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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Ali Rıza SOYLU

SAFRA YOLLARI BAĞLANMIŞ SIÇANLARDA HEPATİK FİBROZİS GELİŞİMİNİN ÖNLENMESİNDE PRAVASTATİN TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİ

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Yeliz KÖMÜRCÜ

EDİRNE-2011

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında 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 Dalı'nda görevli tüm hocalarıma, uzman ve asistan arkadaşlarıma, Çocuk Cerrahi Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Ümit N. BAŞARAN'a, Patoloji Anabilim Dalı'ndan Ufuk USTA'ya, Histoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet KANTER'e, biyolog Mustafa ERBOĞA'ya, tüm deney hayvan laboratuvar çalışması süresince bana destek veren Dr. Emrah GÜLŞEN'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **KARACİĞER HİSTOFİZYOLOJİSİ** 3
- **EKSTRAHEPATİK KOLESTAZ VE KARACİĞER FİBROZİSİ** 5
- **SEKONDER BİLİER SİROZ** 7
- **ALFA DÜZ KAS AKTİN** 9
- **APOPTOSİZ** 9
- **KARACİĞER FİBROZİSİNİN TEDAVİSİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR** 17
- **STATİNLER** 19

GEREÇ VE YÖNTEMLER 24

BULGULAR 31

TARTIŞMA 62

SONUÇLAR 67

ÖZET 69

SUMMARY 70

KAYNAKLAR 71

EKLER

KISALTMALAR

ALP : Alkalen fosfataz
ALT : Alanin amino transferaz
APAF-1 : Apopitotik proteaz aktive eden faktör
AST : Aspartat amino transferaz
ATP : Adenozin trifosfat
DBİL : Direkt bilirübin
DNA : Deoksiribonükleik asid
ECM : Ekstrasellüler matriks
ELISA : Enzim immunoassay
EM : Elektron mikroskop
eNOS : Endotelyal nitrik oksit sentaz
ER : Endoplazmik retikulum
FGF : Fibroblast büyüme faktörü
GGT : Gama glutamil transpeptidaz
HMG CoA : Hidroksi metil glutaril koenzim A
HSH : Hepatik stellate hücre
KASPAZ : Sistein aspartat spesifik proteaz
MMP : Matriks metallo proteinaz
NF-κβ : Nuclear factor-kappa
NO : Nitrik oksit
PMNL : Polimorfonükleer lökosit

PPAR-γ **:** Peroksizom proliferatör aktivatör reseptör-gamma

TBİL **:** Total bilirübin

TGF-β **:** Transforme edici büyüme faktörü-beta

TIMP **:** Doku metalloproteinaz inhibitörü

TNF-α **:** Tümör nekroz faktör-alfa

TUNEL **:** Terminal deoksi nükleotidil transferaz-mediated deoksi üridin trifosfat biotin nick end-labeling

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 de 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. Hepatik stellat hücreler (HSH) bu fibrojenik proçeste çok önemli bir rol oynar (5). Doku hasarına karşı aktive olduklarında miyofibroblast benzeri hücrelere dönüşerek tip I kollajen ve diğer ekstraselüler matriks (ECM) proteinlerini salgılarlar (6). Sonuçta tüm karaciğer fibrotik doku ile kaplanır, rejenerasyon nodülleri gelişir ve karaciğer küçülür.

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). Karaciğerde major fibrojenik hücreler olan HSH'ler antifibrotik tedaviler için mükemmel bir hedef teşkil edebilirler (4,5,8). Aktive olmuş HSH'lerin apopitozisini indüklemek temel fibrojenik hücrelerin uzaklaştırılmasını sağlayıp, ECM degradasyonuna yol açar. Dolayısıyla aktive HSH apopitozisinin indüklenmesi, ECM'nin karaciğerden uzaklaştırılmasında önemli bir terapötik metot olabilir (4,6,9).

Statinler pek çok değişik organda fibrojenik hücrelerin aktivasyon ve proliferasyonunu, bu hücrelerin apopitozisini indükleyerek antifibrotik etki gösterebilirler (10,11).

Bizim bu çalışmada amacımız; safra kanalı ligasyonu ile sekonder biliyer siroz oluşturulan sıçanlarda, pravastatinin fibrozis üzerine koruyucu etkisinin olup olmadığını biyokimyasal, ışık mikroskobik ve immünohistokimyasal yöntemler kullanarak değerlendirmek ve bu konuda yapılan benzer çalışmalar ile karşılaştırmaktır. Eğer projemiz olumlu sonuç verirse yani hepatik fibrozis ve dolayısıyla siroz gelişimi engellenirse, insanları etkileyen başta kronik kolestatik karaciğer hastalıkları olmak üzere kronik hepatit B, hepatit C ve otoimmün hepatit gibi pek çok hastalığın tedavilerine statin grubu ilaçlar eklenip hepatik fibrozisi azaltıp azaltamayacağı araştırılabilir.

GENEL BİLGİLER

KARACİĞER HİSTOFİZYOLOJİSİ

Karaciğer, vücudun en büyük karın içi organı ve bezidir. Ağırlığı 1.5 kg'dır ve hilumda kalınlaşan ince bir bağ dokusu kapsülü ile sarılıdır. Sağ 7-11. kaburgaların arkasına yerleşen karaciğer, hipokondrium ve epigastrium bölgesinde yer alarak sol hipokondrium bölgesine doğru uzanır (8,10). Kalp debisinin %25'i karaciğere gelir. Karaciğer, *a. hepatika propria* (%20-30) ve *v. porta hepatis* (%70-80) olmak üzere iki kaynaktan beslenir. Hilumda karaciğere portal ven ve hepatik arter girer, sağ ve sol hepatik kanallar ve lenfatikler çıkar (12). Bu damarlar ve kanallar, klasik karaciğer lobülleri arasında sonlandıkları portal alanlara dek bağ dokusu ile çevrilmiştir. Bu noktadan itibaren karaciğer lobüllerindeki hepatositlere ve sinüzoidal endotel hücrelerine destek sağlayan ince bir retiküler lif ağı oluşturur.

Safra kesesi fossa vesika biliarise yerleşmiş, armut biçiminde içi boş, 30-50 ml safra depolayabilen ve fundus, kollum ve korpus olmak üzere üç kısımdan oluşan bir organdır (13).

Sıçan karaciğeri insandakine benzer olarak sağ, sol, orta ve kaudal olmak üzere dört lobdan oluşur. Sol lob en büyük, orta lob ise ikinci en büyük lob olup, sol lob ve orta lob birlikte karaciğerin yaklaşık %70'ini oluştururlar. Karaciğere kan hepatik arter ve portal ven aracılığıyla gelir. Karaciğerden dönen kan vena kava inferiora boşalır. Sıçanlarda safra kesesi yoktur (14).

Karaciğerin vücudun metabolik dengesini sağlamada birçok yaşamsal işlevi vardır. Metabolizmanın düzenlenmesi, hormonların, ilaçların, toksik maddelerin parçalanarak inaktif metabolitlere dönüştürülmesinde, gastrointestinal sistemden emilen besinlerin

metabolize edilerek depolanmasında, plazma proteinleri, hormon, demir ve vitamin A, D, B_{12} depolanmasında ve safranın üretiminde görevlidir. Karaciğer hepatositlerinde üretilen safranın yağların sindirimi ve emilimini kolaylaştırıcı etkisi yanı sıra, kolesterol ve bilirübin gibi yıkım ürünlerinin kandan uzaklaştırılmasında da etkisi mevcuttur (15). Safra üretimi sürekli olurken, safra sekresyonu gıda alımı ile uyarılan barsaklardan salınan kolesistokinin hormonunun safra kesesini kasması ve oddi sfinkterini gevşetmesi ile gerçekleşir. Günde yaklaşık olarak 500 ml salgılanan safra enterohepatik dolaşım ile bağırsaklardan geri emilerek karaciğer tarafından tekrar salgılanır. Safra kanallarının tıkanmasında, bilirübin oluşumu normaldir ancak oluşan bilirübin kandan bağırsaklara geçemez. Serbest bilirübin karaciğer hücrelerine geçerek konjuge hale çevirilir. Konjuge bilirübin ya dolgun safra kanalcıklarının yırtılması ile kana geçer ya da doğrudan lenf damarları ile karaciğerden ayrılır. 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 bilirübin gözlenir(16).

Karaciğerin fonksiyonel ünitesi 50000-100000 adet bulunan, birbiriyle anastomoz yapan ve sinüzoid boşlukları ile çevrili hepatosit plaklarından oluşan karaciğer lobülüdür.

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). Her bir asinüs; iki santral ven arasında yer alan oval bölge olarak tanımlanır (17). Kan, asinüs merkezinden hepatik venlere doğru akar. Arteriyel kanın venöz sinüzoidler boyunca akışı üç bölgeye ayrılır. Toksik madde alımında en çok hasarı birinci bölgedeki (periportal kısım) hepatositler görürken, hipoksi durumunda ise üçüncü bölgedeki (perivenüler kısım) 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 .

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 (18). Karaciğerin, endokrin ve ekzokrin görev yapan fonksiyonel hücresi hepatosittir ve bazolateral ve apikal bölgesi olmak üzere iki bölgesi vardır. Bazolateral bölge içerdiği çok sayıda mikrovillüs ile kan kaynaklı madde emilimi ve plazma

proteinlerinin salgılanmasına katkıda bulunur. Apikal bölge ise safranın geri kaçışını önlemek için kenarları tıkayıcı bağlantılarla kapatılmış olan safra kanalikülünün kenarlarını saran, mikrovillüslerle kaplı bir girinti şeklindedir. Karaciğer sinüzoidleri duvarı kesintisiz olmayıp başlıca, endotel ve Kupffer hücresi içerir. Endotel hücreleri sitoplazmalarındaki delikler sayesinde kandan madde geçişine izin verirler. Kupffer hücreleri ise kan monositlerinden köken alan ve sitoplazmik uzantıları olan fagositoz yeteneğine sahip hücrelerdir. Hepatositleri sinüzoitteki kandan Disse aralığı (perisinüzoidal aralık) ayırır. Disse aralığında, A vitamini metabolizması ve depolanmasında görev alan yıldızsı hücreler (stellat) olarak da adlandırılan İto 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 safranın hücreler arası iletildiği kanalcıklardır. Bu kanalcıklar, karaciğer lobülünün plakları boyunca anastomoz yapan kompleks bir ağ oluşturur ve portal alanda sonlanır. 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 (8,17,19).

EKSTRAHEPATİK KOLESTAZ VE KARACİĞER FİBROZİSİ

Ekstrahepatik Kolestazis

Karaciğer dışındaki ya da porta hepatis içerisindeki büyük safra yollarının tıkanmasına ekstrahepatik kolestaz denilmektedir. 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 gösterilmiştir (20,21).

Geniş Safra Kanalı Obstrüksiyonun Patolojisi

Karaciğerdeki değişiklikler sadece obstrüksiyonun süresi ve derecesine değil aynı zamanda eşlik eden enfeksiyon ve mekanik obstrüksiyonun kendisinin rolüne de bağlıdır. Histolojik değişiklikler ise erken ve geç belirtiler olarak gruplandırılabilir.

Erken lezyonlar: En erken değişiklikler genellikle perivenüler bilirübinostazisi takiben portal alan ödemi ve inflamasyonundan oluşmaktadır. Bilirübinostazis perivenüler

bölgelerde başlar. Hepatosit sitoplazmalarında ince bilirübin granülleri ve safra tıkaçları görülür.

Portal traktus ödemi küçük terminal dallanmalardan başlar. Portal ödem, fibroblastların aktivasyonu ile histiyositler ve nötrofil lökositlerin baskın olduğu inflamatuvar hücre infiltrasyonundan biliolenfatik reflü sorumlu tutulmaktadır (22).

Ekstrahepatik obstrüksiyona sahip biyopsi spesimenlerindeki portal bölgelerin %82'sinde periyodik asit-Schiff pozitif bazal membrana sahip reaktif kanalcıklar ve eşlik eden polimorfonükleer nötrofil infiltrasyonu ile karakterize kolanjiolit görülür (23).

Geç lezyonlar: Ekstrahepatik obstrüksiyonda bilirübinostazis varlığı daha süregen bir biçimde öne çıkmaktadır. İnterselüler safra tıkaçları sayıca ve büyüklük açısından artmakta ve bazı koyu çökeltiler (konkrement) daha geniş hale gelerek zamanla 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 (24). Geniş safra infarktları ekstrahepatik kolestazis açısından tanısaldır. Safra infarktlarının biriken safra içeriklerinin, özellikle de safra tuzlarının toksik etkileri ile kombine artmış bir biliyer basınca ait hasar yapıcı etki nedeniyle oluştuğu düşünülmektedir (25,26). Safra infarktlarına ait nekrotik bölgeler fibröz skarlaşma ile yer değiştirirler. Safra kanallarındaki geniş çökeltiler ise döşeyen epitelin nekrozuna ve safranın ekstravazasyonuna neden olabilmektedirler. 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. Periduktal fibrozis ise, periduktal kapiller pleksustan gelen duktal kan akımını bozarak, sekonder iskemik kolanjite yol açar ve progresif duktal atrofi ile sonuçlanır.

Süperimpoze enfeksiyon, süpüratif kolanjit: Yoğun nötrofilik polimorf lökosit birikimlerinin kanal ve kanalcıkları kapatmaları durumunda asendan enfeksiyondan şüphelenilmelidir. Ciddi enfeksiyon varlığında abseler gözlenebilmektedir.

SEKONDER BİLİYER SİROZ

Patogenez ve Morfoloji

Sekonder biliyer siroz, ekstrahepatik safra obstrüksiyonunun göreceli nadir bir komplikasyonudur 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 (27). Altmış erişkinin alındığı bir seride, Scobie ve Summerskill (28) 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. Biliyer siroz en sık, kronik obstrüktif kolanjiyopatilere sekonder, özellikle de genelde cerrahi ya da girişimsel radyolojiye uyum göstermeyen primer ya da kazanılmış sklerozan kolanjitin olduğu bir sekel şeklinde gözükmektedir. 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 HSH'ler tip IV kollajen ve lamininden zengin gevşek ve hücresel bağ dokunun döşenmesine katkıda bulunurlar (29). Konnektif doku büyüme faktörü ve periduktal mast hücreleri bu süreçte önemli olabilirler (30,31). 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 (32).

Patolojik bulgu olarak karaciğer boyutları artmakta, sadece hastalığın son evrelerinde subnormal bir oranda büzülme göstermektedir (33). Yüzeyi düz, ince granüler ya da nodülerdir. Kıvamı ve granülaritesi siroz evresiyle birlikte değişkenlik göstermektedir. Karaciğer palpasyonda serttir. Küçük hemorajiler, yeşil ya da gri nekrotik lekeler ve haricen küçük infarktlar görülebilir. Safra kanalları bazen belirgin biçimde distandü, açık ya da koyu, sıklıkla da kıvamlı bir safra ile dolu olabilirler.

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, diffüz ya da periseptal biçimde olabilmektedir. Mikroskobik bilirübinostazis ise karaciğer hücrelerinin tüysü dejenerasyonlarıyla, safra infarktlarıyla ve de safra kaçaklarıyla ilişkili olabilmektedir. Sekonder biliyer sirozun geç evrelerinde ise hem

kanallar hem de kanalcıklar da kaybolabilirler (34). Geriye kalan kanallarda ise konsantrik periduktular fibrozis görülür.

Sekonder biliyer siroz bakteriyel enfeksiyonla komplike olabilmektedir. Enfeksiyonun ciddi olması halinde flebit ve kolanjit gelişebilir.

Siroz

Karaciğer parankimi fibröz skarlar ile yarılmıştır ve bu fibröz skarlar portal yolakları ve sentrilobüler hepatik venleri portal-portal, portal-santral ve/veya santral-santral paternde bağlayan ince bandlar şeklinde olabilir. Parankimal nodüller, hepatik parankim adacıklarının fibrotik izolasyonları ile oluşur ve boyutları değişkendir. Karaciğer sirozu 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 ECM birikiminden (fibrozis) ve vasküler reorganizasyondan oluşmaktadır. Hücre ölümü, fibrozis ve vasküler trombozisle seyreden bu üç sürecin ortak neticesi parankimal tükenmedir (35).

Parankimal tükenme: Parankimal tükenme, şekilli hepatositlerde fokal bir kaybın olması anlamına gelmektedir. Tükenme lezyonlarının boyutları obstrükte damar boyutlarına bağlıdır. Tükenmeye ait lezyonlar bir asinüsün küçük bir kısmını kapsayabileceği gibi bir ya da daha fazla komşu asinusu ya da bir lobu tamamen kapsayabilmektedir. Komşu hücre kaybı, venlerin ya da sinüzoidlerin obstrüksiyonundan kaynaklanan fokal iskeminin bir sonucudur.

Fibrozis/sirozun geriye dönebilmesi: Hasara ilişkin süreçlerin sonlanmasıyla birlikte sirozda geriye dönüş olabileceğini bildiren birçok klinik rapor mevcuttur (36,37). Bunlar başlangıçta tam bir siroz tablosu olan, başarılı bir tedaviden sonra karaciğer biyopsisinde inkomplet septal siroz ya da fibrozisin belirgin bir şekilde azaldığı herediter hemokromatozlu (38,39), otoimmün hepatitli (40) ve Wilson'lu (41) hastalardır. Fibroziste azalmanın varlığı, aynı zamanda primer biliyer sirozda (42), şistozomiazis (43) ve ekstrahepatik biliyer obstrüksiyonda (44) da tespit edilmiştir. Fibrozis rezolüsyonundaki ana mekanizma matriks metalloproteinazlarının (MMP) aktiviteleri ile birlikte artmış olan kollajenolitik aktiviteye eşlik eden azalmış doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMP) ekspresyonudur. Aktive HSH'lerin apopitozisleri de aynı zamanda fibrozis rezolüsyonunu kolaylaştırmaktadır (45). Apopitozis ise aktive HSH'lerdeki 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.

ALFA DÜZ KAS AKTİN

Normal yetişkin karaciğerinde perisinüzoidal hücreler yanında vasküler düz kas hücreleri ve perisitler de alfa düz kas aktin (α–SMA) için pozitiftirler. Perisinüzoidal hücreler, sinüzoidal duvar boyunca dağınık ve ayrı ayrı tabakalar oluşturmuşlardır. İmmünoelektron mikroskobu**,** α-SMA pozitif perisinüzoidal hücrelerin, yağ damlacıkları içeren İto hücreleri olduklarını göstermiştir (46). *İn vitro* ve olasılıkla *in vivo* aktif hale gelmiş HSH'lerdeki α -SMA gen ekspresyonunda meydana gelen artış, hücre proliferasyonu ile ilgili görünmektedir. Alfa düz kas aktin, bölünen HSH'lere işaret eden yeni bir gösterge olabilir. Alfa düz kas aktin gen ekspresyonunun, *in vitro* hücre proliferasyonu esnasında artmış olması HSH'nin düz kas hücrelerinden ayırt edilmesini sağlayacaktır (47).

Kronik karaciğer hastalığında α-SMA pozitif HSH'ler, sayı, büyüklük ve özellikle nekroz alanlarında immün boyanma yoğunluğunda artma gösterirler.

Bu sonuçlar göstermiştir ki; anti α-SMA antikoru kullanılan immünohistokimyasal yöntem, yetişkin insan karaciğerinde normal ve aktive olmuş HSH'lerin tanımlanması için güvenli ve duyarlı bir metottur (48,49).

APOPİTOZİS

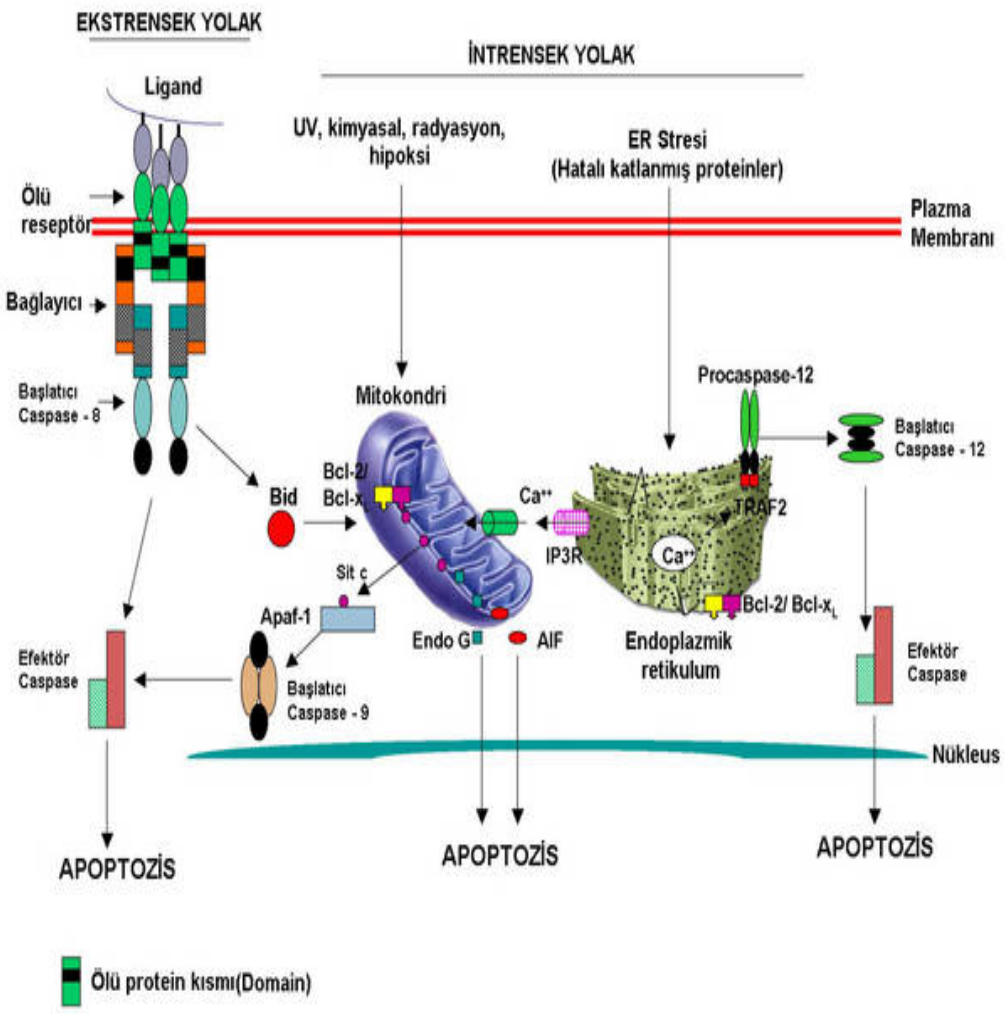
Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apopitozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir (50,51). Wyllie, 1980 yılında deneysel apopitozisi, glukokortikoidlere maruz bırakılan olgunlaşmamış timus hücrelerinde gerçekleştirmiş ve apoptotik hücre DNA'sının elektroforetik jel ayrımını yaparak, hücrede DNA bütünlüğünün kalmadığını, apoptotik hücre için karakteristik olan merdiven tarzında DNA bantlarının oluştuğunu göstermiştir (52). Cohen, 1993 yılında yüksek dozda kullanılan steroidlerin timus hücreleri üzerine etkilerini incelemiş ve timus hücrelerinin direkt olarak apopitozisi seçmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apopitozise yönlendirdiğini bildirmiştir (53). Böylece apopitozisin genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır (54).

Apopitozis Mekanizmaları

Apopitozisin indüklenmesinde üç prototip sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir

1. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apopitozis oluşturulması
2. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile tetiklenme
3. Endoplazmik retikulum(ER) aracılı apopitozis oluşturulması

Şekil 1'de apopitozisin indüklenmesinde rol alan her üç sinyal yolağı şematize edilmiştir. İntrensek yolak mitekondriyal ve ER sinyal yolaklarının indüklenmesiyle gerçekleşirken, ekstrensek yolak ölüm reseptörü aracılığıyla gerçekleşmektedir.



Caspase: Sistein Apartat Spesifik Proteaz, **AİF:**Apopitozis İndükleyici Faktör, **Apaf-1:** Apopitotik Proteaz Aktive Eden Faktör, **UV:**Ultraviole, **Sit C:** Sitokrom C, **ER:**Endoplazmik Retikulum, **Endo G**:Endonükleaz G **IP3R:** İnositol 1,4,5-Trifosfat Reseptör, **Bid:** Bcl-2 interacting domain, **TRAF2:** TNF Reseptör-Associated Faktör 2.

