dunn MA, Cheever AW, Paglia LM. Reversal of advanced liver fibrosis in rabbits with Schistosomiasis japonica. Am J Trop Med Hyg 1954;50:499-505.

111. Greenwel P, Geerts A, Ogata I. Liver fibrosis. In : Arias I, Boyer J, Fausto N. (Eds). The liver biology and pathobiology, 3nd ed. New York: Raven; 1994. p1367-81.

112. Arthur MJ. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. Gastroenterology 2000;122:1525-8.

113. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest 2005;115:209-18.

114. Issa R. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. Gastroenterology 2004;126:1795-808.

115. Blomback B, Hessel B, Hogg D, Therkildsen LA two-step fibrinogen–fibrin transition in blood coagulation. Nature 1978;275:501-5.

116. Greenberg CS, Devine DV, McCrae KM. Measurement of plasma fibrin D-dimer levels with the use of a monoclonal antibody coupled to latex beads. Am J Clin Pathol 1987;87:94-100.

117. Froehling DA, Daniels PR, Swensen SJ. Evaluation of a quantitative D-dimer latex immunoassay for acute pulmonary embolism diagnosed by computed tomographic angiography. Mayo Clin Proc 2007;82:556-60.

118. John MA, Elms MJ, O'Reilly EJ, Rylatt DB, Bundesen PG, Hillyard CJ. The simplired D dimer test: a novel assay for the detection of crosslinked fibrin degradation products in whole blood. Thromb Res 1990;58:273-81.

119. Akay T. Genel Histoloji. Ankara, Palme Yayıncılık, 1995;56-60.

120. Hautekeete ML, Geerts A. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. Virchows Arch 1997;430(3):195-207.

121. Enzan H, Himeno H, Iwamura S, Saibara T, Onishi S, Yamamoto Y, et al. Immunohistochemical identification of Ito cells and their myofibroblastic transformation in adult human liver. Virchows Arch 1994;424(3):249-56.

122. Ramadori G, Veit T, Schwögler S, Dienes HP, Knittel T, Rieder H, et al. Expression of the gene of the α- smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells. Virchows Archiv B Cell Pathol 1990;59:349-57.

123. Schmitt GA, Krüger S, Bochard F, Gabbiani G, Denk H. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinuzoidal cells of normal and diseased human livers. Am J Pathol 1991;138:1233-42.

124. Urtasun R, Nieto N. Hepatic stellate cells and oxidative stres. Rev Esp Enferm Dig 2007;99:223–30.

125. Friedman Sl. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. J Biol Chem 2000;275:2247–50.

126. Gressner A.M. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells J. Hepatol 1995;2:28–36.

127. O'kane S, Ferguson MW. Transforming growth factor betas and wound healing. Int J Biochem Cell Biol 1997;29:63-78.

128. Bıssell DM, Wang SS, Jarnagın WR. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. J Clin Invest 1995;96:447-455.

129. İliçin G, Biberoğlu K, Süleymanlar G, Ünal S. İç Hastalıkları Güneş tıbkitabevi 2005;2:1983.

130. Khandoga A, Stampfl A, Takenaka S, Schulz H, Radykewicz R, Kreyling W, et al. Ultrafine particles exert prothrombotic but not inflammatory effects on the hepatic microcirculation in healthy mice in vivo Circulation 2004;109:1320-5.

131. Friedman SL. Hepatic Fibrosis Jn: Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC editors. Schiff's Diseases of the Liver, 10th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p.395-418.

132. Dixon JB, Bhathal PS, Hughes NR, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss. Hepatology 2004;39:1647–54.

133. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis -a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. J Hepatol 2007;46(5):955-75.

134. Dufour JF, DeLellis R, Kaplan MM. Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. Ann Intern Med 1997;127(11):981-5.

135. Poynard T, McHutchison J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, et al. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Gastroenterology 2002;122(5):1303-13.

136. Moreno MG, Muriel P. Remission of liver fibrosis by interferon-alpha 2b. Biochem Pharmacol 1995;50:515–20.

137. Kurikawa N, Suga M, Kuroda S, Yamada K, Ishikawa H. An angiotensin II type 1 receptor antagonist, olmesartan medoxomil, improves experimental liver fibrosis by uppression of proliferation and collagen synthesis in activated hepatic stellate cells. Br J Pharmacol 2003;139:1085–94.

138. Türkay C, Yönem O, Arıcı S, Koyuncu A, Kanbay M. Effect of Angiotensin converting Enzyme Inhibition on Experimental Hepatic Fibrogenesis. Dig Dis Sci. 2007;on-line.