Şekil 1. Apopitozis indüksiyonunu oluşturan sinyal yolakları (55)

Mitokondri/Sitokrom-C Aracılı Apoptozis Oluşturulması

Mitokondri normal şartlar altında adenozin trifosfat (ATP) oluşturmak üzere sitokrom-c ihtiva eder. Mitokondrial stres durumlarında serbestlenen sitokrom-c apopitotik hücre ölümünde sistein aspartat spesifik proteaz-3 (kaspaz-3) aktivasyonu için önemli rol teşkil eder

(56,57). Bu yolda mitokondri tarafından kontrol edilen apopitotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ve kaspaz-9 bulunmaktadır (58,59). Ko-faktör nükleotid trifosfat (d-ATP ve ATP) ile aktive edilen sitokrom-c ve apaf-1 birleşerek prokaspaz-9'u aktive eder. Aktive kaspaz-9 da kaspaz-3'ü aktive ederek diğer kaspaz kaskadının tetiklenmesini sağlar (59,60).

Sağlıklı bir hücre mitokondrisinin dış membranında Bcl-2 proteini yer alır (61,62). Bcl-2, Apaf-1 proteininin bir molekülünü bağlar. Bcl-2 neden olduğu internal hasarla mitokondride çatlaklar oluşturarak Apaf-1 ve Sitokrom-C salınımına yol açar. Bu iki protein kaspaz-9 moleküllerine bağlanır (58,59,63).

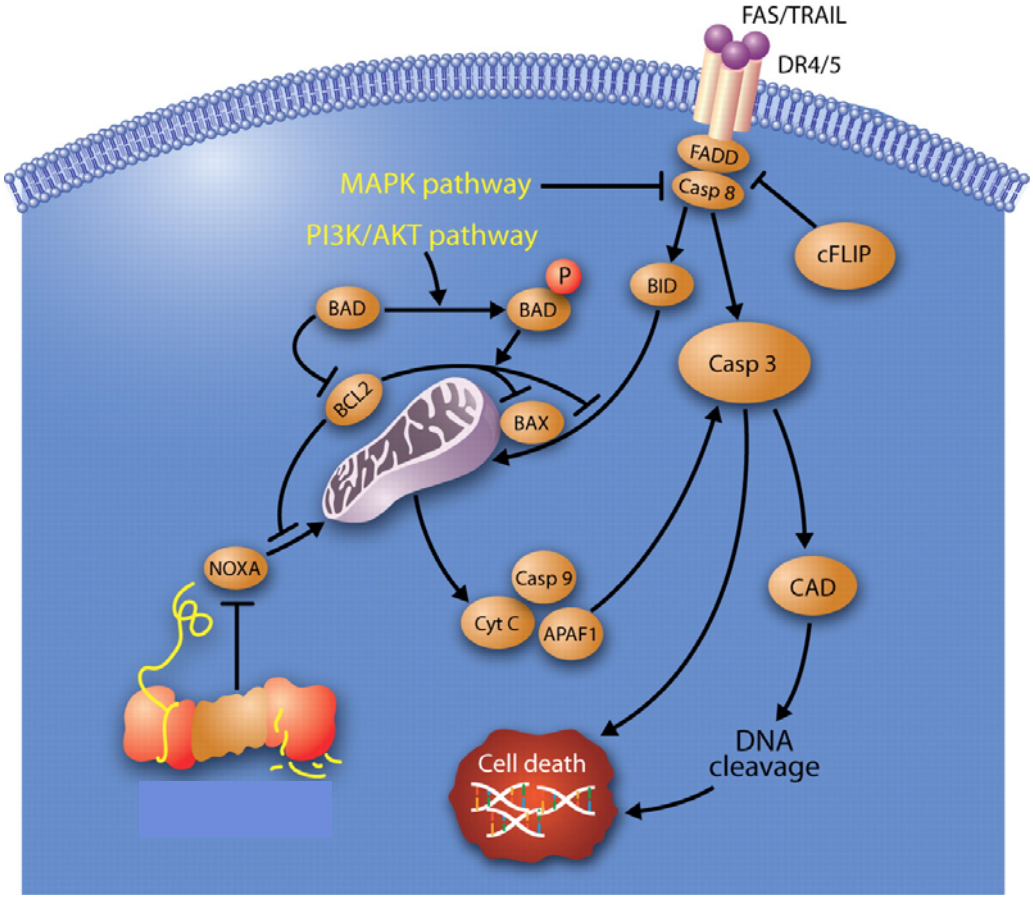
Apoptosom: Bu proteolitik aktivitenin kaskadı kan pıhtılaşması ve kompleman aktivasyonuna benzer. Terminal uç kaspaz-3'tür. Bu proteolitik aktivite ile sitoplazmada yapısal poteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın degradasyonu ve hücrenin fagositozu sağlanır (64,60,65).

Dış Sinyallerle Apoptozisin Tetiklenmesi

Birbirini tamamlayan ölüm aktivatörlerinin (Fas-L ve TNF) hücre yüzeyindeki Fas ve TNF reseptörlerine bağlanmasıyla sitoplazmaya kaspaz-8'i aktive eden sinyaller yayılır. Kaspaz-8 diğer kaspazları uyarır ve hücrenin fagositozuna yol açar (63,66). Şekil 2'de gösterilmiştir. Fas reseptörünün, Fas ligand (Fas-L) ile karşılıklı etkileşimi Fas bağımlı ölüm domain proteini (FADD) aracılığı ile olur ve bunun sonucunda da kaspaz-8 aktive edilerek apoptotik döngü başlar (66-67).

Endoplazmik Retikulum Aracılı Apopitozis Oluşturulması

Son zamanlarda amiloid β nörotoksisitesine katkıda bulunan kaspaz-12'ye bağımlı ER aracılı apopitotik yol tarif edilmiştir (60,68) Bu yol mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı bir yoldur. ER, hücre içi kalsiyum dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir (68). Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptozis için esas teşkil eden bir kaspazdır. Son çalışmalar göstermiştir ki kalsiyum seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile prokaspaz-12 aktiflenir. Ayrıca kaspaz-7 salınımı ile de prokaspaz-12 salınımı arasında bir bağlantı bulunur. Aktiflenmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder (69). Son çalışmalar, *in vivo* ve *in vitro* olarak kaspaz-12'nin kaspaz-9'u aktive ettiğini göstermiştir (70).



MAPK pathway: Mitojen Aktivated Protein Kinase Yolağı, **PI3K/AKT pathway:** İnositol 1,4,5-Trifosfat Aktivated yolağı, **Casp:** Sistein Apartat Spesifik Proteaz Faktör, **Apaf-1:** Apopitotik Proteaz Aktive Eden Faktör, **Cyt C:** Sitokrom C, **FADD: Fas-**Associated protein with Death Domain, **Bid:**Bcl-2 interacting domain **CAD:** Kaspaze-Activated DNAse.

Şekil 2. Dış sinyaller ile apopitozisin indüklenmesi (71)

Apopitozisin Genetik Kontrolü

Antiapoptotik proteinler: Protoonkogenler normal hücre büyüme ve gelişmesini düzenleyen genlerdir. Bu genler aktive olup mutasyona uğradıklarında onkogen adını alır. Onkogenler, hücrenin aşırı büyüme ve bölünmesi doğrultusunda uyarımı gerçekleştirir. Hücrenin büyüme ve bölünmesini aktive edici genleri baskılayan ve dengeleyen genler ise adından da anlaşılacağı üzere tümör baskılayıcı genlerdir (72-73). Son yapılan çalışmalar, bazı onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin programlı hücre ölümünü kontrol ettiğini göstermektedir (74). Omurgalılarda apopitozisi düzenleyen genler c-myc, p-53 ve bcl-2 ailesi (bcl-2, bax ve bcl-x) olarak bilinmektedir ve üretimini sağladıkları proteinler de aynı adlarla anılmaktadır (61,62,75,76).

p-53: Apopitozisi düzenleyen bir diğer gen, tümör baskılayıcı p-53 genidir. Hipoksi ve serbest radikal oluşumu p-53 aracılı DNA onarımı ve apoptozisi başlatır (66). DNA hasarı

oluştuğu zaman sentez (S) fazına geçişi bloke eder. DNA tamiri için zaman kazanılır, eğer tamir mümkün değilse hasarlanmış hücreler apopitozisle yok edilir (75,77,78).

c-myc: Bir transkripsiyon düzenleyici faktör olan c-myc proteini, ortamda bazı faktörlerin bulunmasına bağlı olarak hücrenin proliferasyonuna ve apoptozise uğramasına neden olur (79). C-myc protoonkogeni bir hücrenin büyümesini programlar. Eğer hücrede hem c-myc hem de uygun büyüme faktörleri yoksa büyüme durur, her ikisi de yeterli ise çoğalma olur, c-myc olduğu halde büyüme faktörleri yoksa apopitozis görülür (52,79,80).

Bcl-2 ve Bcl-xl: Bcl-2 (antiapoptotik protein) ailesi apoptotik kaskadın kontrolünde en önemli gruptur ve bir düzineden fazla üyesi vardır (64,62). Bunlardan bazıları apoptotik aktivitenin öncüleri iken (bax ve bad), diğerleri antiapopitotik (hücre koruyucu) proteinlerdir (62). Bu proteinlerin seviyeleri hücrenin öleceğine veya yaşayacağına karar verir. Bcl-2 ailesi proteinlerinin etki yeri mitokondridir ve bcl-2 güçlü bir ölüm inhibitörüdür (62). Antioksidan yolda mitokondriden sitokrom-c salınımını engellemede rol oynar. Bcl-2 mitokondri membran dışında, ER ve nükleer membranlarda bulunur. Bcl-xl mitokondri membran dışında lokalizedir. Bcl-xl ve Bcl-2 beraberce mitokondri membran geçirgenliğini korurlar. Proapoptotik proteinleri (Bax ve Bad) inhibe ederek apopitozisi engeller (60). Bcl-xl kaspaz aktivasyonunu, Apaf-1 üzerinden önler (64,58,62). Bax ve bad proteinleri etkilerini diğer bir protein ailesi; kaspazlar üzerinden gerçekleştirir. Bunların sayısı da bir düzineden fazladır. Kaspazlar sistein proteazlardır, aktiviteleri hücre ölüm yolunda ortaya çıkar. Kaspaz-9, bcl-2 ailesi tarafından stimüle veya inhibe edilir. Kaspaz-2 ve kaspaz-8, TNF–α gibi sitokinler tarafından aktive edilir

XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP: Antiapoptotik protein ailesinden apoptozis protein inhibitörleri omurgalı ve omurgasızlarda bulunmuş olup, bunlar programlanmış hücre ölümünün negatif düzenleyicileridir. Bazı memeli homologları; XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, Bruce, Survivin ve pIAP olarak tanımlanmıştır. Bunların çoğu hücre ölümünü kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9'a direkt olarak bağlanıp onları inhibe ederek gerçekleştirirler (60). Apopitozis protein inhibitörleri, kaspazları ölüm reseptörleri ve mitokondrial yol ile inhibe ederler (81,60,70).

Proapoptotik Proteinler

Bax, Bad ve Bid: Sağlıklı hücrede bax sitozolde bulunur. Apoptotik uyarı ile sitozolik bax mitokondriye yönelir ve çeşitli değişimler sonucunda bax'ın hidrofobik C terminal ucu açığa çıkar ve sitokrom-c salınımına neden olur. Kalpain tarafından bax salınımı uyarılarak sitokrom-c açığa çıkar (77,82). Bad, sağlıklı hücrelerde mitokondri membranının dış zarında

bulunur. Apopitozis sırasında bax değişime uğrar ve N terminal uç açığa çıkarken bcl-xl bad'dan ayrılır (63,82). Bid, bcl-2'yi inaktive etmek veya bax'ı aktiflemek üzere mitokondriye yönelir (62). Endojen bid'in yarısı sitozolde erir. Diğer yarısı ise hücre içi membranlarda özellikle de endoplazmik retikulumda bulunur (81,64,69).

Apopitoziste Hücre İçi Sinyal İletimi ve Metabolik Değişiklikler

Apopitotik sinyal iletimi ile ilgili bugüne kadar elde edilen bilgiler, hücre içi diğer sinyallerin iletiminden sorumlu olan bazı molekül ve enzimlerin, apoptozisteki sinyal iletiminde de rolleri olduğunu göstermektedir (54,83). Hücre içi sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan kalsiyum apopitoziste de rol oynar. Hücre içindeki kalsiyum iyonlarının miktarındaki artış hücreyi apopitozise götürmektedir (54). Sitoplazmadaki kalsiyum iyonu miktarındaki hafif artış, c-myc, c-fos ve ısı şok proteinlerini harekete geçirir ve hücrenin apopitozise gitmesine neden olur. Sitoplazmada artan kalsiyum, inaktif durumdaki kalsiyum bağımlı proteazları ve nükleazları aktifleştirerek sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apopitozise özgü internükleozomal DNA kırıklarına neden olur (84). Kalsiyum, inaktif durumdaki endonükleaz, proteaz, transglutamaz ve fosfolipaz gibi latent enzimleri aktive ederek apopitozise neden olur (85).

Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler

Yüzey organellerinin kaybı: Apopitozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovillüsler ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (86,53).

Hücre büzülmesi: Apopitotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplazması daha uzundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur (54). Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez (53,55,86)

Kromatin yoğunlaşması: Önemli yapısal değişiklik çekirdekten başlayarak izlenir. Çekirdek apopitoziste odak noktasıdır. Hücreden hücreye değişmekle birlikte genellikle çekirdek büzüşür (54,86). Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porları seçilemez, şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük parçalara bölünür. Çekirdekçik genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır (53,55,86).

Sitoplazmik baloncuklar ve apopitotik cisimlerin oluşması: Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür (55,86).

Apoptozis için morfolojik değişimler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması olurken fosfotidilserin açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plak içinde bulunan fosfotidilserin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür (64).

Fagositoz

Apopitozis sırasındaki hücre zarı değişimleri komşu hücrelerin ölü hücreyi fagosite etmesi için gerekli tüm uyarıları verecek şekilde düzenlenir. Oluşan apoptotik hücreler, hücreler arası alana dağılırlar veya lümene dökülürler (51). Dokuda 4-9 saat tanınabilir halde kalan apopitotik hücreler daha sonra fagozomlar içinde birkaç saat kadar görülebilir, sonra da sindirilemeyen materyal olarak kalır (51,52).

Apopitozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apopitozisi saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (87).

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
2. İmmünohistokimyasal yöntemler
3. Biyokimyasal yöntemler
4. İmmünolojik yöntemler
5. Moleküler biyoloji yöntemleri

Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

Işık mikroskobu kullanımı:

Hematoksilen boyama: Apoptotik hücrelerin saptanmasında genellikle ilk metot olarak başlanması uygundur (87). Hematoksilen boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apopitotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir. Gözlenebilen değişiklikler şunlardır: Hücre küçülmesi *cell shrinkage* veya sitoplazmik küçülme *cytoplasmic shrinkage*, kromatinin kondanse olması *nuclear condensation* ve nukleus zarının periferinde toplanması, nukleusun küçülmesi *pyknosis* veya parçalara bölünmesi *nuclear fragmentation* dir

Giemsa boyama: Giemsa ile boyamada hematoksilenle boyamada da olduğu gibi nükleus morfolojisi esas alınarak apopitotik hücreler tanınır.

Floresan mikroskobu/Lazerli konfokal mikroskobu: Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini, dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilir (87). Hematoksilen ya da Giemsa boyamanın kullanıldığı örneklerde hücrelerin tamamı yöntemin

prensibi gereği ölmektedir. Canlı ve ölü hücre ayrımını yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örneğin Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örneğin propidium iyodür) beraber kullanılır. Bu şekilde boyanan hücreler bir floresan mikroskobu ile tanınabilir.

Elektron mikroskobu: Elektron mikroskobu ile değerlendirme apoptoziste en değerli yöntem "gold standard" olarak düşünülmektedir (87). Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözlendiği bir yöntemdir.

Faz kontrast mikroskobu: Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, "flask" veya "plate"lerde büyütüldüğü çalışmalarda, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır.

Histokimyasal yöntemler:

Anneksin V yöntemi: Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin bulunmaktadır. Eğer hücre apopitozise giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan fosfatidilserin molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Dış yüze transloke olan fosfatidilserinler, floresan bir madde ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilir. Böylece apopitotik hücreler saptanmış olur.

TUNEL yöntemi: DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlar.

M30 yöntemi: M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immünohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir

Kaspaz-3 yöntemi: Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apopitotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi gerekir.

Biyokimyasal yöntemler:

Agaroz Jel Elektroforezi: DNA kırıklarının gösterilebildiği bir yöntemdir. Apopitoziste DNA internükleozomal bölgelerden kırıldığı için merdiven görüntüsü "ladder pattern" oluşur (87). Bu bulgu apopitozisin karakteristik özelliğidir.

Western blot: Bu metot yardımıyla apopitozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örneğin bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örneğin kaspaz-3) saptanması mümkündür. Ayrıca sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığı da bu metotla belirlenebilir

Flow sitometri: Flow sitometri yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apopitoziste eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin

saptanması mümkündür. Böylece apopitotik hücreler belirlenebilir. İki farklı şekilde uygulanmaktadır:

a. Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak,

b. Anneksin V kullanılarak.

Birincisinde, kompleks bilgisayar işlemleri kullanılarak hücre boyutu ile içerdiği DNA miktarı kıyaslanarak, azalan DNA miktarının apopitozis lehine olduğu gerçeğinden hareketle, apopitotik hücre populasyonu (sub-Gl piki) tayin edilir. İkincisinde, floresan mikroskobuyla uzun zaman alan sayma işlemi saniyeler içinde yapılarak sonuç alınır.

İmmünolojik yöntemler:

l. ELISA:

ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre popülasyonlarında gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür.

2. Flourimetrik yöntem:

Kaspaz aktivasyonu hücre kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır.

Moleküler biyoloji yöntemleri:

DNA Microarrays: Bir lam üzerine binlerce DNA dizisinin bağlanmasıyla oluşturulan gençip ile DNA değişimlerini (mutasyonlar) ve gen ifadesindeki (genden proteine geçiş) değişimleri melezlemeyle saptayan bir yöntemdir.

KARACİĞER FİBROZİSİNİN TEDAVİSİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Tedavi stratejileri, HSH'lar merkez alınarak şu başlıklar altında sıralanabilir; 1-Primer hastalığın 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 aşırı demir ve bakırın uzaklaştırılması, kronik viral hepatitlerde hepatit B virüs ve hepatit C virüsünün eradikasyonu, şistozomiyazis enfestasyonunda

parazitin temizlenmesi, safra yolu mekanik tıkanıklıklarında cerrahi tedavi gibi yöntemler buna örnektir. Daha basit olarak nonalkolik steatohepatitli hastalarda kilo verilmesi ile bile histolojik olarak düzelme sağlanabilir (88,89).

Karaciğer fibrozisinin tedavisi ile ilgili olarak daha önce antifibrotik özellikleri araştırılmış olan bazı ajanlar mevcuttur (88,90). İnflamasyonun ve immün yanıtların baskılanması ile fibrozisin azaldığı birçok yayında gösterilmiştir. Kortikosteroidlerin özellikle otoimmün hepatitli hastalardaki etkileri buna örnek olarak verilebilir (91). Pegile interferon ve ribavirin ile hepatit C virüslü hastaların başarılı tedavisi sonrasında fibrozisin azaldığı bildirilmiştir (92). 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 (93). Renin-anjiotensin sistemi ise oksidan strese yol açmak suretiyle inflamasyonun artmasına katkıda bulunabilir. Bu yüzden anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri ve anjiotensin reseptör blokerleri bu yolla antiinflamatuvar ve antifibrotik etki gösteriyor olabilirler (94,95). Pentoksifilin ve tümör nekroz faktör- alfa (TNF-α) antagonistleri gibi ajanlar TNF-α. aracılı inflamasyonu baskılamakta ve antifibrotik etki göstermektedirler (96). Ursodeoksikolik asit, primer biliyer sirozda muhtemelen antiinflamatuvar faydalı etkileri nedeni kullanılan diğer bir antifibrotik ajandır (97). Çeşitli antioksidanlarla yapılan çalışmalar sonucunda görülmüştür ki, HSH aktivasyonunun önlenmesinde en etkili yaklaşımlardan biri de oksidatif stresin azaltılmasıdır (98,99). İnterferon-α hayvan modellerinde HSH aktivasyonunu engellediği gösterilmiş olan bir sitokin olmakla birlikte, klinik bir çalışmada beklenen antifibrotik etkiyi gösterememiştir (100). Peroksizom proliferatör aktivatör reseptör gamma nükleer reseptörleri (PPAR-α) HSH'ler tarafından eksprese edilmektedir ve PPAR-α reseptörlerine bağlanan ilaçların (tiazolidinedionlar) HSH aktivasyonunu engellediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (101,102). Adiponektin leptinin doğal kontra-regülatuvarı olup özellikle nonalkolik steatohepatitli hastalarda olmak üzere, antifibrotik olarak faydalı olabileceği belirtilmektedir (103). 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) ve Transforming growth factor-alfa (TGF-α) 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 (104). Ek olarak α-linoleik asit,

lipooksijenaz inhibitörleri, PPAR-α agonistleri, hidroksi metil glutaril koenzim A (HMG CoA) redüktaz inhibitörleri ve pentoksifilin gibi ajanların da bu reseptörlerin hücre içi sinyal ileti yollarını inhibe ederek karaciğer fibrozisinde etkili olduklarına dair çalışmalar bulunmaktadır (88). Soluble TGF-α reseptörleri, rekombinant Smad7 gibi TGF-α antagonistleri, TGF-α ile uyarılan ECM üretimini engelleyerek fibrozisi azaltabilmektedir (105). Antioksidan bir bileşik olan halofuginon da kollajen ekspresyonunu inhibe eden ve antifibrotik aktivitesi olan diğer bir ajandır (106). 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 (107). Gliotoksin gibi HSH apopitozisini uyaran ajanların karaciğer fibrozisini azalttığı bildirilmiştir (108).

Son olarak daha önce de belirtildiği gibi matriks metallo proteinaz (MMP) aktivitesinin artırılması ve doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMP) aktivitesinin baskılanması yöntemleri de karaciğer fibrozisinin önlenmesinde etkili yöntemlerdir (90,109).

STATİNLER

3-Hidroksi 3-Metil Glutaril Koenzim A Redüktaz inhibitörlerinin (Statinler) lipid düşürücü etkinliklerinin yanısıra endotel fonksiyonları, inflamasyon ve koagülasyon olaylarında belirgin bir pleotropik etkinlik gösterdikleri de saptanmıştır (110).

Statinlerin Endotel Fonksiyonu Üzerine Etkileri

Endotel hücreleri vasküler sistemin homeostazında rol oynayan, hücresel bütünlüğün sürekliliğini sağlayan ve vasküler sistemin tonüsünü düzenleyen önemli bir otokrin ve parakrin organdır. Çeşitli endojen ve eksojen faktörler nedeniyle vasküler endotelyumun fonksiyonlarında bozukluk görülebilir. Bu faktörlerden birisi de ateroskleroz oluşumuna katkıda bulunan hiperkolesterolemidir. Hiperkolesterolemi ile endotelyal fonksiyon bozulur ve bu fonksiyon bozukluğu, ateroskleroz gelişiminin ilk ve en önemli göstergesidir (111, 112). Endotelyal fonksiyon bozukluğunun en önemli karakteristiği ise endotel hücrelerinden salgılanan Nitrik Oksid (NO) yapımındaki, salınımındaki ve etkinliğindeki azalmadır. Endotelyal NO'nun vasküler gevşemeyi düzenleyerek, trombosit agregasyonunu ve vasküler düz kas proliferasyonunu inhibe ederek aterojenik pek çok fizyo-patolojik olguyu giderdiği gösterilmiştir.

Statinler plazmada düşük dansiteli lipoprotein düzeylerini düşürmek ve yüksek dansiteli lipoprotein düzeylerini artırmak suretiyle (113) endotel fonksiyonu düzeltebilir. Bazı

çalışmalarda, endotel fonksiyonunun düzelmesinin, serum kolesterol düzeylerinin düşmesinden daha önce ortaya çıktığı da görülmüştür (114,115). Bu da, endotel fonksiyonu düzenleyici etkide, kolesterol düşürücü etkiye ek bazı etkilerinin olabileceğini göstermektedir. Ayrıca statinler, endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) aktivitesini arttırarak (116,117) ya da oksidatif stresi azaltarak (118), NO biyoyararlanımını arttırmaktadır. Statinler, endotel fonksiyonunu bozan hipoksi ve okside- düşük dansiteli lipoprotein bulunan ortamlarda da eNOS aktivitesini düzeltmektedir (119,120,116). Doku tipi plazminojen aktivatör yapımını arttırıp (121), endotelin-1 yapımını inhibe etmeleri gibi (122) ya da kalp dokusunda olduğu (123) gibi doku seviyelerini düşürmeleri de endotel fonksiyonu üzerine pozitif etkilerinden sayılmaktadır. Statinlerin Ras ve Rho izoprenilasyonu üzerine etkisi, farnesil pirofosfat ve geranil geraniol pirofosfat ile giderilebilirken, (eNOS) ekspresyonu üzerine etkisi yalnızca geranil geraniol pirofosfat ile giderilmektedir. Bununla birlikte, statinler gen transkripsiyonunu etkilemeden, eNOS ekpresyonunu, eNOS mRNA yarı ömrünü uzatarak artırır (124). Statinlerin endotel fonksiyonu düzeltici etkilerinin oluşmasında rol aldığı ileri sürülen diğer bir mekanizma antioksidan özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Statinler, endotel-kaynaklı gevşemeleri, süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi, reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu inhibe ederek arttırır (118); bununla birlikte, lipid düşürücü etkileriyle vasküler oksidatif stresi zaten azaltmaktadırlar (125,126). Örneğin atorvastatinin aktif metabolitinin antioksidan etkinlik göstererek membran kolesterol birikimini azalttığı gösterilmiştir (110). Statinler, Ras ilişkili C3 botulinum toksin substrat 1 (Rac-1) aracılı nikotinamid adenin dinükleotit oksidaz aktivitesini inhibe ederek ve anjiotensin tip-1 reseptör ekspresyonunu azaltarak vasküler düz kasta anjiotensin 2 ile indüklenen serbest radikal üretimini azaltmaktadır (127). Nitrik oksit, reaktif oksijen radikalleri tarafından inaktive edildiğinden statinlerin antioksidan özelliği NO'nun endotelyal fonksiyonu düzeltici etkilerine katkıda bulunmaktadır (128,129).

Vasküler Düz Kas Hücre Proliferasyonu

Vasküler düz kas hücre proliferasyonu vasküler lezyon patogenezinde önemli bir olaydır. Hücresel proliferasyonun artmasıyla birlikte vasküler yataklarda belirgin bir kalınlaşma görülebilmektedir. Yapılan çalışmalar, statinlerin, transplant-ateroskleroz gibi immünolojik kaynaklı vasküler proliferatif hastalıkları azalttığını göstermiştir (130,131). Statinlerin sağladığı izoprenoid inhibisyonu, düz kas hücrelerinde trombosit türevli büyüme faktörü ile indüklenen DNA sentezini azaltmakta (132) ayrıca statinlerin pleotropik etkinliğine aracılık etmektedir (133). Küçük guanozin trifosfat bağlayan proteinler olan Ras ve

Rho, membran lokalizasyonu ve aktivasyonu için posttranslasyonel modifikasyonu gerektirdiğinden ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol aldığından, statinlerin direkt düz kas antiproliferatif etkileri için olası temeli oluşturur. Ras mitojen ile aktifleşen protein kinaz yolağını aktive ederek hücre döngüsünü ilerletirken (134), Rho hücresel proliferasyon yapar (135). Statinlerle inhibe olan vasküler düz kas hücre proliferasyonu, farnesil pirofosfat ya da düşük dansiteli lipoprotein kolesterol ile değil, geranil geraniol pirofosfat ile giderilebilir (132). Rho kaynaklı trombosit türevli büyüme faktörü ile indüklenen vasküler düz kas hücre proliferasyonu ve statinlerle sağlanan Rho inhibisyonu, statinlerin vasküler düz kas hücre proliferasyonunu inhibe edici etkisinin temelini oluşturur.

Statinlerin Trombosit Fonksiyonu Üzerine Etkisi

Bilindiği gibi trombositler akut koroner sendromların oluşumunda önemli roller oynamaktadır (136). Akut koroner sendromlarda plak ve vasküler hasar alanında akut trombüs oluşumunun gözlendiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (137). Trombositlerin aktive olmasına neden olan faktörlerden birisi de hiperkolesterolemidir. Hiperkolesteroleminin trombosit reaktivitesini arttırdığı daha önce belirlenmiştir (138). Bu anomaliler, trombositlerdeki kolesterol/fosfolipid oranındaki artış ile bağlantılıdır. Buna ek olarak diğer potansiyel mekanizmalar tromboksan A2 biyosentezinde (139), trombosit α2-adrenerjik reseptör yoğunluğunda (140) ve trombosit sitozolik kalsiyum düzeyinde (141) artışı içerir. Statinlerin çeşitli patolojik olgularda artan trombosit aktivitesini inhibe ettiği gözlemlenmiştir (142-144). Statinlerin bu etkisinde tromboksan A2 ve trombosit membranındaki kolesterol içeriğinin düzenlenmesi önemli rol oynamaktadır (145). Ayrıca, hayvan çalışmalarında, statin tedavisi ile hasarlı damarlarda trombosit agregasyonunun inhibe olduğu ve trombosit trombus oluşumunun azaldığı da gösterilmiştir (146,147). Statinlerin, makrofajların doku faktör ekspresyonunu inhibe ederek, vasküler duvarın trombotik potansiyeli de azalttığı *in vitro* çalışmalarla desteklenmiştir (146). Bütün bu çalışmalar çeşitli patolojik olguların tedavi edilmesinde statinlerin olası iyileştirici etkilerini göstermesi açısından önemlidir.

Statinlerin Plak Stabilitesi Üzerine Etkisi

Bilindiği gibi aterosklerotik plakların bulundukları yerden ayrılmaları, akut koroner sendrom nedenlerinden biridir (112,148,149,150). Aterosklerotik lezyon, lipid çekirdeğinin içinde trombojenik materyal içerir ve bu fibröz yapıyla kaplanarak kan dolaşımıyla bağlantısı kesilir. Fibröz yapıda oluşan herhangi bir çatlama, yırtılma ya da hasar sonucu, plak

bulunduğu yerden ayrılır ve tromboz oluşur (137). Kollajen, fibröz yapının ana bileşenidir ve gerginliğinin korunmasını sağlar. Makrofajlar ise fibröz yapıyı aşındırabildiğinden, aterosklerotik plak oluşumunda ve stabilitesinin sağlanmasında önemli rol oynar (151). Matriks metalloproteinler (MMP) gibi makrofajlarca aktive edilen proteolitik enzimlerin salgılanması, fibröz yapının aşınmasına neden olabilir. Aşınan fibröz yapı da plak stabilitesinin bozulmasına, plağın bulunduğu yerden kopmasına ve sonuçta trombüs oluşumuna neden olmaktadır (148). Statinlerle sağlanan lipid düşürücü tedavi, plak boyutunun küçültülmesi ve lipid çekirdeğin fizokimyasal özelliklerinin düzenlenmesi ile plak stabilitesinin korunmasına katkıda bulunur (152). Lipid düşürücü tedavi ile plak boyutunda olan değişim, zaman gerektiren bir süreçtir ve anjiografi ile saptanabilir. Lipid düşürücü tedavinin klinikteki önemi, MMP üretiminin inhibe edilmesi ve aterosklerotik lezyonda makrofaj birikiminin azaltılması biçimindedir (153). Öte yandan, statinlerin MMP ekspresyonu ve doku faktörleri üzerine inhibitör etkileri, kolesterole bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla sağlanır (152,153). Kolesterolden bağımsız etkileri ya da direkt makrofajlar üzerine olan etkileri, daha kısa bir süreçte ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, statinlerin plak stabilizasyonu üzerine olan etkileri, lipid, makrofaj ve MMP düşürücü etkilerinin kombinasyonu sonucu oluşmaktadır (153). Statinlerin bu etkileri, plakların bulundukları yerden ayrılma eğilimlerini, buna bağlı olarak akut koroner sendrom oluşma sıklığını azaltmaktadır.

Ateroskleroz ve Statinlerin Vasküler İnflamasyon Üzerine Etkisi

Ateroskleroz, ateroma içinde T lenfositler, monositler ve makrofajların bulunmasıyla karakterize olan kompleks bir inflamatuvar olgudur. Ateroma içindeki makrofajlar ve T lenfositler tarafından salgılanan inflamatuvar sitokinler, endotel fonksiyonunu, düz kas hücre proliferasyonunu, kollajen degradasyonunu ve trombozisi değiştirebilir (148).

Makrofajların aktivasyonuyla birlikte başlayan süreç sonucunda gerçekleşen monosit adezyonu ve sonrasında monositlerin subendotelyal yüzeye geçişleri aterojenezisin erken fazını oluşturmaktadır (154). Son yapılan çalışmalar, statinlerin aterosklerotik plaklarda bulunan inflamatuvar hücreleri azaltabilme yeteneklerinin onların antiinflamatuvar özelliklerinden kaynaklandığını göstermiştir (145). Etkinin mekanizması tam olarak açıklanamasa da, statinlerin bir düzenleyici bölge olan α2 integrin ve lökosit fonksiyonlu antijen-1'e bağlanarak inflamatuvar yanıtı azalttığı gösterilmiştir (155).

Statinlerin, normokolesterolemik ve diyabetik hayvanlarda, P selektin ve lökosit adezyonunu azaltarak iskemik myokardiyumu koruduğu da gösterilmiştir (156,157).

Kolesterol düşürücü etkilerinden bağımsız olarak ortaya çıkan bu etkinin, eNOS eksikliğinde ya da L-nitro arjinin metil ester ile tedavi edilen deney hayvanlarında oluşmuyor olması, statinlerin vasküler koruyucu etkilerinin eNOS bağımlı olduğunu göstermektedir.

Bu mekanizmalara ek olarak, inflamasyonun göstergesi olan ve karaciğer tarafından proinflamatuvar sitokinlere yanıt olarak üretilen yüksek duyarlı C reaktif proteinin (158) yükselmiş düzeyleri koroner arter hastalıklarının bir göstergesi olarak bilinir ve koroner arter hastalığı ile koroner iskemisi olan hastalarla, myokard infarktüsü geçiren hastalarda oldukça yüksektir (159).

Statin tedavisinin hiperkolesterolemisi olan hastalardaki yüksek duyarlı C reaktif proteinin düzeyini de düşürdüğü saptanmıştır (160). Bununla birlikte, yapılan çalışmalar, statinlerin sistemik ve vasküler inflamasyonu azalttığını da göstermiştir (159).

Özetle, statin grubu ilaçlar pleotropik etkileri sayesinde başta endotel fonksiyonunun düzeltilmesi olmak üzere bir çok olumlu etki meydana getirmektedirler.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

DENEY HAYVANLARI VE PROTOKOLÜ

Bu deneysel çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 2010/042 sayılı onayı alınarak gerçekleştirilmiştir (Ek-1). Çalışmamızda, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden temin edilen toplam 40 adet Spraque-Dawley cinsi (180-210 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/100 gr/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+Pravastatin (n=10): Ligasyon işlemi yapılan deneklere 5 mg/kg dozunda pravatatin sodium haftada 5 gün gavaj yoluyla 4 hafta boyunca verildi.

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 Laboratuvarı, Türkiye) ile bölge asepsisi sağlandıktan sonra orta hat kesisi yapılarak karın açıldı. Safra ligasyonu işlemi Criado ve ark.'nın (161) 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 5 mg/kg/gün dozunda haftada 5 gün 4 hafta boyunca gavaj yoluyla uygulandı. Diğer sıçan gruplarına ise haftada 5 gün serum fizyolojik gavaj yoluyla uygulandı. Dört hafta sonunda tüm deneklere ketamin 50 mg/kg dozunda intraperitoneal yolla verilerek anestezi sağlandı. Karın orta hattan tekrar açıldı ve kalpten alınan kan karaciğer fonksiyon testleri olan aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz(ALP), gama glutamil transpeptidaz (GGT) ile direkt bilirübin (DBİL) ve total bilirübin (TBİL) serum düzeyi çalışılmak üzere tüpe konularak sıçanlar sakrifiye edildi (Şekil 3). Sıçanların karaciğerleri tümüyle çıkarıldı. Doku örnekleri, ışık mikroskobu ve immünohistokimyasal inceleme için %10'luk formaldehide konularak tespit edildi.



Şekil 3. Sıçan kalbinden biyokimyasal inceleme amaçlı kan örneği alınması

BİYOKİMYASAL İNCELEME

Biyokimyasal inceleme Trakya Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı Merkez Laboratuvar'ında işlemlendirildi. Biyokimyasal incelemelerden karaciğer fonksiyon testleri olan AST, ALT, ALP, GGT ile total ve direkt bilirübin düzeyi çalışıldı.

HİSTOLOJİK İNCELEME

Histolojik inceleme Trakya Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Hematoksilen-eozin boyama yönteminin uygulanışı

1-4 mikron kalınlığında kesitler alındı.

2-30 dakika 60 ˚C etüvde bekletildi.

3-30 dakika ksilen içinde bekletildi.

4-%96'lık alkol 50 saniye muamele edildi.

5-%90'lık alkol 50 saniye muamele edildi.

6-%80'lik alkol 50 saniye muamele edildi.

7-%70'lik alkol 50 saniye muamele edildi.

8-Çeşme suyu 2 dakika muamele edildi.

9-Hematoksilen 5 dakika muamele edildi.

10-Çeşme suyu 2 dakika muamele edildi.

11-Asit alkol diferansiasyonuna (%70'lik alkolden 99 cc, HCL'den 1 cc) 3 saniye muamele edildi.

12-Çeşme suyu 2 dakika muamele edildi.

13-%1'lik amonyak 15 saniye muamele edildi.

14-Çeşme suyu 2 dakika muamele edildi.

15-Eosin 30-45 saniye muamele edildi.

16-Çeşme suyu 2 dakika muamele edildi.

17-%70'lik alkol 5 saniye muamele edildi.

18-%80'lik alkol 5 saniye muamele edildi.

19-%90'lık alkol 5 saniye muamele edildi.

20-%96'lık alkol 5 saniye muamele edildi.

21-Aseton 5 saniye muamele edildi.

22-Havada kurutma işlemi yapıldı.

23-Ksilon 5 saniye muamele edildi.

24-Balzam (entellan) ile lam lamel arasında kapatma yapıldı.

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM

İmmünohistokimya, immünolojik ilkelere dayanarak varlığı araştırılan antijenlere karşı geliştirilmiş, poliklonal veya monoklonal antikorlar aracılığıyla dokudaki antijeni göstermek amacıyla kullanılan bir yöntemdir.

Her olgudan bir kesit alınarak immünohistokimyasal çalışma için kullanıldı. Kaspaz-3 (Thermo Scientific, kaspaz 3 (CPP32) Aby (Rabbit PAb), lot 1002c, Ref:RB 1197-R7) ve kaspaz-9, Ab-4, Neomarkers, lot-1205p1002E) için aşağıda belirtilen tüm yöntemler uygulandı. Alfa smooth muscle aktin (SCYTEK, Smooth musc'e), clone1A4, Ref a 00002, lot 21515) için ise 6. yöntem dışında tüm yöntemler uygulandı. Kaspaz-3, kaspaz-9 ve α-SMA için kullanılan universal kitler ise (Streptavinidin link) (SP Link HRP Broad Bulk kit) (for Mouse and rabbit primary antibody) (lot=K1202719A) ve AEC Kromogen SP Link Broad kit (for mouse and rabbit primary antibody with AEC kromogen) (lot=K116714C)

1-Parafin bloklardan 4 mikron kalınlığında kesitler yapıldı. Kesitler 1/10'luk Poly-L-Lysine solüsyonu ile muamele edilmiş camlara alındı.

2-Kesitler 1 gece 37 ˚C bekletilerek deparafinize edildi.

3-Boyama öncesi deparafinizasyona ksilen ile devam edildi. Bu işlem 60 ˚C etüvde 3 kez 10'ar dakika bekletme ve her 10 dakikanın ardından 5'er dakika dışarıda soğumaya bırakma şeklinde uygulandı.

4-Ksilenin giderilmesi için %96'lık alkol muamelesine geçildi. Kesitler 60˚C etüvde 4 defa 10'ar dakika tutuldu.

5-Lamlar 3 kez distile sudan geçirildi.

6-Kaspaz-3 ve kaspaz-9 için geri kazanım işlemi yapıldı. 'EDTA buffer (Bio-optica, lot 290940,15M820) PH 6.0 antijen anmaster (10X, heat-indüced epitope) solüsyonu kullanıldı. Doksan ml distile suya 10 ml sitrat buffer solüsyonundan eklenerek dilüe edildi.

a)Mikrodalga fırında maksimum watt'ta 20 dakika, 600 wattta 10 dakika kaynatıldı.

b) Dışarıda oda sıcaklığına gelene kadar 20 dakika bekletildi.

c) Lamlar 3 kez distile sudan geçirildi.

7-Dokularda bulunan endojen peroksiti bloke etmek için 10 dakika 37 ˚C etüvde metanolde hazırlanmış %3'lük H_2O_2 uygulaması yapıldı.

8-Lamlar 3 kez distile sudan geçirildi.

9-Lamlar pH 7.4 olarak hazırlanmış PBS solüsyonunda 10 dakika bekletildi.

10- Reaktiflerin kesit dışına taşmasını engellemek için lamlardaki kesitlerin etrafı Papen ile çizildi.

11-Herbir lama Large Volume Ultra V Blok (Kod No: TA-125-UB, Neomarkers, Fremont, CA, ABD) damlatıldı ve 7 dakika bekletildi. Sonra solüsyon lamlar üzerinde uzaklaştırıldı.

12-Her bir sıçan için ayrı ayrı numaralandırılmış lamlara kaspaz-3, kaspaz-9, α-SMA için oda sıcaklığında, ancak nemli ortamda 30 dakika inkübasyon yapıldı.

13-Lamlar üzerindeki antikorlar distile su ile uzaklaştırılıp PBS solüsyonuna alınarak 5 dakika bekletildi.

14-UltraVision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP kitinin (Kod No. TA 125-HL, Neomarkers, Fremont, CA, ABD) solüsyonu damlatıldı ve 15 dakika bekletildi.

15-PBS solüsyonu ile 5 dakika yıkanan lamlara, 2 no'lu biotine bağlanacak olan işaretleyici 'Streptavidin Peroxidase' (Kod No. TS-125-HR, Neomarkers, Fremont, CA, ABD) damlatıldı ve 15 dakika daha bekletildi.

16-Distile su ile yıkanan lamlar PBS solüsyonunda 5 dakika bekletildi.

17-UltraVision Detection System Large Volume AEC Substrate System (RTU) (Kod No. TA-125-HA, Neomarkers, Fremont, CA, ABD) kitinden karıştırılarak hazırlanan renklendirici solüsyon kesitler üzerine damlatılarak 10 dakika bekletildi.

18-Distile su ile yıkanan lamlar Mayer Hematoksilen solüsyonunda 1 dakika tutularak zıt boyama yapıldı.

19-Lamlar musluk suyunda yıkandı.

20-Lamlar %5'lik amonyak solüsyonuna bir kez batırılarak morartma işlemine tabi tutuldu.

21-Lamlar musluk suyunda yıkandı.

22-Gliserol jel kullanılarak lamel ile kapatıldı.

HİSTOLOJİK İNCELEME

Karaciğer dokusunun genel özelliklerini ortaya koyabilmek amacıyla Masson Trichrome (Bio-optica, R11ST16) ile boyama yapıldı. Masson Trichrome için kullanılan reajantlar: A-Weigert's iron hematoksilen 18 ml B- Weigert's iron hematoksilen 18 ml C-Picric asit 30 ml D-Ponceau asid fuscin 30 ml E-Fosfomolidik asid 30 ml F-Masson anilin blue 30 ml.

Masson Trichrome Uygulanışı

1- 5 mikron kalınlığında kesitler lam üzerine alındı.

2- 30 dakika 60˚C'lik etüvde bekletildi.
3- 30 dakika ksilonda bekletildi.
4- %96'lık alkol 5 saniye muamele edildi.
5- %90'lık alkol 5 saniye muamele edildi.
6- %80'lik alkol 5 saniye muamele edildi.
7- %70'lik alkol 5 saniye muamele edildi.
8- Çeşme suyu 2 dakika muamele edildi.
9- Lamların üzerindeki doku örneklerinin etrafında papen ile zon (sınır) bölgesi oluşturuldu.
10- Distile sudan geçirildi ve 20 dakika bekletildi.
11- A solüsyonundan 6 damla + B solusyondan 6 damla karıştırılıp 10 dakika inkübasyon yapıldı.
12- Yıkama yapmadan C solüsyonu damlatılıp 4 dakika inkübe edildi.
13- Distile suda 3-4 saniye hızlıca yıkandı ve 10 damla D solüsyonunda inkübe edildi.
14- Distile suda yıkandı.10 damla E solüsyonunda 10 dakika inkübe edildi.
15- Çeşme suyunda yıkandı ve 10 damla F solüsyonunda 5 dakika inkübe edildi.
16- Distile suda yıkanarak yüzde doksan altılık alkol Abs (%99.5'lik) alkolde dehidratasyon sonrası havada kurutuldu.
17- Entellan (Balzam) ile lam lamel arasında kapatıldı.

İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Karaciğere ait doku örnekleri 24 saat boyunca devam eden %10 formalin tespitinin ardından gece boyunca alkol takibine tabi tutulmuşlardır. Dokuların parafine gömülmesinin ardından elde edilen 5 mikron kalınlığındaki kesitler rutin hematoksilen-eozin boyaları ile boyanmış ve ışık mikroskobu altında değerlendirilmiştir. Dokulardan ayrıca polilizin kaplı alınan 5 mikron kalınlığındaki kesitlere immünohistokimyasal olarak kaspaz-3, kaspaz-9 ve α-SMA antikorları uygulanmıştır. Ayrı bir kesite histokimyasal olarak bağ dokusu boyası olan Masson's Trichrome uygulanmıştır. Kaspaz-3 ve kaspaz-9 sonuçları boyanma şiddeti ve boyanma yaygınlığı göz önüne alınarak ayrı ayrı semikantitatif olarak not edilmiştir. Buna göre; 0-boyanma yok, 1- hafif, 2-orta ve 3-şiddetli olarak kabul edilmiştir.

Buna göre safra duktüllerinde proliferasyon arttıkça karaciğer parankiminin yerini duktüllerin alması sonucunda lobüllerde izlenen sinüzoidal patern alanları daralmış ve parankim kaybının değerlendirilmesi kolaylaşmıştır. Ayrıca Masson Trichrome boyası ile prolifere safra duktülleri çevresindeki stromal fibrozis ortaya koyularak duktüler

proliferasyonun oranının anlaşılmasına yardımcı olmuştur. Fibrozisin histopatolojik değerlendirilmesi Tablo 1'e göre, portal alanlarda izlenen inflamasyon ise Tablo 2'ye göre yapılmıştır. Prolifere olan duktüllerin karaciğer parankimine oranları ise her bir vaka için yüzde olarak not edilmiştir.

Tablo 1. Fibrozisin histopatolojik değerlendirilmesi

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

Tablo 2. İnflamasyonun histopatolojik değerlendirmesi

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

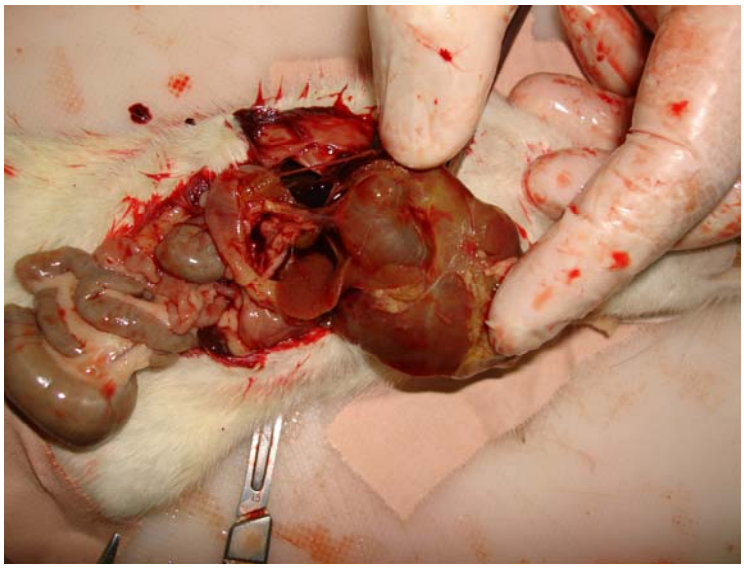
İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilgi İşlem Merkezi'ndeki S0064 Minitab Release 13 (Lisans No: wcp1331.00197) programı kullanılarak yapılmıştır. Parametrik olmayan değişkenlerin birbiri ile ilişkileri Ki-kare test ile araştırıldı. Parametrik değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı. Tüm analizlerde istatistiksel önem düzeyi $p<0.05$ olarak alındı.