139. Raetsch C, Jia JD, Boigk G, Bauer M, Hahn EG, Riecken EO, et al. Pentoxifylline down regulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis. Gut 2002;50:241–7.

140. Degott C, Zafrani ES, Callard P, Balkau B, Poupon RE, Poupon R. Histopathological study of primary biliary cirrhosis and the effect of ursodeoxycholic acid treatment on histology progression. Hepatology 1999;29:1007–12.

141. Pietrangelo A, Borella F, Casalgrandi G, Montosi G, Ceccarelli D, Gallesi D, et al. Antioxidant activity of silybin in vivo during long-term iron overload in rats. Gastroenterology 1995;109:1941–9.

142. Sakaida I, Hironaka K, Kimura T, Terai S, Yamasaki T, Okita K. Herbal medicine Sho saiko-to (TJ-9) increases expression matrix metalloproteinases (MMPs) with reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in rat stellate cell. Life Sci 2004;74:2251–63.

143. Rockey DC, Chung JJ. Interferon gamma inhibits lipocyte activation and extracellular matrix mRNA expression during experimental liver injury: implications for treatment of hepatic fibrosis. J Investig Med 1994;42:660–70.

144. Marra F, Efsen E, Romanelli RG, Caligiuri A, Pastacaldi S, Batignani G, et al. Ligands of peroxisome proliferator activated receptor gamma modulate profibrogenic and Proinflammatory actions in hepatic stellate cells. Gastroenterology 2000;119(2):466-78.

145. Galli A, Crabb DW, Ceni E, Salzano R, Mello T, Svegliati-Baroni G, et al. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro. Gastroenterology 2002;122(7):1924-40.

146. Ding X, Saxena NK, Lin S, Xu A, Srinivasan S, Anania FA. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology. Am J Pathol 2005;166:1655–69.

147. Yoshiji H, Noguchi R, Kuriyama S, Ikenaka Y, Yoshii J, Yanase K, et al. Imatinib mesylate (STI-571) attenuates liver fibrosis development in rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005;288:907–13.

148. Dooley D, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, et al. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. Gastroenterology 2003;125:178–91.

149. Gnainsky Y, Spira G, Paizi M, Bruck R, Nagler A, Abu-Amara SN, et al. Halofuginone, an inhibitor of collagen synthesis by rat stellate cells, stimulates insulin-like growth factor binding protein-1 synthesis by hepatocytes. J Hepatol 2004;40:269–77.

150. Rockey DC, Chung JJ. Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing. J Clin Invest 1996;98:1381–8.

151. Dekel R, Zvibel I, Brill S, Brazovsky E, Halpern Z, Oren R. Gliotoxin ameliorates development of fibrosis and cirrhosis in a thioacetamide rat model. Dig Dis Sci 2003;48:1642-7

152. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. J Clin Invest 2007;117:539–48.

153. Mechanisms of Action, Pharmacokinetics, Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin Dosing, Monitoring, Efficacy, and Safety Chest 2001;119:64-94.

154. Hirsh J, Raschke R. Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin: The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thromboly Therapy Chest 2004;126:188-203.

155. Carrie D, Caranobe C, Boneu B. A comparison of the antithrombotic effects of heparin and of low-molecular-weight heparins with increasing antifactor Xa ⁄ antifactor IIa ratio in the rabbit. British Journal of Hematol 1993;83:622–6.

156. Leizorovicz A, Bara L, Samama MM, Haugh MC. Factor Xa inhibition: correlation between the plasma levels of anti-Xa activity and occurrence of thrombosis and haemorrhage. Haemostasis 1993;23:89–98.

157. Lindahl AK, Abildgaard U, Staalesen R. The anticoagulant effect in heparinized blood and plasma resulting from interactions with extrinsic pathway inhibitor. Thromb resp 1964;64:155–68.

158. Weitz J.I. Low-molecular-weight heparins. New England Journal of Medicine 1997; 337:688–98.

159. Downing LJ, Strieter RM, Kadell AM. Low dose low moleculer weight heparin is anti-inflammatory during venous thrombosis. J Vasc Surg 1998;28:848-54.

160. Güler M, Ekim H, Kırali K. Ratlarda oluşturulan venöz tromboziste heparinin antiinflamatuar etkisi. Fleboloji Dergisi 2001;1:19-26.

161. Fareed J. Heparin, its fractions, fragments, and derivates. Semin Thromb Hemost 1985;11:1-9.

162. Downing LJ, Strieter RM, Kadell AM. IL-10 regulates thrombus-induced vein inflammation and thrombosis. The J of Immunol 1998;161:1471-6.