BULGULAR

KARACİĞER MAKROSKOPİSİ

Kontrol grubu ve sham grubuna ait karaciğerler normal karaciğer morfolojisine (parlak kahverengi-kırmızı renkte, yumuşak kıvamda, yüzeyi düzgün ve pürüzsüz) sahip olarak izlendi. İlaç verilmeyen ve ligasyon uygulanan grupta daha belirgin olmak üzere ligasyon yapılan tüm gruplarda karaciğerler yeşil-kahverengi renkte, ileri derecede büyümüş, kıvamları sertleşmiş ve yoğun konjesyone görünümdeydi (Şekil 4). Ayrıca koledok kanalı, ligasyon yapılan tüm gruplarda dilate görünümdeydi. Kesit yapıldığında bu karaciğerlerin kesitlerinin ödem ve konjesyon nedeniyle kapsülden dışarı taşmaya eğilim gösterdiği görüldü.

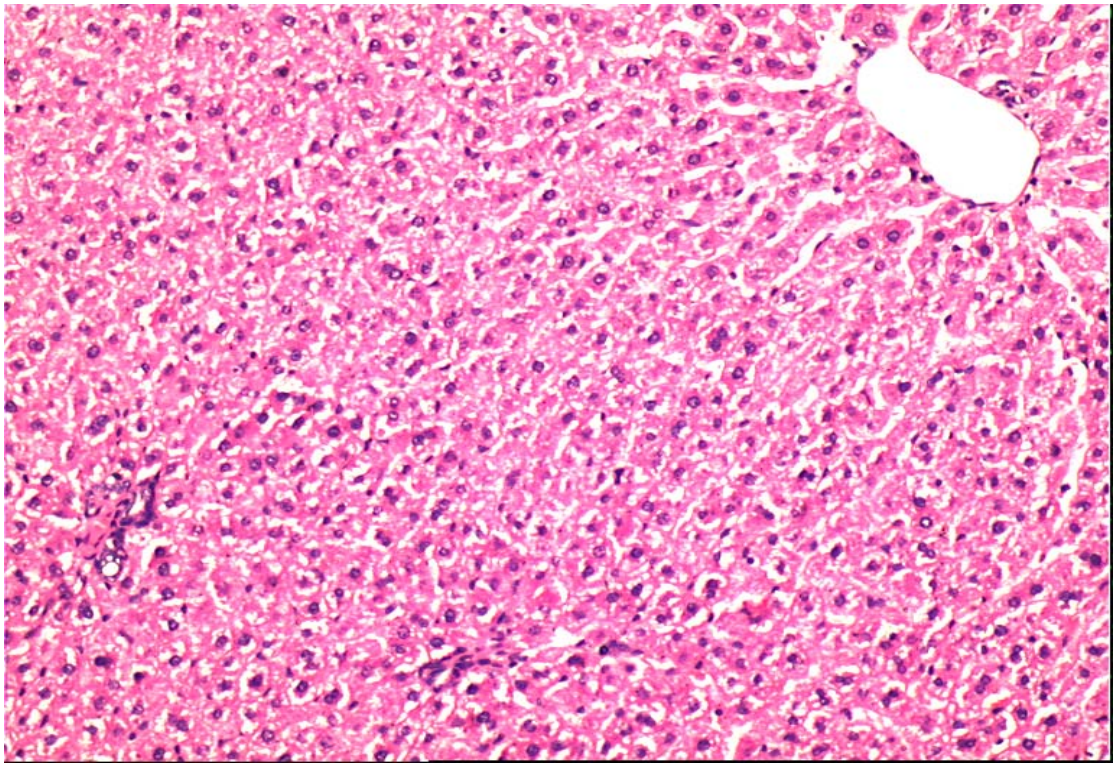


Şekil 4. Safra kanalı ligasyonu yapılan sıçanda karaciğerin makroskopik görünümü

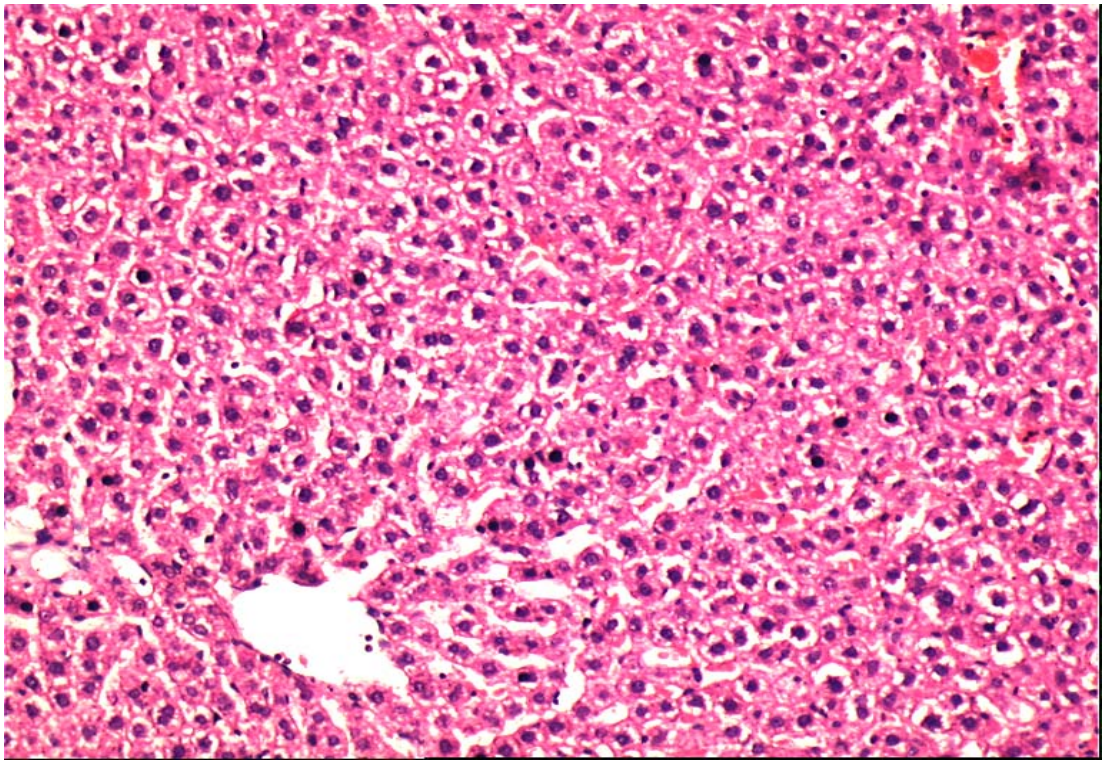
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Karaciğere ait doku örnekleri 24 saat boyunca devam eden %10 formalin tespitinin ardından gece boyunca alkol takibine tabi tutulmuşlardır. Dokuların parafine gömülmesinin ardından elde edilen 5 mikron kalınlığındaki kesitler rutin hematoksilen-eozin boyaları ile boyanmış ve ışık mikroskobu altında değerlendirilmiştir. Şekil 5 ve 6' da kontrol ve sham grubuna ait HE boyama ile karaciğerin normal histolojik görünümü görülmektedir.

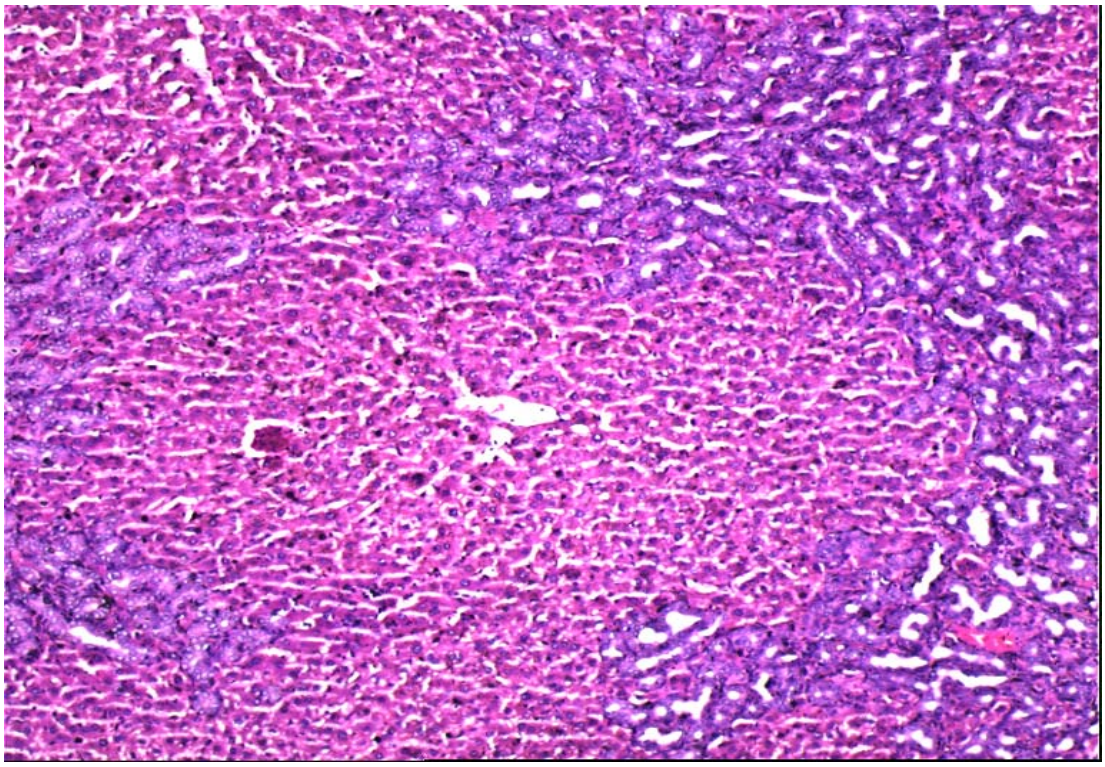
Safra yolu ligasyonu yapılan grupta ise HE boyama ile ileri derecede prolifere olan safra duktülleri izlenmektedir. Prolifere olan safra duktülleri belirgin porto-portal köprüleşmeler oluşturup karaciğer dokusunun tamamında nodüler görünüme sebep olmaktadır (Şekil 7 ve 8). Safra yolu ligasyonu yapılıp pravastatin verilen grupta ligasyon yapılıp ilaç verilmeyen grupla benzer şekilde, HE boyama ile karaciğerin lobüler yapısını bozan yaygın safra duktül proliferasyonu görülmektedir (Şekil 9).



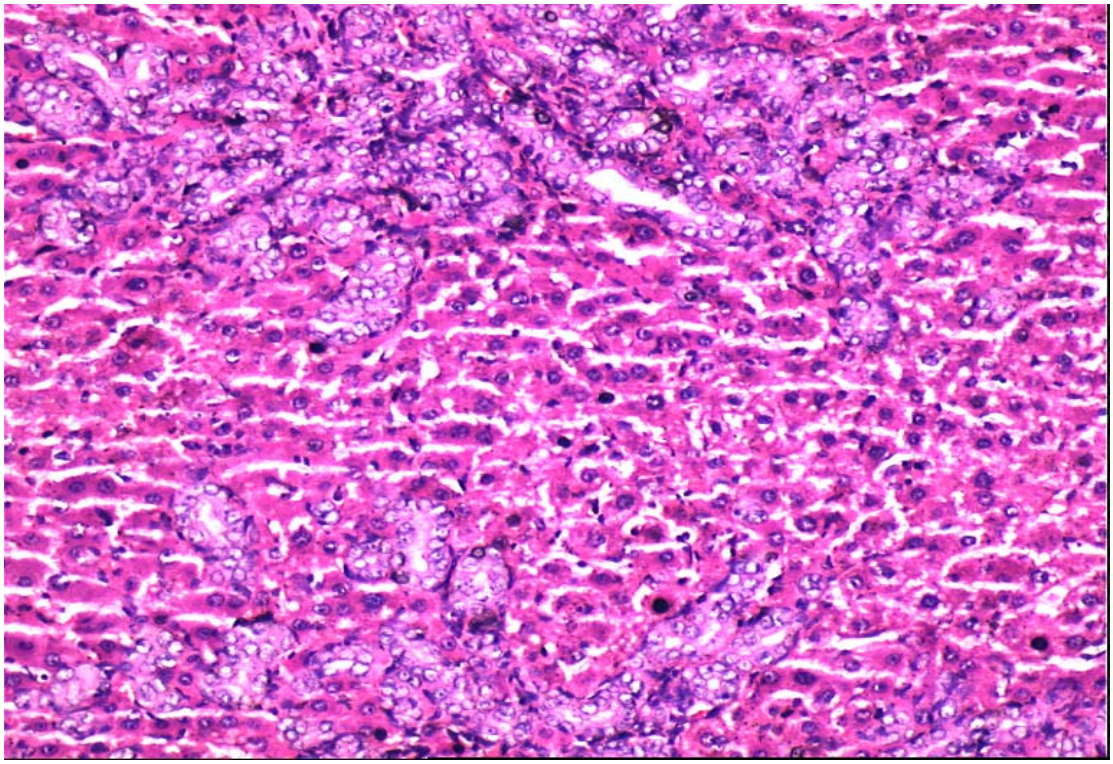
Şekil 5. Kontrol grubuna ait karaciğerin normal histolojik görünümü (HEx100)



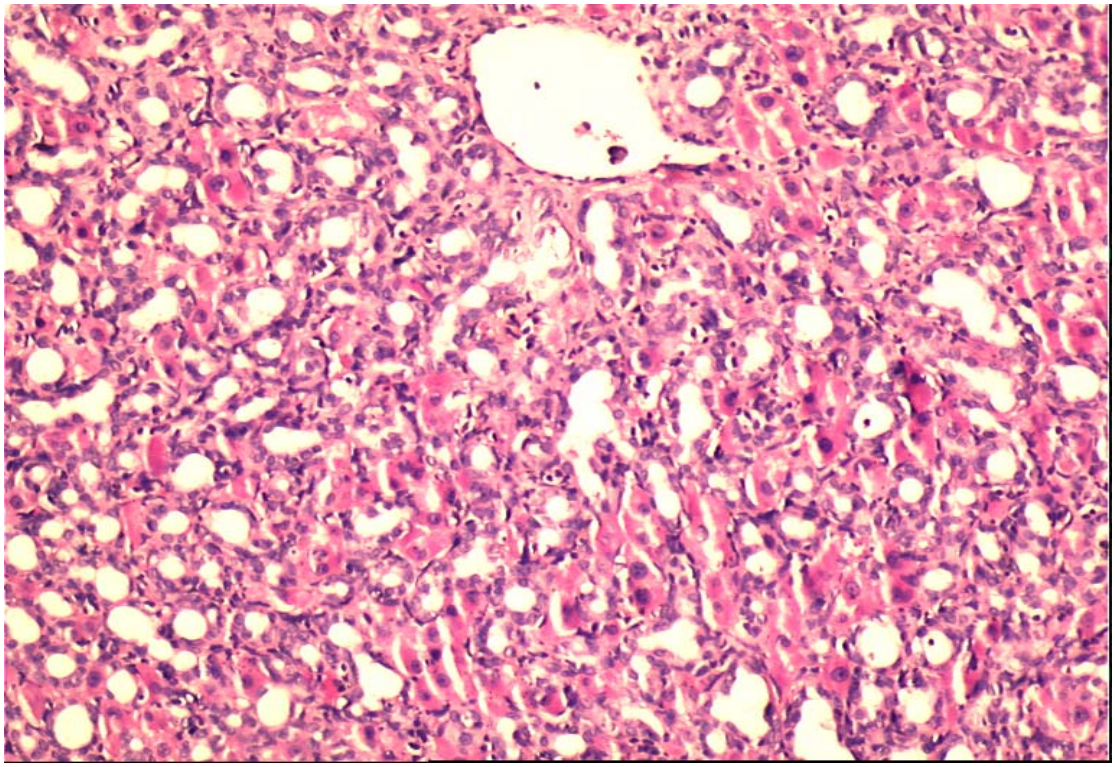
Şekil 6. Sham grubuna ait karaciğerin normal histolojik görünümü (HEx100)



Şekil 7. Ligasyon yapılan grupta presirotik evrede karaciğerde nodüller oluşturacak şekilde prolifere olan safra duktülleri (HEx50)

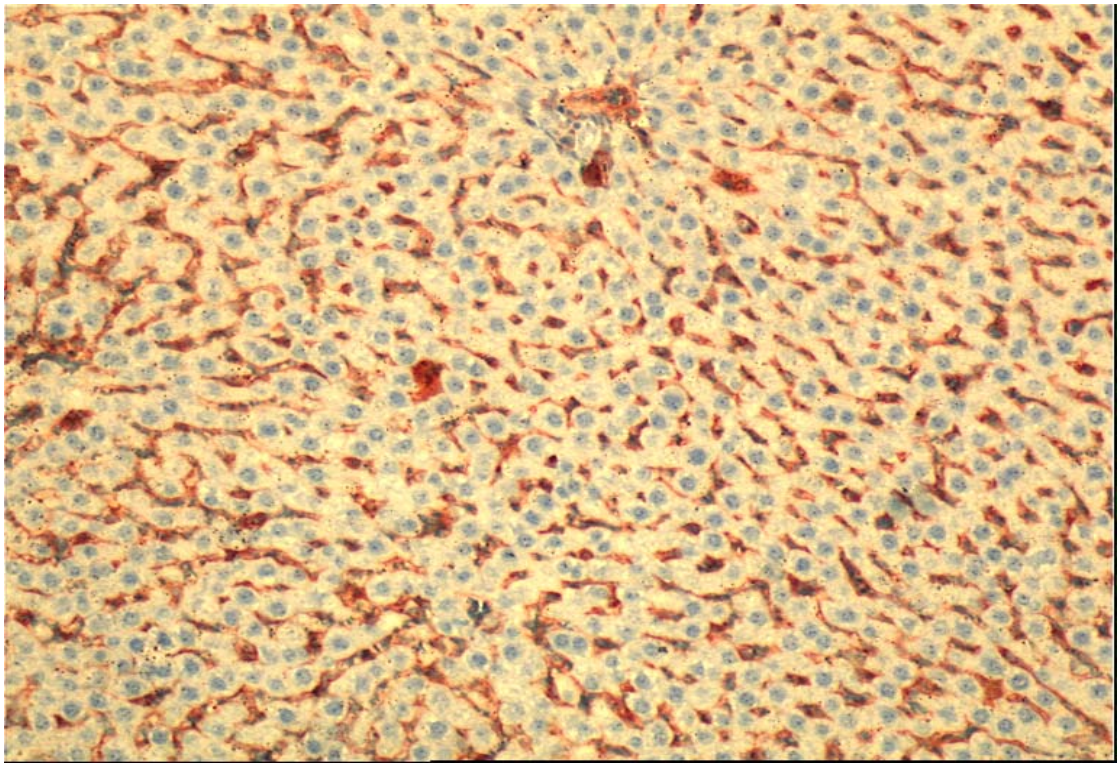


Şekil 8. Ligasyon yapılan grupta safra duktüllerinde belirgin proliferasyon (HEx100)

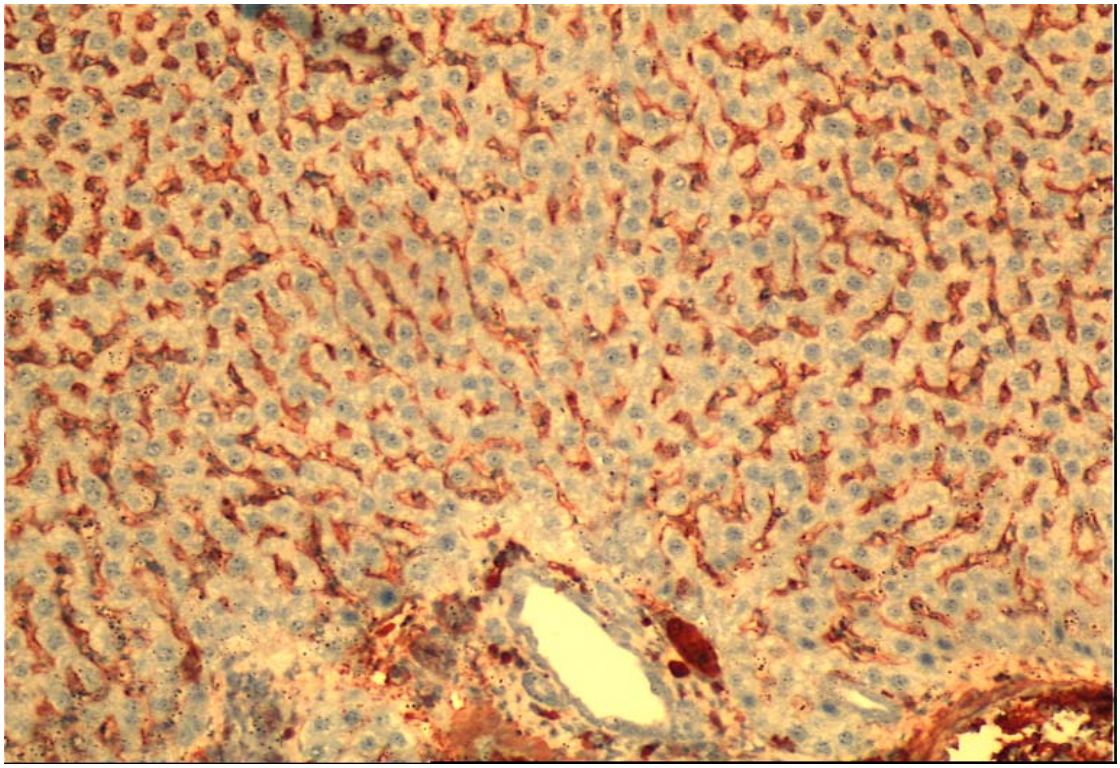


Şekil 9. Ligasyon+pravastatin grubunda safra duktüllerinde karaciğerin lobüler yapısını bozan belirgin proliferasyon (HEx100)

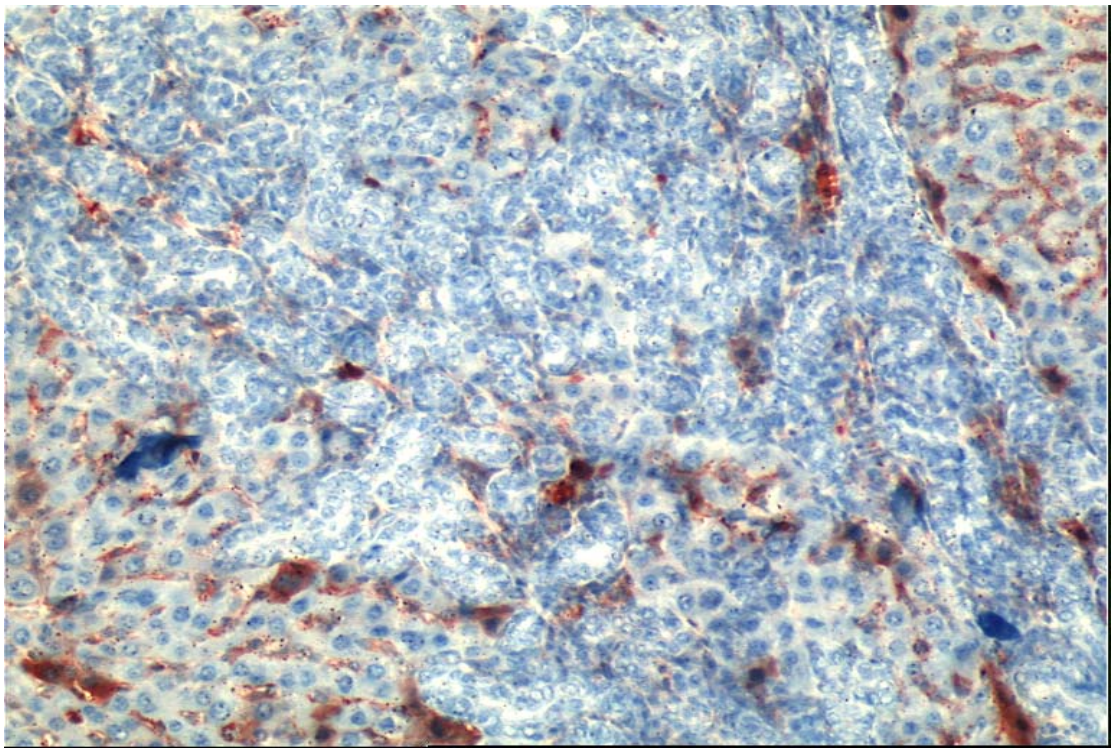
Sıçanlara ait kesitlere immünohistokimyasal olarak kaspaz-3, kaspaz-9 ve α-SMA antikorları uygulanmıştır ve ayrı bir kesite histokimyasal olarak bağ dokusu boyası olan Masson's Trichrome uygulanmıştır. Alfa düz kas aktin ile karaciğer parankiminde izlenen sinuzoidal paternin kaybına bakılmıştır. Kontrol grubu ve sham grubuna ait karaciğerin normal lobüler yapısı ve α-SMA ile sinüzoid endotelinin görünümü Şekil 10 ve 11'de izlenmektedir. Buna göre safra duktüllerinde proliferasyon arttıkça karaciğer parankiminin yerini duktüllerin alması sonucunda lobüllerde izlenen sinüzoidal patern alanları daralmış ve parankim kaybının değerlendirilmesi kolaylaşmıştır. Ligasyon yapılan grupta safra duktüllerindeki proliferasyon nedeniyle sinüzoidal yapının ortadan kalktığı izlenmektedir (Şekil 12,13).



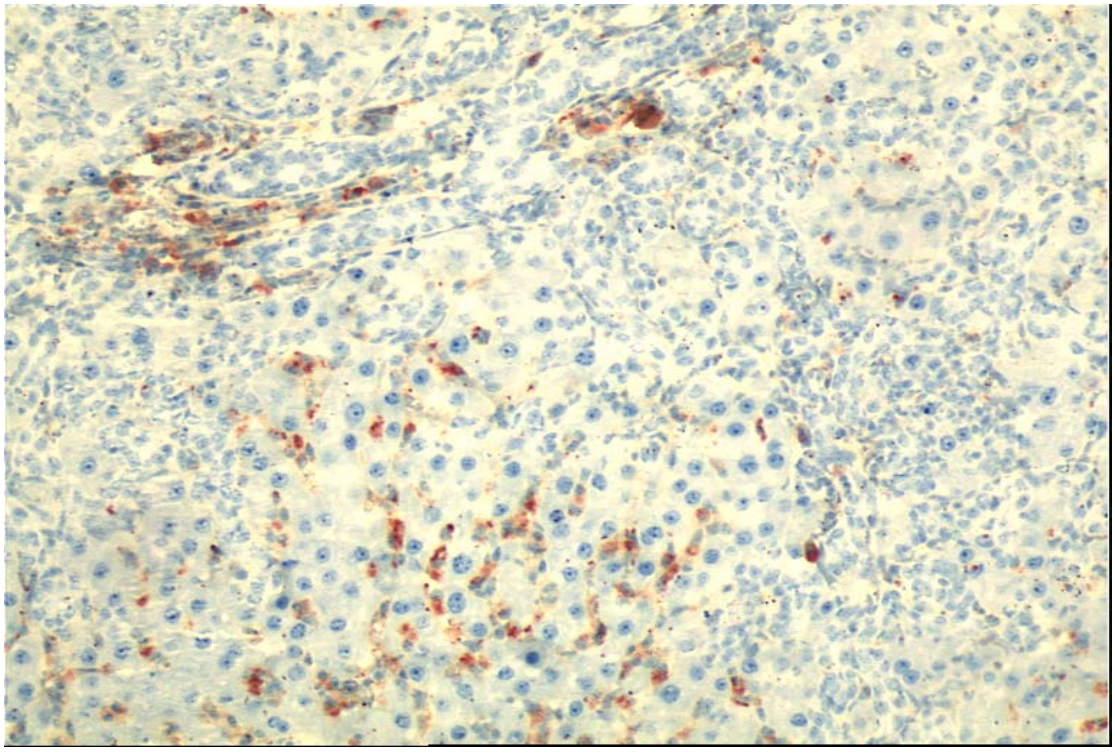
Şekil 10. İmmünohistokimyasal olarak alfa düz kas aktini ile sinüzoid endotelinin oluşturduğu reaksiyon ile belirginleşen kontrol grubuna ait karaciğerin normal lobüler yapısı (α-SMAx100)



Şekil 11. Sham grubunda immünohistokimyasal olarak alfa düz kas aktini ile sinüzoid endotelinin oluşturduğu reaksiyon ile belirginleşen karaciğerin normal lobüler yapısı (α-SMAx100)

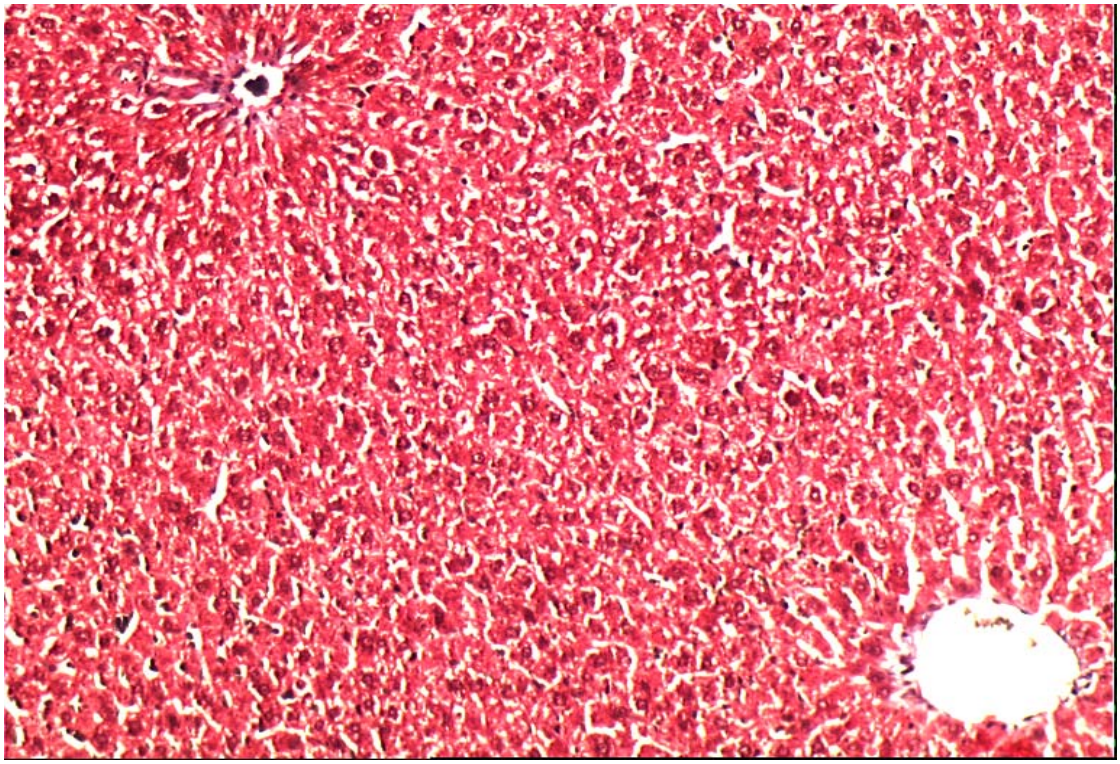


Şekil 12. Ligasyon yapılan grupta safra duktüllerindeki şiddetli proliferasyon nedeniyle büyük oranda ortadan kalkan sinüzoidal yapı (IHK, α-SMAx100)

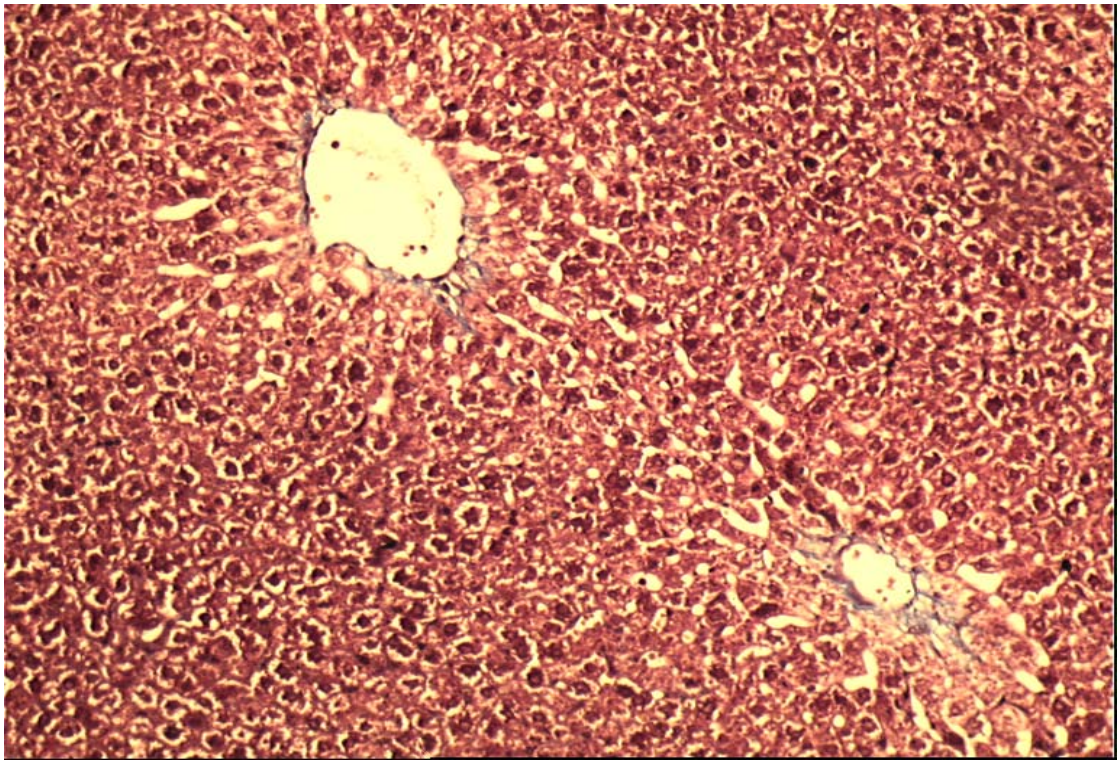


Şekil 13. Ligasyon+pravastatin grubunda safra duktüllerindeki şiddetli proliferasyon nedeniyle büyük oranda ortadan kalkan sinüzoidal yapı (IHK, α-SMAx100)

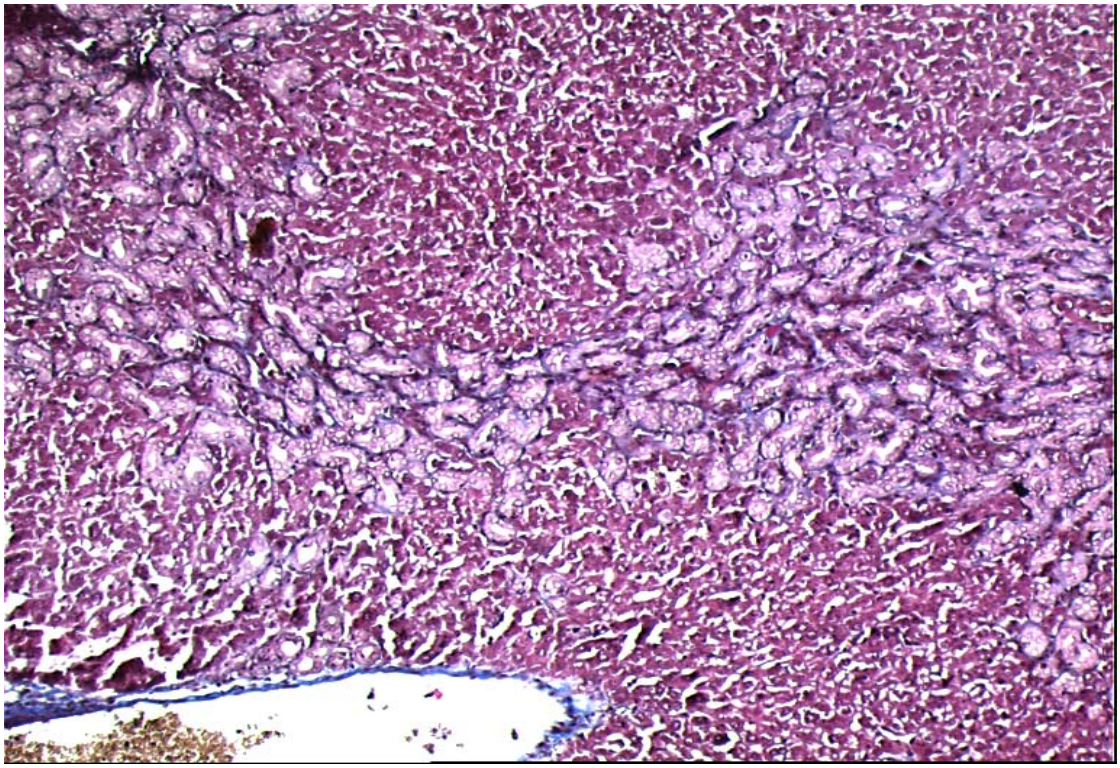
Ayrıca Masson Trichrome boyası ile, prolifere safra duktülleri çevresindeki stromal fibrozis ortaya koyularak duktüler proliferasyonun oranının anlaşılmasına yardımcı olmuştur. Prolifere olan duktüllerin karaciğer parankimine oranları her bir vaka için yüzde olarak not edilmiştir. Kontrol grubu ve sham grubuna ait karaciğerde Masson Trichrome boyası ile normal histolojik görünüm Şekil 14 ve 15'de izlenmektedir. Ligasyon yapılan grupta presirotik evrede duktüler proliferasyonun karaciğerde nodüller oluşturacak şekilde görünümü izlenmektedir. Ayrıca prolifere safra duktüllerinin etrafında hafif dereceli fibrozis de görülmektedir (Şekil 16 ve 17). Ligasyon yapılarak pravastatin verilen grupta prolifere safra duktülleri ve onu çevreleyen fibrozis izlenmektedir (Şekil 18).



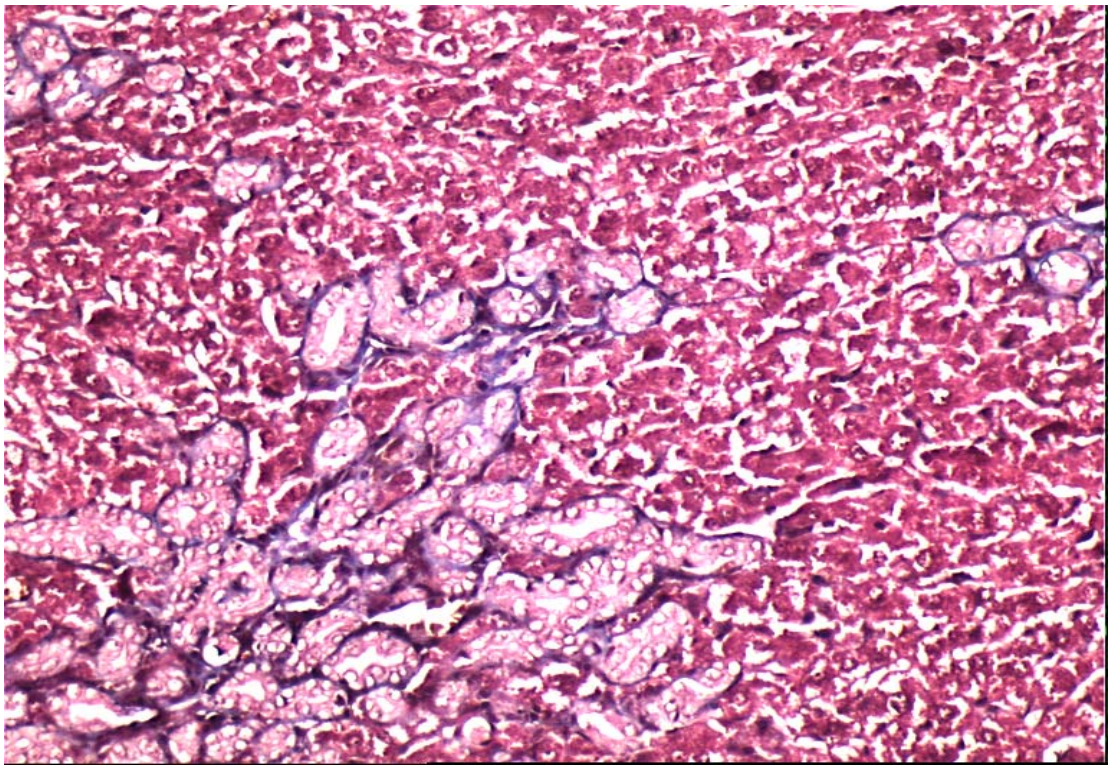
Şekil 14. Kontrol grubuna ait karaciğerde, fibrozis izlenmeyen normal histolojik görünüm (Masson Trichrome x 100)



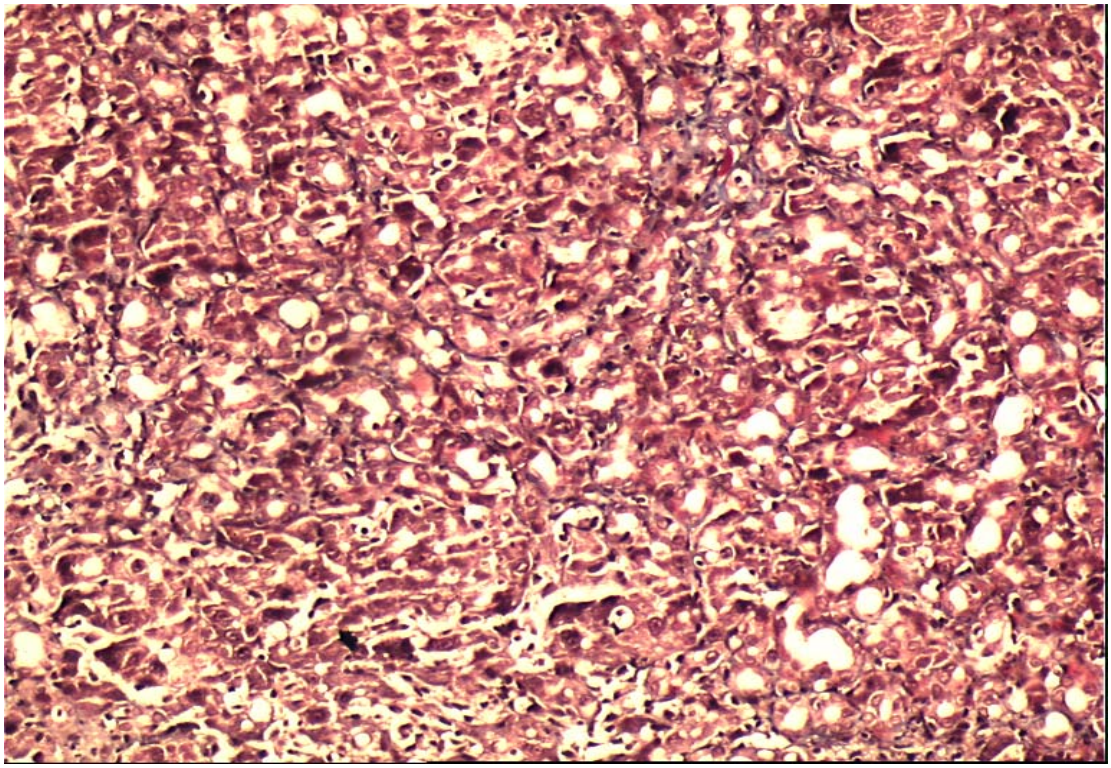
Şekil 15. Sham grubuna ait karaciğerde fibrozis izlenmeyen normal histolojik görünüm (Masson Trichrome x 100)



Şekil 16. Ligasyon yapılan grupta presirotik evrede karaciğerde nodüller oluşturacak şekilde prolifere olan safra duktülleri (Masson Trichrome x50)



Şekil 17. Ligasyon yapılan grupta prolifere safra duktüllerinin etrafında hafif dereceli fibrozis (Masson Trichrome x 100)



Şekil 18. Ligasyon+pravastatin grubunda prolifere olan safra duktüllerini fokal olarak çevreleyen hafif dereceli fibrozis (Masson Trichromex100)

Kaspaz-3 ve kaspaz-9 sonuçları boyanma şiddeti ve boyanma yaygınlığı göz önüne alınarak ayrı ayrı semikantitatif olarak not edilmiştir. Buna göre; 0-boyanma yok, 1- hafif, 2-orta ve 3-şiddetli olarak kabul edilmiştir. Buna göre, her sıçan için elde edilen kaspaz-3 ile kaspaz-9 boyanma şiddet ve yaygınlık dereceleri, duktül proliferasyonunun yüzdesi ile hepatik fibrozis ve portal inflamasyon skorları Tablo 3'de belirtilmiştir.

Kaspaz- 3 Şiddeti

Gruplara göre kaspaz-3 şiddeti Tablo 4'te verilmiştir. Tüm gruplar arasında kaspaz-3 şiddeti Pearson Chi Square test ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Tüm gruplar arasında kaspaz-3 şiddeti karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulundu. (p=0.006) Ancak SYL grubu ile pravastatin verilen SYL-İ grubu arasında kaspaz-3 şiddeti benzer gözlendi (p=0.40).

Tablo 3. Işık mikroskobunda görülen immünohistokimyasal ve histolojik veriler

Grup	Kaspaz-3 Şiddet	Kaspaz-3 yaygınlık	Kaspaz-9 Şiddet	Kaspaz-9 Yaygınlık	Duktül proliferasyonu %	Fibrozis	inflamasyon
SYL2	2	3	1	2	50	2	0
SYL3	3	3	1	2	30	1	0
SYL4	2	3	1	2	25	1	0
SYL6	3	3	2	3	40	3	2
SYL7	3	3	2	2	20	2	1
SYL8	1	2	1	3	20	2	0
SYL9	1	2	1	2	40	3	0
SYL-İ1	1	1	1	2	20	1	0
SYL-İ2	1	2	2	3	60	1	0
SYL-İ3	1	3	1	2	40	2	2
SYL-İ4	3	3	2	3	60	1	0
SYL-İ5	2	2	2	2	80	1	0
SYL-İ8	2	2	3	2	70	3	0
SYL-İ9	2	2	1	2	50	2	0
SYL-İ10	2	2	2	2	40	2	0
K1	1	1	0	0	0	0	0
K2	0	0	0	0	0	0	0
K3	0	0	0	0	0	0	0
K4	0	0	0	0	0	0	0
K5	1	1	0	0	0	0	0
K6	1	2	1	1	0	0	0
K7	0	0	1	1	0	0	0
SH1	0	0	0	0	0	0	0
SH2	0	0	0	0	0	0	0
SH3	0	0	0	0	0	0	0
SH4	1	1	0	0	0	1	0
SH5	1	1	0	0	0	0	0
SH6	1	1	1	1	0	0	0
SH7	0	0	1	1	0	0	0
SH8	0	0	0	0	0	1	0
SH9	1	1	0	0	0	1	0

K: Kontrol, **SH:** Sham grubu, **SYL:** Safra yolu ligasyonu yapılan grup, **SYL-İ:** Safra yolu bağlanıp ilaç (pravastatin) verilen grup.

Tablo 4. Gruplara göre kaspaz-3 şiddeti

GRUPLAR	KASPAZ- 3 ŞİDDETİ				TOPLAM	P
	0	1	2	3		
K	4	3	0	0	7	0.006*
SH	5	4	0	0	9	
SYL	0	2	2	3	7	
SYL-İ	0	3	4	1	8	
TOPLAM	9	12	6	4	31	

K: Kontrol, **SH:**Sham grubu, **SYL:** Safra yolu ligasyonu yapılan grup, **SYL-İ:** Safra yolu bağlanıp ilaç (pravastatin) verilen grup.