163. Saliha MJ, Saliba RJ. Heparin in burns: Dose related and dose dependent effects. Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica 1975;33:113-23.

164. Okutan H, Eroğlu E, Karahan N, Aydın A, Tunç B, Çandır Ö, et al. Farklı düşük moleküler ağırlıklı heparinlerin ve standart heparinin sıçan venöz tromboz modelinde karşılaştırılması. Turkish J Vasc Surg 2004;13(2):17-22.

165. Smith LJ, Schaible KL, Fessler RG. Examination of the utility of the rat as an animal model for human. Haemostasis 1987;17(4):206-10.

166. Fareed J, Jeske W, Hoppensteadt D, Clarizio R, Walenga JM. Are the available low molecular-weight heparin preparations the same? Semin Thromb Hemost 1996;22:77-91.

167. Fareed J, Hoppensteadt D, Jeske W, Clarizio R, Walenga JM. Low molecular weight heparins: are they different? Can J Cardiol 1998;14:28–34.

168. Fareed J, Leong WL, Hoppensteadt DA, Jeske WP, Walenga J, Wahi R, et al. Generic low molecular-weight heparins: some practical considerations. Semin Thromb Hemost 2004;30:703-13.

169. Deepa PR, Varalakshmi P. The cytoprotective role of a lowmolecular- weight heparin fragment studied in an experimental model of glomerulotoxicity. Eur J Pharmacol 2003;478:199–205.

170. Rumelt S, Stolovich C, Segal ZI, Rehany U. Intraoperative enoxaparin minimizes inflammatory reaction after pediatric cataract surgery. Am J Ophthalmol 2006;141:433–7.

171. Lever R, Hoult JR, Page CP. The effects of heparin and related molecules upon the adhesion of human polymorphonuclear leucocytes to vascular endothelium in vitro. Br J Pharmacol 2000;129:533-40.

172. Manduteanu I, Voinea M, Capraru M, Dragomir E, Simionescu M. A novel attribute of enoxaparin: inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells by a mechanism involving cell adhesion molecules. Pharmacology 2002;65:32–7.

173. Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP. Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute infl ammation. Blood 1993;82:3253–8.

174. Criado M, Flores O, Ortíz MC. Elevated glomerular and blood mononuclear lymphocyte nitric oxide production in rats with chronic bile duct ligation: role of inducible nitric oxide synthase activation. Hepatology 1997;26:268-76

175. Switzer BR, Summer GK. Improved method for hydroxyproline analysis in tissue hydrolyzates, Anal Biochem 1971;39(2):487-91.

176. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest 2005;115:209–31.

177. Li CH, Pan LH, Yang ZW, Li CY, Xu WX. Preventive effect of Qianggan-Rongxian Decoction on rat liver fibrosis. World J Gastroenterol 2008;14:3569-73.

178. Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? Gut 2000;46:443-6.

179. Popper H, Uenfriend S. Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigations. Am J Med 1970;49:707-21.

180. Schaffner F, Klion FM. Chronic hepatitis. Annu Rev Med 1968;19:25-38.

181. Friedman SL. Liver fibrosis-from bench to bedside. J Hepatol 2003;38:38-53.

182. Abdel-Salam OM, Baiuomy AR, Ameen A, Hassan NS. A study of unfractionated and low molecular weight heparins in a model of cholestatic liver injury in the rat. Pharmacol Res 2005;51:59–67.

183. Marra F. Thiazolidinediones and hepatic fibrosis: don't wait too long. Gut 2006;55(7):917-9.

184. Alastaır D, Bernard C, Lında D. MacSween's Pathology of the liver, Basic mechanisms in hepatopathology. Elsevıer 2007;5:104-7.

185. Rosmorduc O, Housset C. Hypoxia: A Link between Fibrogenesis, Angiogenesis and Carcinogenesis in Liver Disease. Abstract Semin Liver Dis 2010;30:258–70

186. Alastaır D, Bernard C, Lında D. MacSween's Pathology of the liver, Acute hepatic ischaemia. Elsevıer 2007;5:631-2.

187. Valla DC. Primary Budd-Chiari syndrome. J Hepatol. 2009;50(1):195-203.

188. Hershkoviz R, Bruck R, Aeed H, Shirin H, Halpern Z. Journal of Hepatol 1999;31:834-40.

189. Edwards MJ, Keller BJ, Kauffman FC, Thurman RG. The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. Toxicol Appl Pharmacol 1993;119:275–9.