Pearson Chi Square test ile karşılaştırıldığında * $p < 0.05$

Kaspaz- 3 Yaygınlığı

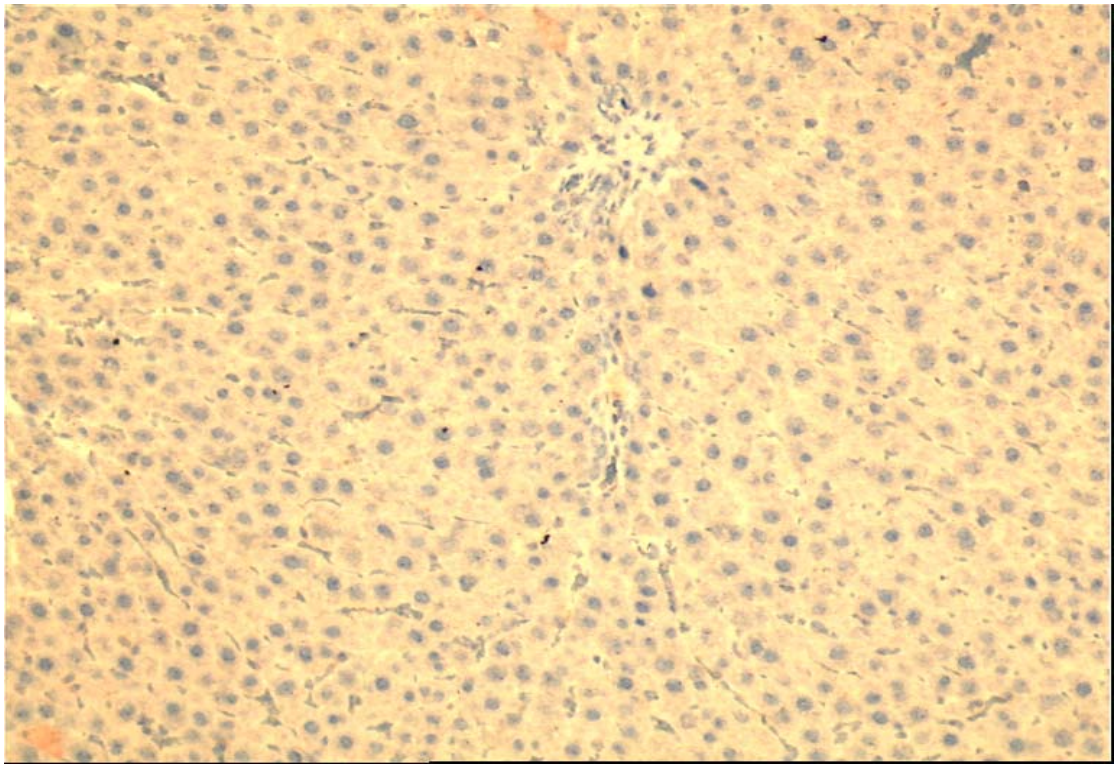
Gruplara göre kaspaz-3 yaygınlığı Tablo 5'te verilmiştir. Tüm gruplar arasında kaspaz-3 yaygınlığı Pearson Chi Square test ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Tüm gruplar arasında kaspaz-3 yaygınlığı karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulundu. ($p < 0.001$). Ancak SYL grubu ile pravastatin verilen SYL-İ grup arasında kaspaz-3 yaygınlığı benzer gözlendi ($p=0.17$).

Tablo 5. Gruplara göre kaspaz-3 yaygınlığı

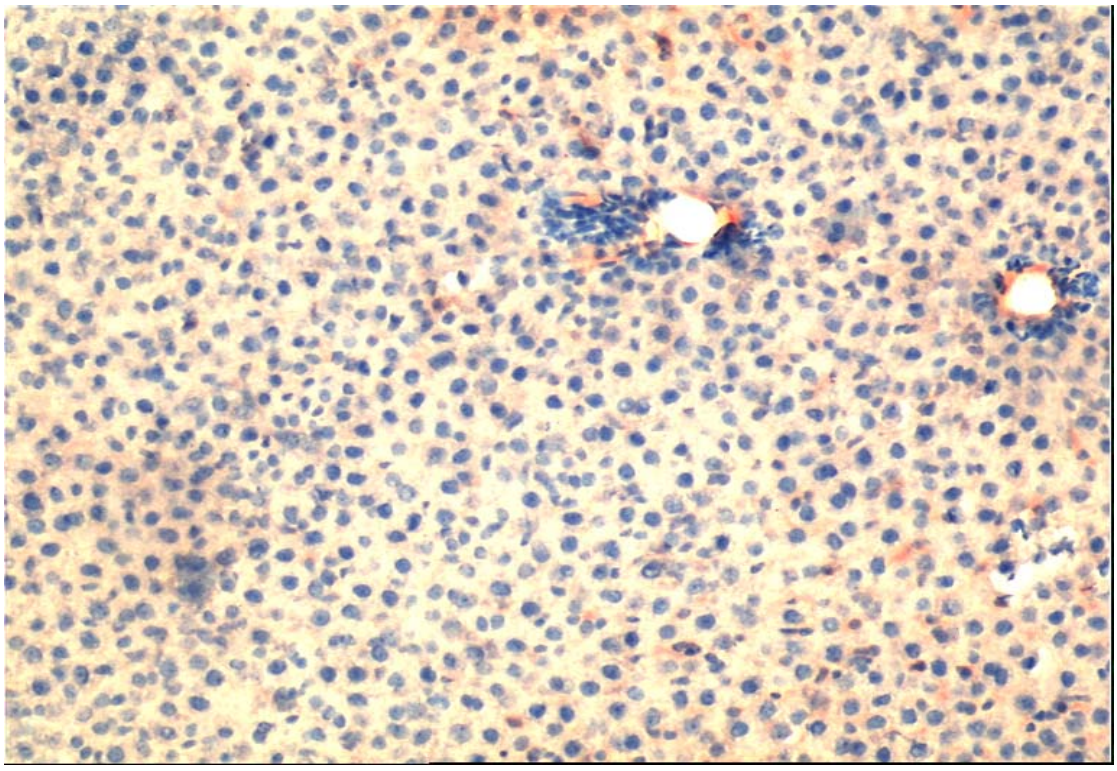
GRUPLAR	**KASPAZ-3 YAYGINLIK**				**TOPLAM**	**p**
	0	1	2	3		
K	4	2	1	0	7	0.17*
SH	5	4	0	0	9	
SYL	0	0	2	5	7	
SYL-İ	0	1	5	2	8	
TOPLAM	9	7	8	7	31	

K: Kontrol, **SH:**Sham grubu, **SYL:** Safra yolu ligasyonu yapılan grup, **SYL-İ:** Safra yolu bağlanıp ilaç (pravastatin) verilen grup.
Pearson Chi Square test ile karşılaştırıldığında * $p < 0.05$

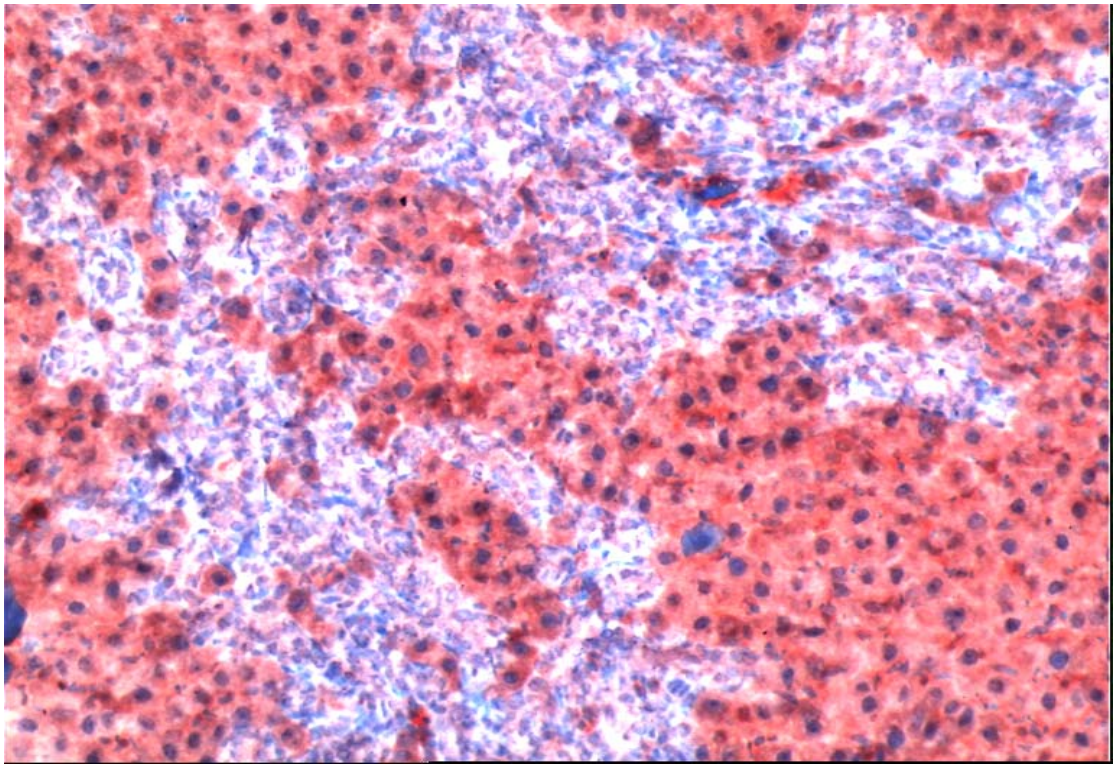
İmmünohistokimyasal olarak kaspaz-3 antikoru uygulanan kontrol grubunda (Şekil 19), sham grubunda (Şekil 20), ligasyon yapılan grupta (Şekil 21) ve ligasyon+pravastatin verilen grupta (Şekil 22) kaspaz -3 ile hepatositlerde izlenen değişiklikler gösterilmektedir.



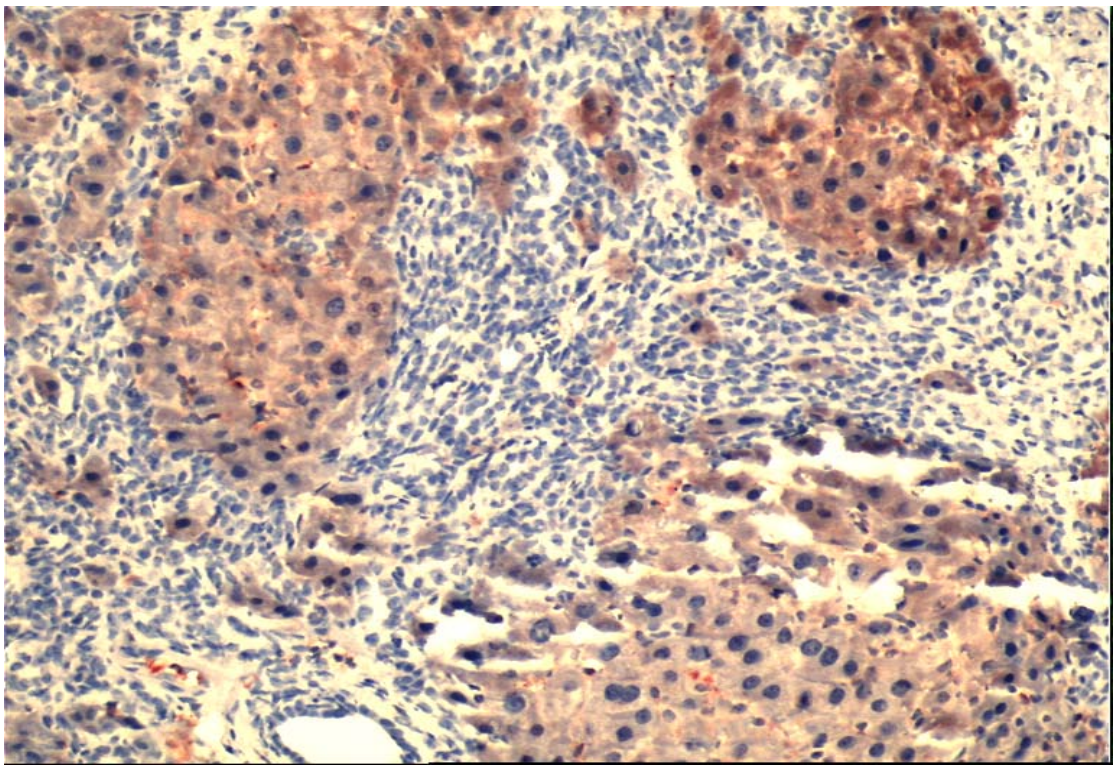
Şekil 19. Kontrol grubuna ait karaciğerde immünohistokimyasal olarak hepatositlerle reaksiyon oluşturmayan kaspaz-3 (Kaspaz-3x100)



Şekil 20. Sham grubuna ait karaciğerde immnünohistokimyasal olarak hepatositlerle reaksiyon oluşturmayan kaspaz-3 (kaspaz-3x100)



Şekil 21. Ligasyon yapılan grupta kaspaz-3 ile hepatositlerde şiddetli ve yaygın sitoplazmik reaksiyon (IHK, kaspaz-3 x100)



Şekil 22. Ligasyon+pravastatin grubunda kaspaz-3 ile hepatositlerde orta şiddette ve yaygın sitoplazmik reaksiyon (IHK, kaspaz-3 x100)

Kaspaz-9 Şiddeti

Gruplara göre kaspaz-9 şiddeti Tablo 6'da verilmiştir. Tüm gruplar arasında kaspaz-9 şiddeti Pearson Chi Square test ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Tüm gruplar arasında kaspaz-9 şiddeti karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulundu (p=0.004). Ancak SYL grubu ile pravastatin verilen SYL-İ grup arasında Kaspaz-9 şiddeti benzer gözlendi (p=0.34).

Tablo 6. Gruplara göre kaspaz-9 şiddeti

GRUPLAR	KASPAZ-9 ŞİDDETİ				TOPLAM	p
	0	1	2	3		
K	5	2	0	0	7	0.34*
SH	7	2	0	0	9	
SYL	0	5	2	0	7	
SYL-İ	0	3	4	1	8	
TOPLAM	12	12	6	1	31	

K: Kontrol, **SH:**Sham grubu, **SYL:** Safra yolu ligasyonu yapılan grup, **SYL-İ:** Safra yolu bağlanıp ilaç (pravastatin) verilen grup.
Pearson Chi Square test ile karşılaştırıldığında * p <0.05

Kaspaz- 9 Yaygınlığı

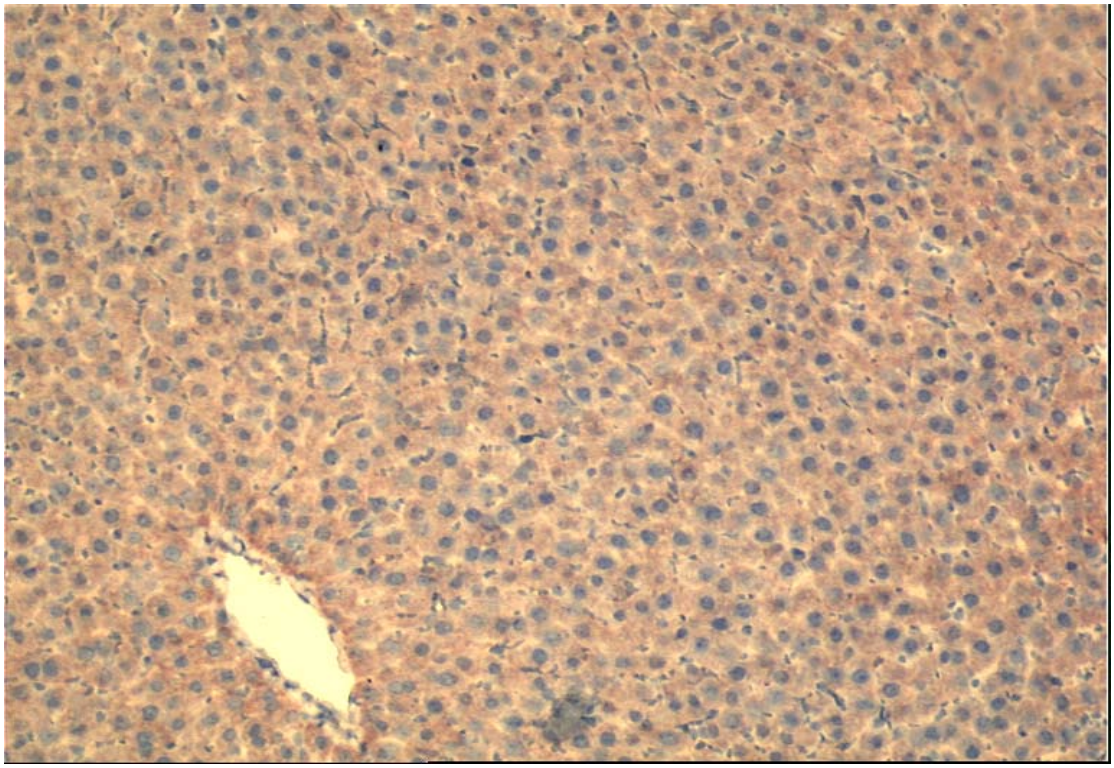
Gruplara göre kaspaz-9 yaygınlığı Tablo 7'de verilmiştir. Tüm gruplar arasında kaspaz-9 yaygınlığı Pearson Chi Square test ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Tüm gruplar arasında kaspaz-9 yaygınlığı karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulundu (p<0.001). Ancak SYL grubu ile pravastatin verilen SYL-İ grup arasında kaspaz-9 yaygınlığı benzer gözlendi (p=0,87).

Tablo 7. Gruplara göre kaspaz-9 yaygınlığı

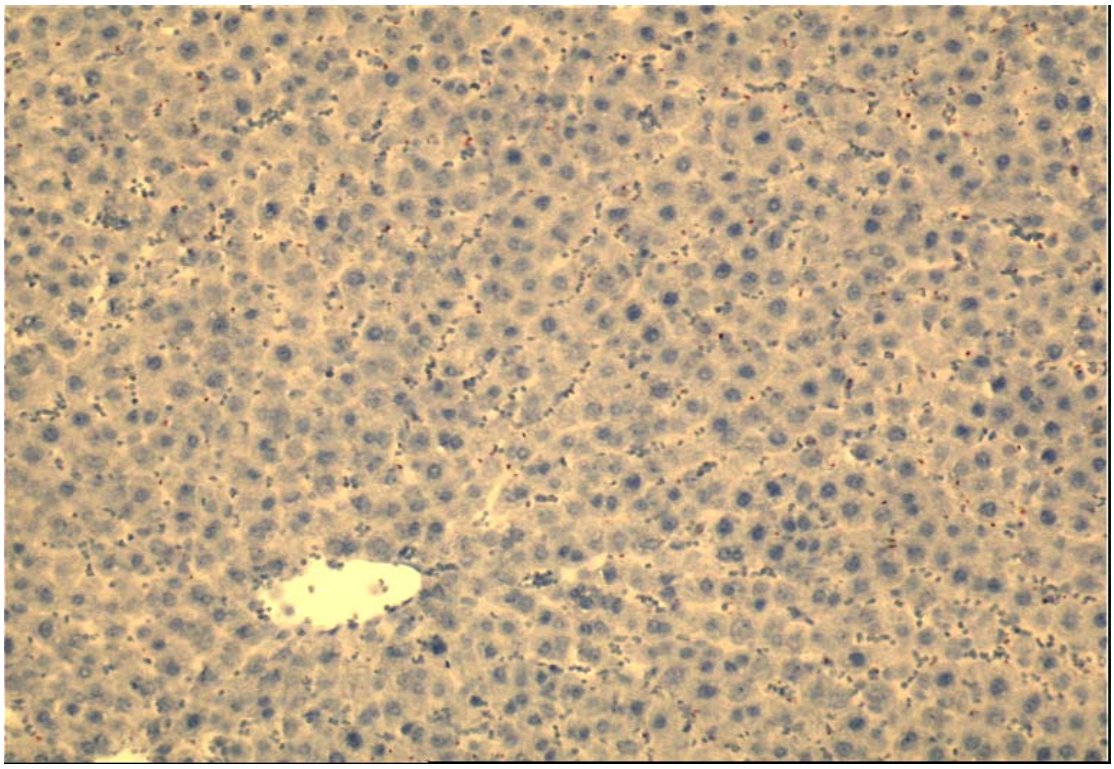
GRUPLAR	KASPAZ-9 YAYGINLIK				TOPLAM	p
	0	1	2	3		
K	5	2	0	0	7	0,87*
SH	7	2	0	0	9	
SYL	0	0	5	2	7	
SYL-İ	0	0	6	2	8	
TOPLAM	12	4	11	4	31	

K: Kontrol, **SH:**Sham grubu, **SYL:** Safra yolu ligasyonu yapılan grup, **SYL-İ:** Safra yolu bağlanıp ilaç (pravastatin) verilen grup.
Pearson Chi Square test ile karşılaştırıldığında * p <0.05

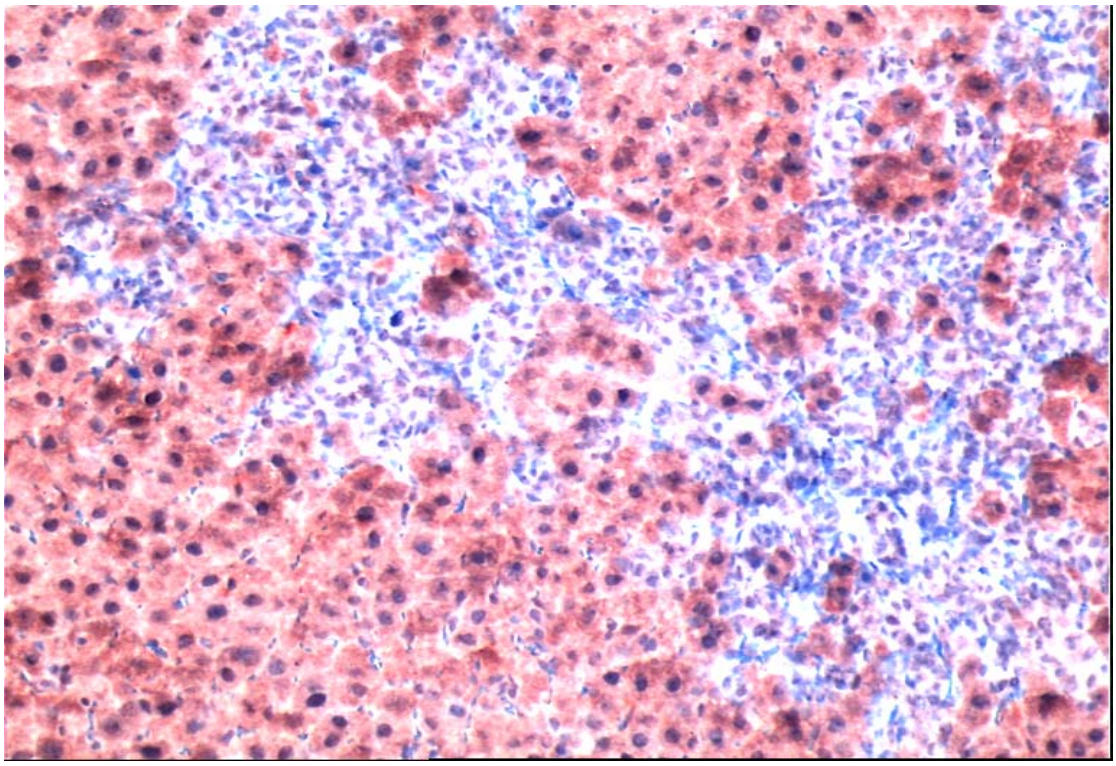
İmmünohistokimyasal olarak kaspaz-9 antikoru uygulanan kontrol grubunda ve sham grubunda hepatositlerle reaksiyonun olmadığı (Şekil 23 ve 24), ligasyon yapılan grupta orta şiddette nükleer ve sitoplazmik reaksiyon olduğu (Şekil 25) ve ligasyon+pravastatin verilen grupta ise hafif dereceli yaygın sitoplazmik ve nükleer reaksiyon olduğu (Şekil 26) görülmektedir.