190. Donckier V, Flament V, Gerard C, Abramowicz D, Vandenabeele R, Wissing M, et al. Modulation of the release of cytokines and reduction of the shock syndrome induced by anti-CD3 monoclonal antibody in mice by interleukin-10. Transplantation 1994;57:1436-9.

191. Van der Poll T, Marchant A, Buurman W, Berman L, Keogh CV, Lazarus DD, et al. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. J Immunol 1995;155:5397-401.

192. Standiford TJ, Strieter RM, Lukacs NW, Kunkel SL. Neutralization of IL-10 increases lethality in endotoxemia. J Immunol 1995;155:2222-9.

193. Louis H, Le Moine, Peny MO, Gulbis B, Nisol F, Goldman M, et al. Hepatoprotective role of interleukin-10 in galactosaminel lipopolysaccharide liver injury in mice. Gastroenterology 1997;112:939-42.

194. Louis H, Moine OL, Peny MO, Quertimnont E, Fokan D, Goldman M, et al. Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. Hepatology 1997;25:1382-9.

195. Ishai-Michaeli R, Svahn CM, Weber M, Chajek-Shaul T, Korner G, Eksre H-P, et al. Importance of size and sulfation of heparin in release of FGF from the vascular endothelium and extracellular matrix. Biochemistry 1992;31:2080-8.

196. Lider 0, Mekori YA, Miller T, Bar-Tana R, Vlodavsky I, Baharav E, et al. Inhibition of T lymphocyte heparanase by heparin prevents T cell migration and T cell-mediated immunity. Eur J Immunol 1990;20:493-9.

197. Abe W, Ikejıma K, Lang T, Okumura K, Enomoto N,Kitamura T, et al. Low molecular weight heparin prevents hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride in the rat. J Hepatol 2007;46:286-94.

198. Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation dependent on an ethanol- inducible form of rabbit liver microsomal cytochrome P-450 FEBS Lett 1985;183:265–9.

199. Recknagel RO, Glende Jr EA, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. Pharmacol Ther 1989;43139–54.

200. Nakao T, Arii S, Kaido T, Mori A, Murata T, Matsumori A, et al. Heparin accelerates liver regeneration following portal branch ligation in normal and cirrhotic rats with increased plasma hepatocyte growth factor levels. J Hepatol 2002;37:87–92.

201. Matsumoto K, Nakamura T. Heparin functions as a hepatotrophic factor by inducing production of hepatocyte growth factor. Biochem Biophys Res Commun 1996;227:455-61.

202. Naka D, Ishii T, Yoshiyama Y, Miyazawa K, Hara H, Hishida T, et al. Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of a single chain form to a heterodimer. J Biol Chem 1992;267:20114–9.

203. Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, et al. Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. EMBO J 1992;11:4825–33.

204. Naka D, Ishii T, Shimomura T, Hishida T, Hara H. Heparin modulates the receptor binding and mitogenic activity of hepatocyte growth factor on hepatocytes. Exp Cell Res 1993;209:317–24.

205. Liu Y, Rajur K, Tolbert E, Dworkin LD. Endogenous hepatocyte growth factor ameliorates chronic renal injury by activating matrix degradation pathways. Kidney Int 2000;58:2028-43.

206. Ozaki I, Zhao G, Mizuta T, Ogawa Y, Hara T, Kajihara S, et al. Hepatocyte growth factor induces collagenase (matrix metalloproteinase- 1) via the transcription factor Ets-1 in human hepatic stellate cell line. J Hepatol 2002;36:169–78.

207. Shi J, Hao JH, Ren WH, Zhu JR. Effects of heparin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. World J Gastroenterol 2003;9:1611–4.

208. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction a new experimental model for cirrhosis in the rat. Br J Exp Pathol 1984;65:305-11.

EKLER

Ek 1

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı:6 **Karar Tarihi:** 29.05.2009

KARAR NO: 2009/06.01

Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç Dr. Ali Rıza Soylu'un yaptığı Araş.Gör.Dr.Süleyman Erdoğdu'un uzmanlık tezi olarak planlanan TÜHDYEK- 2009/041 protokol nolu "Safra Yolları bağlanmış sıçanlarda antitrombotik ajan dalteparinin hepatik fibroz gelişimini engellemedeki rolü." başlıklı çalışma görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvani/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivi Üye	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
İlyas ÖZMEN Sivil Üye	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. S. Arzu VARDAR Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	
Doç. Dr. Nilda TURGUT Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. Ruşen COŞAR-ALAŞ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	