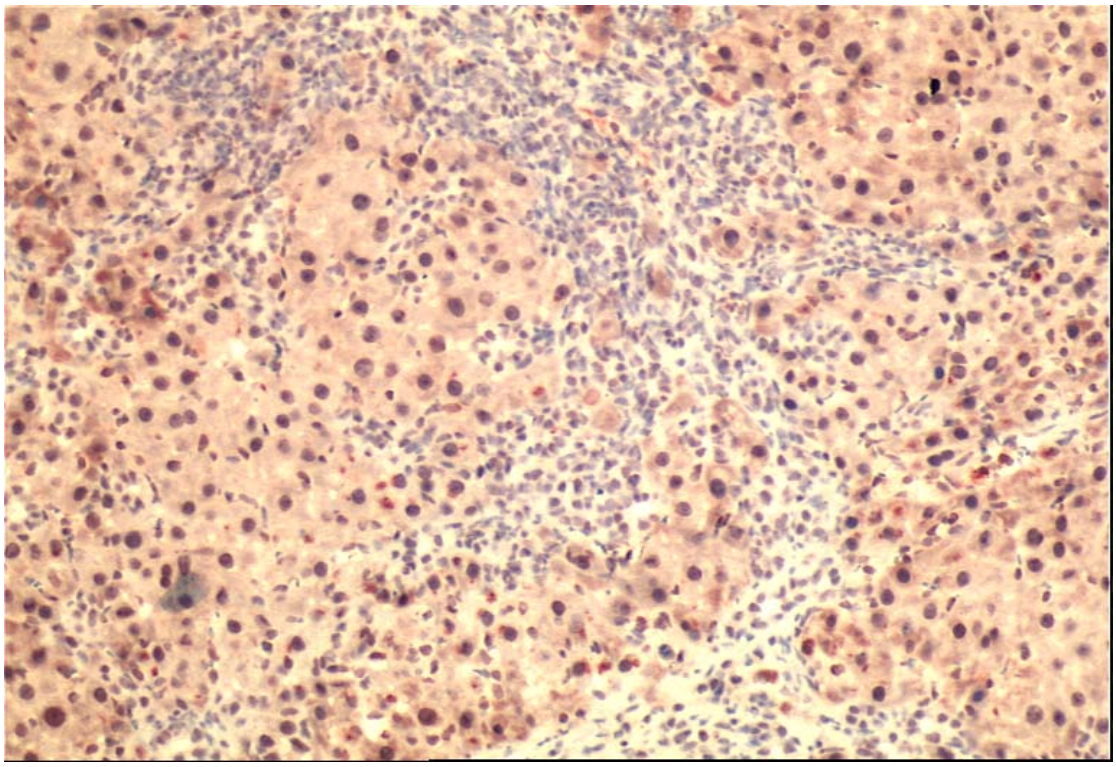
Şekil 23. Kontrol grubuna ait karaciğerde immünohistokimyasal olarak hepatositlerle reaksiyon oluşturmayan kaspaz-9 (kaspaz-9x100)



Şekil 24. Sham grubuna ait karaciğerde immünohistokimyasal olarak hepatositlerle reaksiyon oluşturmayan kaspaz-9 (kaspaz-9x100)



Şekil 25. Ligasyon yapılan grupta kaspaz-9 ile hepatositlerde orta şiddette, yaygın sitoplazmik ve nükleer reaksiyon (kaspaz9 x100)



Şekil 26. Ligasyon+pravastatin grubunda kaspaz-9 ile hepatositlerde hafif dereceli, yaygın sitoplazmik ve nükleer reaksiyon (kaspaz-9x100)

FİBROZİS

Gruplara göre fibrozis skorları Tablo 8'de verilmiştir. Tüm gruplar arasında fibrozis skorları Pearson Chi Square test ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Fibrozis değerlerine göre gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı fark saptandı (p<0.0004)

Tablo 8. Gruplara göre fibrozis skorları

GRUPLAR	FİBROZİS					TOPLAM	p
	0	1	2	3	4		
K	7	0	0	0	0	7	0.0004*
SH	6	3	0	0	0	9	
SYL	0	1	3	2	1	7	
SYL-İ	0	3	3	1	1	8	
TOPLAM	13	7	6	3	2	31	

K: Kontrol, **SH:**Sham grubu, **SYL:** Safra yolu ligasyonu yapılan grup, **SYL-İ:** Safra yolu bağlanıp ilaç (pravastatin) verilen grup.
Pearson Chi Square test ile karşılaştırıldığında * p <0.05

Ancak SYL grubu ile pravastatin verilen SYL-İ grup arasında fibrozis benzer gözlendi (p=0.73).

Tablo 9. Gruplara göre fibrozis skorları

GRUPLAR	FİBROZİS				TOPLAM	p
	1	2	3	4		
SYL	1	3	2	1	7	0.73*
SYL-İ	3	3	1	1	8	
TOPLAM	4	6	3	2	15	

K: Kontrol, **SH:**Sham grubu, **SYL:** Safra yolu ligasyonu yapılan grup, **SYL-İ:** Safra yolu bağlanıp ilaç (pravastatin) verilen grup.
Pearson Chi Square test ile karşılaştırıldığında * p <0.05

Duktül Proliferasyonu

Kontrol ve SH gruplarında herhangi bir duktul proliferasyonu saptanmadı. Duktül proliferasyonu SYL grubunda %32±11 ve SYL-İ grubunda %52.5±19 saptandı. Aradaki fark anlamlı idi (p=0.029).

İNFLAMASYON

İnflamasyon SYL grubunda 2 ratta (portal alanlarda hafif ve orta düzeyde) pravastatin verilen SYL-İ grubunda 1 ratta (portal alanlarda hafif düzeyde) izlendi. Az sayıda ratta inflamasyon görülmesi nedeni ile istatistiksel karşılaştırma yapılmadı.

BİYOKİMYASAL BULGULAR

Tüm sıçanlarda biyokimyasal incelemelerden karaciğer fonksiyon testleri olan AST, ALT, ALP, GGT ile total ve direkt bilirübin düzeyi çalışıldı. Tablo 10'da her bir rat için ölçülen serum değerleri verilmiştir.

Tablo 10. Biyokimyasal bulgular

	AST	ALT	ALP	GGT	TBİL	DBİL
K1	122	44	223	1	0.2	0.1
K2	129	55	244	1	0.2	0.1
K3	118	49	166	1	0.2	0.1
K4	109	41	123	1	0.2	0.1
K5	144	59	175	1	0.2	0.1
K6	143	63	181	1	0.2	0.1
K7	110	50	127	1	0.2	0.1
SH1	140	73	226	1	0.2	0.1
SH2	136	56	256	1	0.2	0.1
SH3	150	67	187	2	0.2	0.1
SH4	213	75	113	1	0.2	0.1
SH5	134	72	164	1	0.2	0.1
SH6	110	60	205	1	0.2	0.1
SH7	122	56	115	1	0.2	0.1
SH8	191	81	244	1	0.2	0.1
SH9	105	40	154	1	0.2	0.1
SYL-2	300	68	262	38	9.4	7.4
SYL-3	407	56	225	46	7	5.5
SYL-4	520	92	239	19	8.7	6.8
SYL-6	481	103	344	32	9	6.9
SYL-7	246	61	293	23	0.2	0.1
SYL-8	524	85	309	23	8.5	6.6
SYL-9	248	49	177	30	9.9	7.7
SYL-İ1	704	60	115	42	11.6	9.7
SYL-İ2	254	38	109	39	11.7	10
SYL-İ3	525	87	224	27	3.7	3.3
SYL-İ4	366	71	178	74	11.1	9.5
SYL-İ5	462	74	263	39	9.8	7.6
SYL-İ8	455	97	290	34	8.8	6.8
SYL-İ9	435	72	229	24	7.5	5.7
SYL-İ10	333	59	222	24	11.6	8.9

K=Kontrol, **SH:**Sham grubu, **SYL:**Safra yolu ligasyonu yapılan grup, **SYL-İ:**Safra yolu bağlanıp ilaç (pravastatin) verilen grup, **AST:**Aspartat aminotransferaz, **ALT:**Alanin amino transferaz, **ALP:**Alkalen fosfataz **GGT:** Gama glutamil transpeptidaz, **TBİL:**Total bilirübin, **DBİL:**Direkt bilirübin.

ASPARTAT AMİNOTRANSFERAZ

Tüm gruplar arasında AST değeri Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda 7 ratta ortalama serum AST değeri 125±14 IU/ml (109-144) bulundu. SH grubunda 9 ratta ortalama serum AST değeri 144±36 IU/ml (105-213) bulundu. SYL grubunda 7 ratta ortalama serum AST değeri 389±124 IU/ml (246-524) bulundu. SYL-İ grubunda 8 ratta ortalama serum AST değeri 441±136 IU/ml (254- 704) bulundu. Serum AST değerlerine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$) (Tablo 11).

Tablo 11. Gruplara göre ortalama serum aspartat aminotransferaz değerleri

GRUPLAR	Grup Sayısı	Ortalama	SS	Minimum	Maksimum	p
K	7	125	14	109	144	0,001*
SH	9	145	36	105	213	
SYL	7	389	124	246	524	
SYL-İ	8	442	135	254	704	
Toplam	31	272	16	105	704	

K: Kontrol, **SH:**Sham grubu, **SYL:** Safra yolu ligasyonu yapılan grup, **SYL-İ:** Safra yolu bağlanıp ilaç (pravastatin) verilen grup, **SS:**Standart sapma
Mann Whitney U testi ile karşılaştırma, *($p<0.05$)

Kontrol grubu ile SH grubu ortalama serum AST değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark oluşmadı ($p=0.19$).

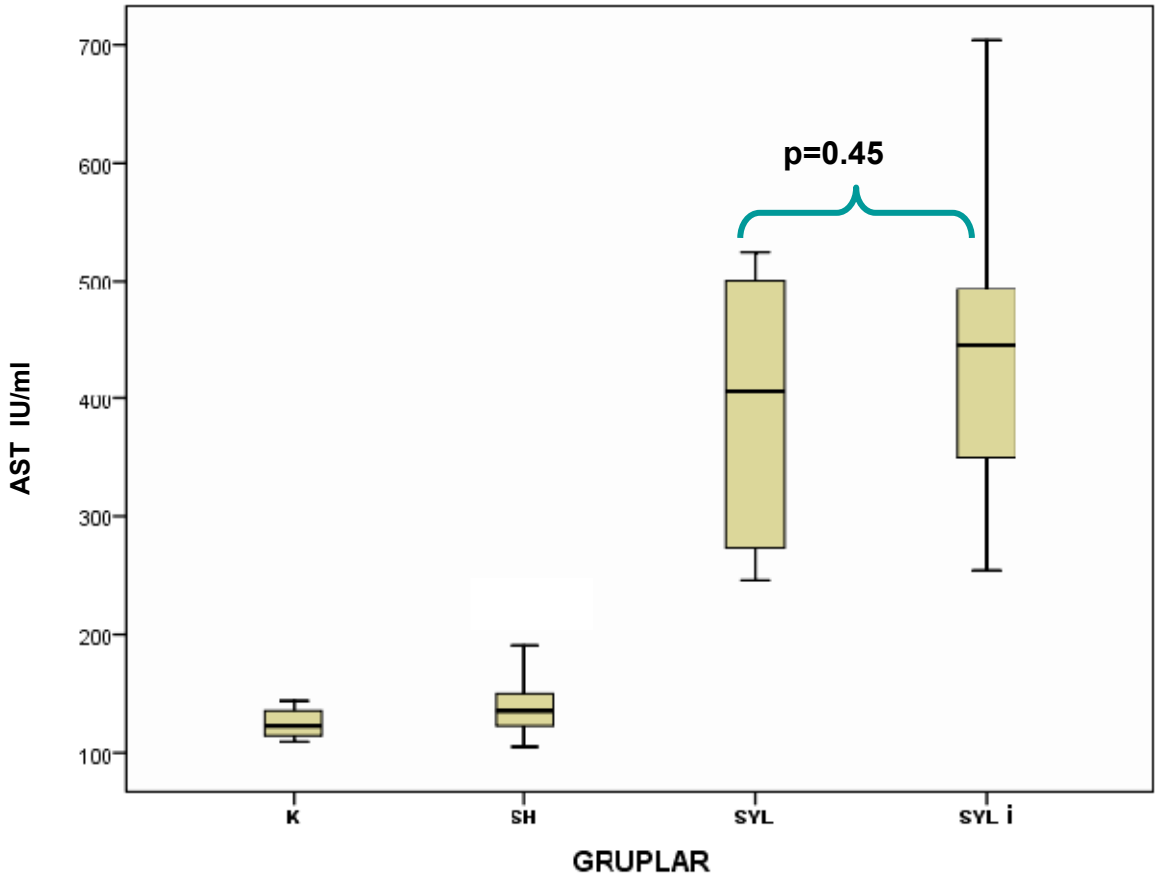
Kontrol grubu ile SYL grubu ortalama serum AST değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$).

Kontrol grubu ile SYL-İ grubu ortalama serum AST değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$).

Sham grubu ile SYL grubu ortalama serum AST değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$).

Sham grubu ile SYL-İ grubu ortalama serum AST değerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$).

Safra yolu ligasyonu grubu pravastatin verilen SYL-İ grubu ile ortalama serum AST değerine göre Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. SYL grubu pravastatin verilen SYL-İ grubu ile ortalama serum AST değerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.45) (Şekil 24).



K:Kontrol **SH:**Sham grubu **SYL:** Safra yolu ligasyonu yapılan grup **SYL-İ:** Safra yolu ligasyonu yapılıp pravastatin verilen grup **AST**: Aspartat amino transferaz.
Mann Whitney U testi ile karşılaştırma, *(p<0.05)

Şekil 24. Safra yolu ligasyonu yapılan SYL grup ile pravastatin verilen SYL-İ grup arasında ortalama serum aspartat aminotransferaz düzeyleri arasında fark saptanmadı

ALANİN AMİNOTRANSFERAZ

Tüm gruplar arasında ALT değeri Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda 7 ratta ortalama serum ALT değeri 52±8 IU/ml (51-63) bulundu. SH grubunda 9 ratta ortalama serum ALT değeri 64±13 IU/ml (40- 81) bulundu. SYL grubunda 7 ratta ortalama serum ALT değeri 73±20 IU/ml (49-103) bulundu SYL-İ grubunda 8 ratta ortalama serum ALT değeri 70±18 IU/ml (38-97) bulundu. Ortalama serum ALT değerlerine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olmaya eğilimli bir fark gözlendi (p=0.06) (Tablo 12).

Tablo 12. Gruplara göre serum ortalama alanin aminotransferaz düzeyleri

GRUPLAR	Grup Sayısı	Ortalama	SS	Minimum	Maksimum	p
K	7	51	8	41	63	
SH	9	64	13	40	81	
SYL	7	73	20	49	103	0,06*
SYL-İ	8	70	18	38	97	
Toplam	31	65	17	38	103	

K : Kontrol **SH :** Sham grubu **SYL :** Safra yolu ligasyonu yapılan grup **SYL-İ:** Safra yolu bağlanıp ilaç (pravastatin) verilen grup, **SS:** Standart sapma.
Mann Whitney U testi ile karşılaştırma, *(p<0.05)

Kontrol grubu ile SH grubu ortalama serum ALT değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p=0.04).

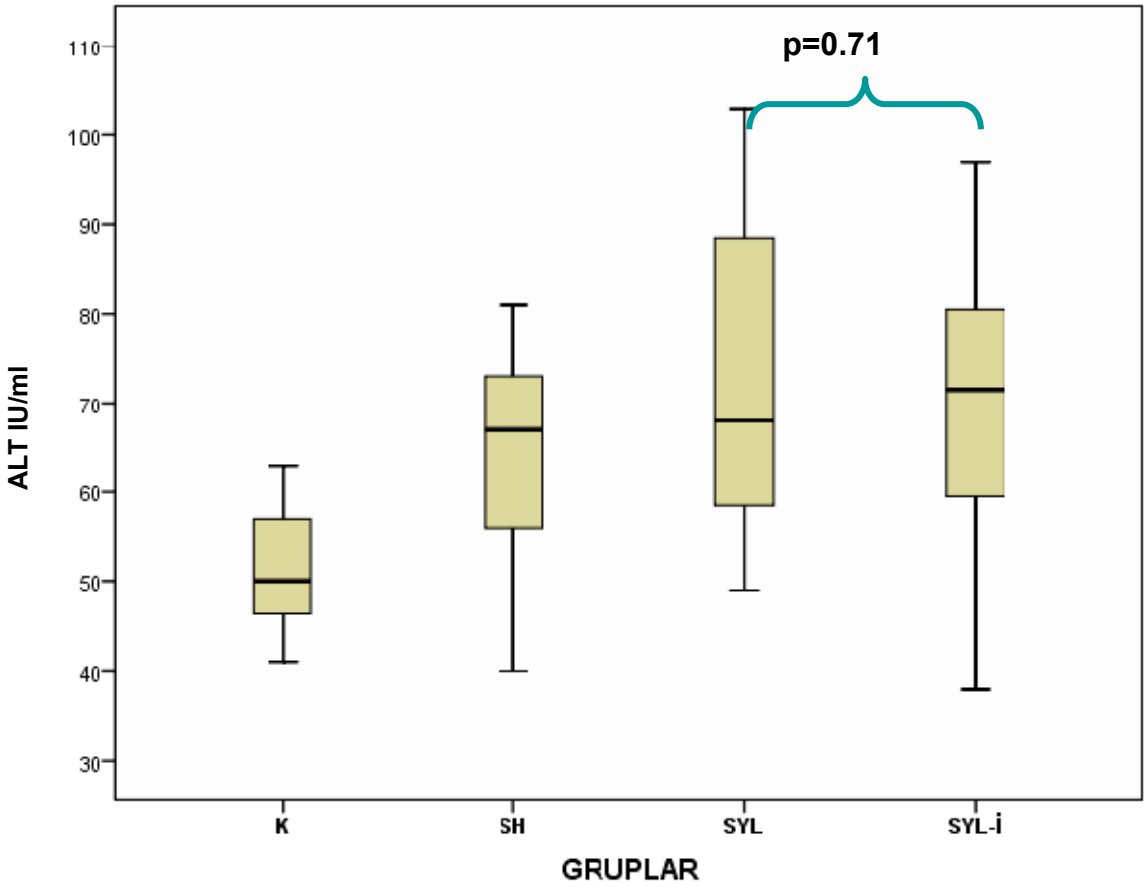
Kontrol grubu SYL grubu ile ortalama serum ALT değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p=0.02).

Kontrol grubu SYL-İ grubu ile ortalama serum ALT değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p=0.03).

Sham grubu SYL grubu ile ortalama serum ALT değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.29).

Sham grubu SYL-İ grubu ile ortalama serum ALT değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.49).

Safra yolu ligasyonu grubu pravastatin verilen SYL-İ grubu ile ortalama serum ALT değerine göre Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Safra yolu ligasyonu grubu SYL-İ grubu ile ortalama serum ALT değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.71) (Şekil 25).



ALT : Alanin amino transferaz **K :** Kontrol **SH :** Sham grubu **SYL :** Safra yolu ligasyonu yapılan grup **SYL-İ:** Safra yolu bağlanıp ilaç (pravastatin) verilen grup, **SS:** Standart sapma.
Mann Whitney U testi ile karşılaştırma, *(p<0.05)

Şekil 25. Safra yolu ligasyonu yapılan SYL grup ile pravastatin verilen SYL-İ grup arasında ortalama serum alanin aminotransferaz düzeyleri arasında fark saptanmadı

ALKALEN FOSFATAZ

Tüm gruplar arasında ALP değeri Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda 7 ratta ortalama serum ALP değeri 177±45 IU/ml (123-244) bulundu. SH grubunda 9 ratta ortalama serum ALP değeri 185±53 IU/ml (113-256) bulundu. SYL grubunda 7 ratta ortalama ALP değeri 264±56 IU/ml (177-344) bulundu. SYL-

İ grubunda 8 ratta ortalama serum ALP değeri 204±65 IU/ml (109-290) bulundu. Ortalama serum ALP değerlerine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.02) (Tablo 13).

Tablo 13. Gruplara göre ortalama serum alkalen fosfataz düzeyleri

GRUPLAR	Grup Sayısı	Ortalama	SS	Minimum	Maksimum	p
K	7	177	45	123	244	0.02*
SH	9	185	53	113	256	
SYL	7	264	56	177	344	
SYL-İ	8	204	65	109	290	
Toplam	31	206	62	109	344	

K: Kontrol, **SH:** Sham grubu, **SYL:** Safra yolu ligasyonu yapılan grup, **SYL-İ:** Safra yolu bağlanıp ilaç (pravastatin) verilen grup, **SS:** Standart sapma.
Mann Whitney U testi ile karşılaştırma, *($p<0.05$)

Kontrol grubu ile SH grubu ortalama serum ALP değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark oluşmadı (p=0.75).

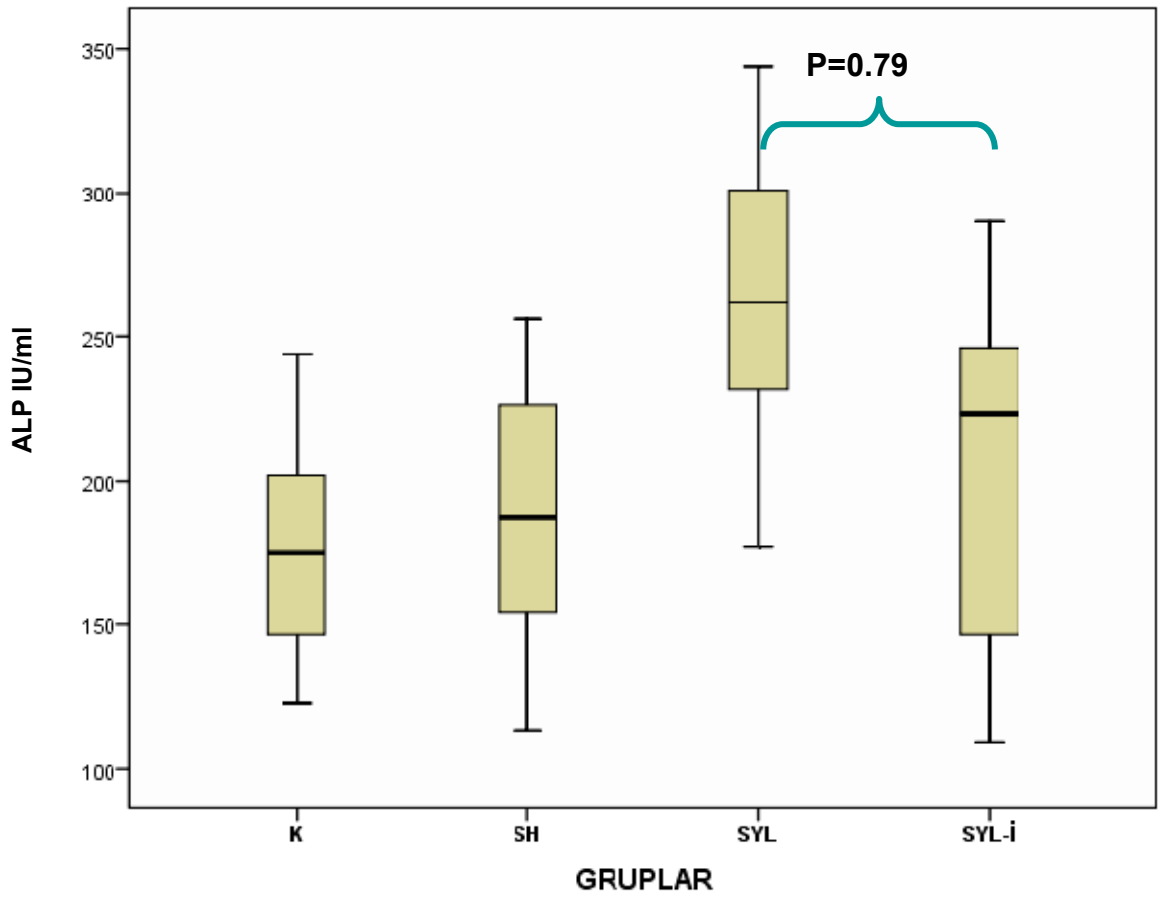
Kontrol grubu SYL grubu ile ortalama serum ALP değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p=0.008).

Kontrol grubu SYL-İ grubu ile ortalama serum ALP değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.38).

Sham grubu SYL grubu ile ortalama serum ALP değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.12).

Sham grubu SYL-İ grubu ile ortalama serum ALP değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.51).

Safra yolu ligasyonu grubu pravastatin verilen SYL-İ grubu ile serum ortalama ALP değerine göre Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Safra yolu ligasyonu grubu SYL-İ grubu ile serum ortalama ALP değerlerine göre karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.79) (Şekil 26).



ALP: Alkalen fosfataz, **K:** Kontrol, **SH:** Sham grubu, **SYL:** Safra yolu ligasyonu yapılan grup, **SYL-İ:** Safra yolu bağlanıp ilaç (pravastatin) verilen grup, **SS:** Standart sapma.
Mann Whitney U testi ile karşılaştırma, *($p<0.05$)

Şekil 26. Safra yolu ligasyonu yapılan SYL grup ile pravastatin verilen SYL-İ grup arasında ortalama serum Alkalen fosfataz düzeyleri arasında fark saptanmadı

GAMA GLUTAMİL TRANSPEPTİDAZ

Tüm gruplar arasında GGT değeri Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda 7 ratta serum ortalama GGT değeri 1IU/ml (1-1) bulundu. SH grubunda 9 ratta GGT değeri 1±0.3 IU/ml (1-2) bulundu. SYL grubunda 7 ratta ortalama GGT değeri 30±9.5 IU/ml (19- 46) bulundu. SYLİ grubunda 8 ratta GGT değeri 38 ±16 IU/ml (24-74) bulundu. Ortalama serum GGT değerlerine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$) (Tablo 14).

Tablo 14. Gama glutamil transpeptidaz düzeylerine göre grupların istatistiksel analizi

GRUPLAR	Grup Sayısı	Ortalama	SS	Minimum	Maksimum	p
K	7	1	0	1	1	
SH	9	1	0	1	2	
SYL	7	30	9,5	19	46	<0.001*
SYL-İ	8	38	16	24	74	
Toplam	31	17	19	1	74	

K:Kontrol, **SH:** Sham grubu, **SYL:** Safra yolu ligasyonu yapılan grup, **SYL-İ:**Safra yolu bağlanıp ilaç (pravastatin) verilen grup, **SS:**Standart sapma.
Mann Whitney U testi ile karşılaştırma, *(p<0.05)

Kontrol grubu ile SH grubu serum ortalama GGT değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark oluşmadı (p=0.39).

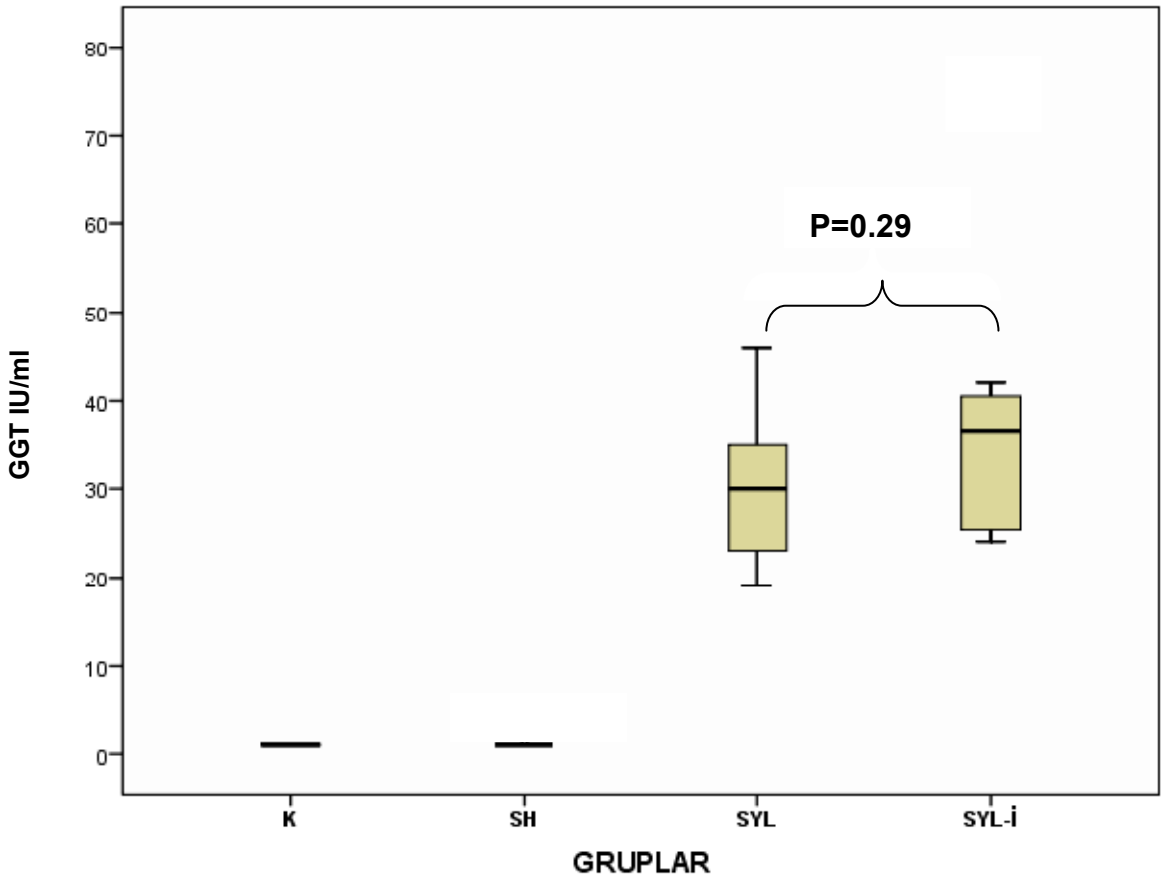
Kontrol grubu SYL grubu ile serum ortalama GGT değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p<0.001).

Kontrol grubu SYL-İ grubu ile serum ortalama GGT değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p<0.001).

Sham grubu SYL grubu ile serum ortalama GGT değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p<0.001).

Sham grubu SYL-İ grubu ile serum ortalama GGT değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p<0.001).

Safra yolu ligasyonu grubu pravastatin verilen SYL-İ grubu ile ortalama serum GGT değerine göre Man Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Safra yolu ligasyonu grubu SYL-İ grubu ile ortalama serum GGT değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı(p=0.29) (Şekil 27).



ALP: Alkalen fosfataz, **K:** Kontrol, **SH:** Sham grubu, **SYL:** Safra yolu ligasyonu yapılan grup, **SYL-İ:** Safra yolu bağlanıp ilaç (pravastatin) verilen grup, **SS:** Standart sapma.
Mann Whitney U testi ile karşılaştırma, *($p<0.05$)

Şekil 27. Safra yolu ligasyonu yapılan SYL grup ile pravastatin verilen SYL-İ grup arasında ortalama serum gama glutamil transpeptidaz düzeyleri arasında fark saptanmadı

TOTAL BİLİRÜBİN

Tüm gruplar arasında TBİL değeri Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda 7 ratta ortalama serum TBİL değeri 0.2 mg/dl (0.1-0.2) bulundu. SH grubunda 9 rattaortalama TBİL değeri 0.2 mg/dl (0.2-0.2) bulundu. SYL grubunda 7 ratta TBİL değeri 7.5±3.4 mg/dl (0.2-9.9) bulundu. SYL-İ grubunda 8 ratta ortalama serum TBİL değeri 9.5±2.8 mg/dl (3.7-11.7) bulundu. TBİL değerlerine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$) (Tablo 15).

Tablo 15. Total bilirübin düzeylerine göre grupların istatistiksel analizi

GRUPLAR	Grup Sayısı	Ortalama	SS	Minimum	Maksimum	p
K	7	0.2	0	0.2	0.2	
SH	9	0.2	0	0.2	0.2	
SYL	7	7.5	3.4	0.2	9.9	<0.001
SYL-İ	8	9.5	2.8	3.7	11.7	
Toplam	31	4.2	4.8	0.2	11.7	

K: Kontrol, **SH:** Sham grubu, **SYL:**Safra yolu ligasyonu yapılan grup, **SYL-İ:** Safra yolu bağlanıp ilaç (pravastatin) verilen grup, **SS:**Standart sapma.
Mann Whitney U testi ile karşılaştırma, *($p<0.05$)

Kontrol grubu ile SH grubu ortalama serum TBİL değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0.31$).

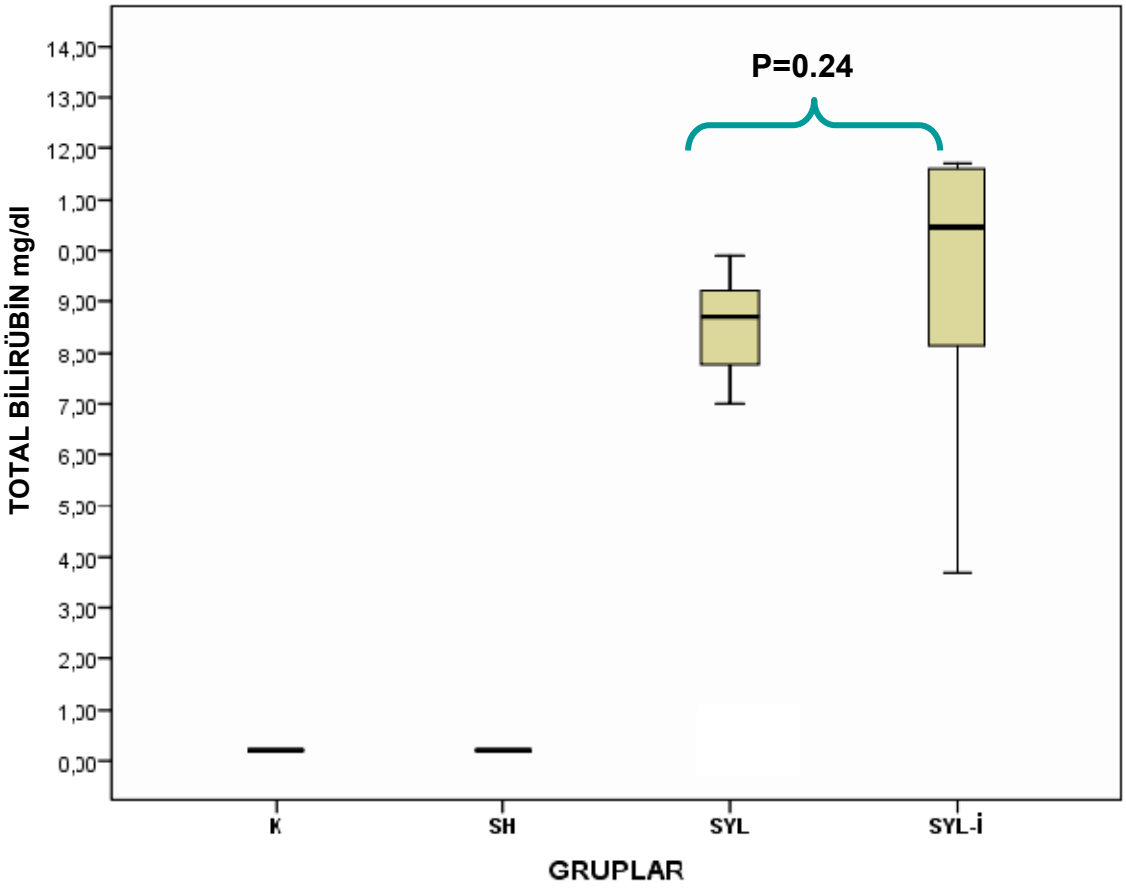
Kontrol grubu SYL grubu ile ortalama serum TBİL değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$).

Kontrol grubu SYL-İ grubu ile ortalama serum TBİL değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$).

Sham grubu SYL grubu ile ortalama serum TBİL değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$).

Sham grubu SYL-İ grubu ile ortalama serum TBİL değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$).

Safra yolu ligasyonu grubu pravastatin verilen SYL-İ grubu ile ortalama serum TBİL değerlerine göre Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Safra yolu ligasyonu grubu SYL-İ grubu ile ortalama serum TBİL değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0.24$) (Şekil 28).



K: Kontrol, **SH:** Sham grubu, **SYL:**Safra yolu ligasyonu yapılan grup, **SYL-İ:** Safra yolu bağlanıp Mann Whitney U testi ile karşılaştırma, *(p<0.05)

Şekil 28. Safra yolu ligasyonu yapılan SYL grup ile pravastatin verilen SYL-İ grup arasında total bilüribin düzeyleri arasında fark saptanmadı

DİREKT BİLİRÜBİN

Tüm gruplar arasında DBİL değeri Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda 7 ratta serum ortalama DBİL değeri 0.1 mg/dl (0.1-0.1) bulundu. SH grubunda 9 ratta serum ortalama DBİL değeri 0.1 mg/dl (0.1-0.1) bulundu. SYL grubunda 7 ratta ortalama serum DBİL değeri 5.9±2.6 mg/dl (0.1-7.7) bulundu. SYL-İ grubunda 8 ratta ortalama serum DBİL değeri 7.7±2.3 mg/dl (3.3-10)bulundu. Ortalama serum DBİL değerlerine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p<0.001) (Tablo 16).

Tablo 16. Gruplara göre ortalama serum direkt bilirübin düzeyleri

GRUPLAR	Grup Sayısı	Ortalama	SS	Minimum	Maksimum	p
K	7	0.1	0.1	0.1	0.1	
SH	9	0.1	0.1	0.1	0.1	
SYL	7	5.9	2.6	0.1	7.7	<0.001
SYL-İ	8	7.7	2.3	3.3	10	
Toplam	31	3.4	3	0.1	10	

K:Kontrol, **SH:** Sham grubu, **SYL:**Safra yolu ligasyonu yapılan grup, **SYL-İ:**Safra yolu bağlanıp ilaç (pravastatin) verilen grup, **SS:**Standart sapma, **DBİL:**Direkt bilirübin.
Mann Whitney U testi ile karşılaştırma, *($p<0.05$)

Kontrol grubu ile SH grubu ortalama serum DBİL değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark oluşmadı ($p=0.31$).

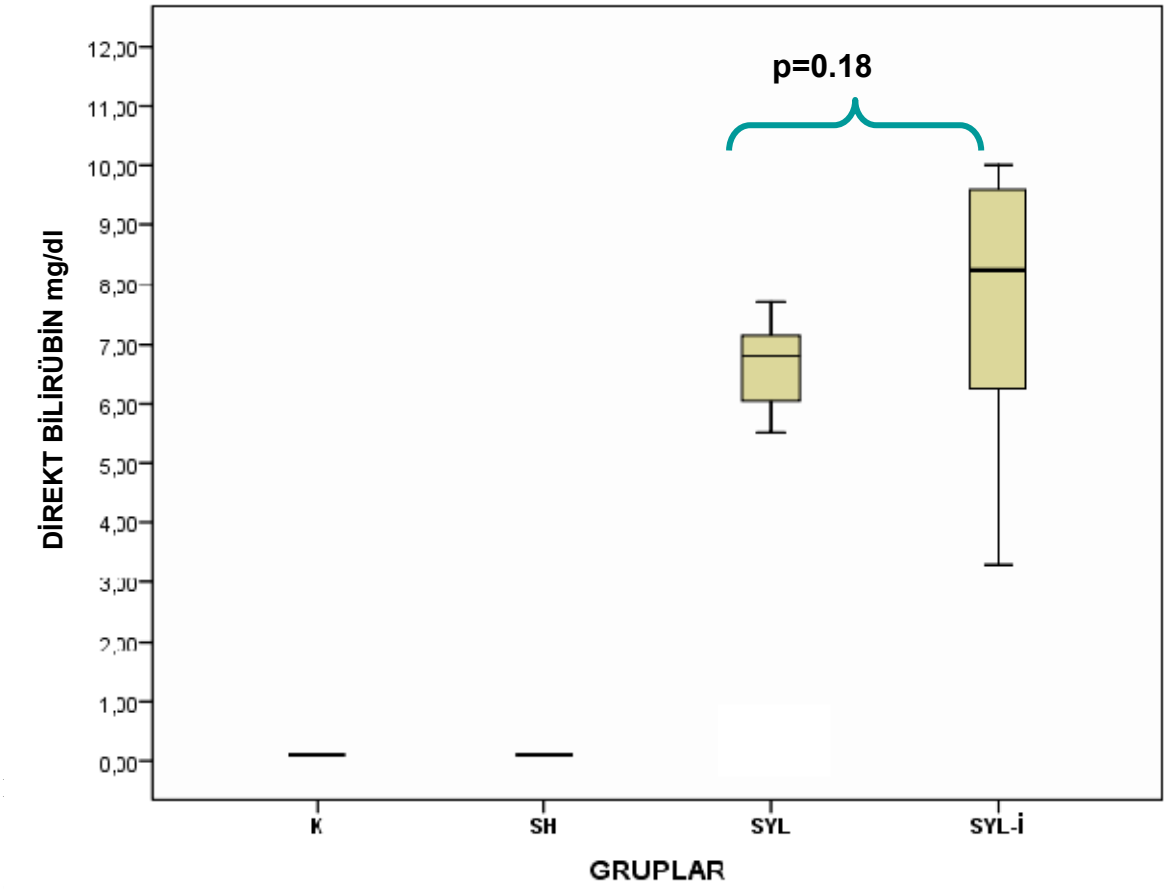
Kontrol grubu SYL grubu ile ortalama serum DBİL değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$).

Kontrol grubu SYL-İ grubu ile ortalama serum DBİL değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$).

Sham grubu SYL grubu ile ortalama serum DBİL değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$).

Sham grubu SYL-İ grubu ile ortalama serum DBİL değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$).

Safra yolu ligasyonu grubu pravastatin verilen SYL-İ grubu ile ortalama serum DBİL değerlerine göre Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Safra yolu ligasyonu grubu SYL-İ grubu ile ortalama serum DBİL değerlerine göre karşılaştırıldığında arada istatiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0.18$) (Şekil 29).



K: Kontrol, **SH:** Sham grubu, **SYL:**Safra yolu ligasyonu yapılan grup, **SYL-İ:** Safra yolu bağlanıp ilaç (pravastatin) verilen grup, **SS:**Standart sapma, **TBİL:**Total bilirübin.
Mann Whitney U testi ile karşılaştırma, *($p<0.05$)

Şekil 29. Safra yolu ligasyonu yapılan SYL grup ile pravastatin verilen SYL-İ grup arasında ortalama serum direkt bilirübin düzeyleri arasında fark saptanmadı

TARTIŞMA

Hepatik fibrozisin, karaciğer parankim dokusunun geri dönüşümsüz olarak yıkılması ve kollajenden zengin dokunun hakimiyeti nedeniyle ortaya çıktığı biliniyor (160,162). Fibrozisin oluşmasında ise HSH'ler anahtar rol oynamaktadır. Bu hücrelerin aktifleşmesiyle ECM ve kollajen tip I ve III artışı olmaktadır. Karaciğer fibrozisinin progresyonunun yavaşlatılması ile geri döndürülebilen dönemde tedavi edilebilirse başarı oranı yüksektir ve siroza gidiş önlenebilir. Karaciğer fibrozisinin tedavisi için henüz bir ilaç onaylanmamıştır.

Sıçanlarda safra yolu bağlama modeli insanlarda ekstrahepatik safra yolu tıkanmasına sekonder gelişen hepatik fibroz ve sirozun histopatolojik ve klinik yönlerini en iyi taklit eden deneysel modeldir. Bu model ortalama 4 hafta sonunda sirozla sonuçlanarak araştırmacılara hepatik fibrozisin tüm gelişimsel evrelerini detaylı çalışma imkanı verir. Ayrıca safra yolu ligasyonu modelinde diğer siroz modellerine göre komplikasyonlar ve mortalite daha düşük görünmektedir. Diğer *in vivo* yöntemlerden CCL_4'in intraperitoneal yol ile verilmesiyle oluşturulan bu hepatik fibrozis modelininin farelerde 40-100% mortalite ile sonuçlandığı bilinmektedir(163).

Statinlerin pek çok değişik organda fibrojenik hücrelerin aktivasyon ve proliferasyonunu, ekstraselüler matriks üretimini engelleyerek ve fibrojenik hücrelerin apopitozisini indükleyerek etkili birer antifibrotik ajan olabilecekleri ileri sürülmüştür. (161,164-169). Ayrıca statinlerin mitekondriyal apopitotik yolağı aktive ederek ratlarda HSH apopitozisini uyardığı çalışmalarda gösterilmiştir (164). Statin grubu ilaçlardan biri olan pravastatinin hepatik fibroziste kullanımında birçok avantaj özelliği bulunmaktadır (170,171). Diğer statinlerle kıyaslandığında kendisi aktif bir ilaçtır, karaciğerde çok az oranda metabolize olur, safra yoluyla vücuttan atılmaz ve seçici olarak karaciğerde dağılır. Bu

özellikleri ile safra yolu ligasyonu ile oluşturulan deneysel hepatik fibrozis modelinde kullanımı avantajlı bir statin grubu ilaç olduğundan çalışmamızda pravastatin kullanılmıştır. Literatürde benzer çalışmalarda (172) kullanılan 5 mg/kg/gün dozuyla ratlarda etkisi incelenmiştir. Bu doz yetişkin insanda 24 mg/gün (60 kg'lık bir yetişkinde) dozuna eş değerdir.

Yang ve ark.'nın (172) yaptığı BALB/c fareler üzerinde yapılan çalışmada intraperitoneal karbon tetrachloride ya da da thioacetamide injeksiyonu yöntemi ile oluşturulan hepatik fibrozis modelinde statin grubu ilaçlardan pravastatin ve protein kinaz C (PKC) inhibitörü enzastaurinin birlikte uygulanarak hepatik fibroziste antifibrotik etkinlikleri araştırılmıştır. Hepatik stellate hücre aktivasyonu, histolojik bulguların morfometrik analizleri ve α-SMA ile immünohistokimyasal olarak değerlendirilirken, aktive HSH apopitozisi 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ya da terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick end-labeling (TUNEL) işaretleme ve immun blot analiz ile değerlendirilmiştir. Hepatik fibrozis ise Masson Trichrome boyama ile kollajen deposizyonu saptandıktan sonra imaj analizi yöntemi yardımıyla kollajen depozisyon yaygınlığı ölçülerek değerlendirilmiştir. Pravastatinin HSH apopitozisini indüklediği, kaspaz-9 aktivasyonunu arttırarak mitekondriyal apopitozis yolağını indüklediği ve kollajen depozisyon yaygınlığını belirgin azaltarak hepatik fibrozisi azaltıcı etkileri gösterilmiştir.

Oberti ve ark.'nın (173) yaptıkları bir çalışmada ise simvastatin, pentoksifilin ve spironolaktonun safra yolu bağlanmış sıçanlarda hepatik fibrozis ve portal hipertansiyon üzerine etkileri araştırılmıştır. Hepatik fibrozisin değerlendirilmesinde plazma hyaluronat düzeyi ve picrosirius solüsyonu ile spesifik kollajen işaretlenerek morfometrik analiz yöntemi olan imaj analizi ile hesaplanan kollajen yüzey yoğunluğu yüzdesi kullanılmıştır. Simvastatinin kollajen yüzey yoğunluğu yüzdesi ve plazma hyaluronat ile transaminazlar üzerine olumlu etkisi izlenmemiş ve hepatik fibrozis üzerine etkisiz saptanmıştır. Bu çalışmada ışık mikroskobunda yapılan incelemelerde safra yolu bağlı olan ratlara ait karaciğer kesitlerinin hiçbirinde siroz izlenmemiş olup tüm bu ratlarda yaygın duktul proliferasyonu ve özellikle portal alanların etrafında olmak üzere fibrozis saptanmış ancak nodüler transformasyon izlenmemiştir. Bunun nedeni safra yolu bağlanan sıçanların takip süreleri ile ilişkili olabileğini belirtmişlerdir. Kountouras ve ark.'ı (160) 40 günlük safra yolu ligasyonu sonrasında bile sıçanlarda gerçek siroz saptayamadıklarını belirtmişlerdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda komplet siroz oluşumunu görebilmek için 60-90 günlük safra yolu ligasyonu gerektiği belirtilmektedir (174). Çalışmamızda Oberti ve ark.'nın (173) çalışmasıyla benzer şekilde pravastatinin fibrozis üzerine etkisi görülmemiştir. Yang ve ark.'nın (172)

sonuçlarının farklı sonuçlar vermesi safra yolu bağlanmış sıçanların karaciğer dokularında fibrozis gelişiminin her sıçanda ve kesitin alıdığı bölgeden bölgeye farklılık göstermesiyle açıklanabilir (174,175).

Çalışmamızda hepatik fibrozis bu çalışmada kullanılan morfometrik metottan farklı olarak Masson trichrome boyaması ile değerlendirildi ve farklı bir statin grubu ilacın etkisi değerlendirildi. Oberti ve ark.'ın (173) yaptığı çalışmada hepatik kollajen, picrosirius boyama ile işaretlenmiş ve kollajen yüzey yoğunluğu tüm karaciğer yüzey alanına oranlanarak fibrozis değerlendirilmiş. Poo ve ark.'nın (175) çalışmasında hepatik fibrozis, kollajen dışında proteoglikan depositlerini de işaretleyen Masson's trichrome ile gösterilmiştir ve en önemlisi hepatik volum yoğunluğu ölçerek değerlendirilmiştir. Bu iki yaklaşım biribirinden tamamiyle farklıdır (171).

Aprigliano ve ark.'nın (164) yaptığı bir çalışmada sıçanlarda aktive olmuş HSH'lerde atorvastatin ile apopitozis indüklenmesi gösterilmeye çalışılmıştır. Sıçanlara ait HSH'ler primer doku kültürleri ile elde edilip atorvastatin ile muamele edilerek apopitozis üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Canlı, apopitotik ve nekrotik hücreler flow sitometri ve lazer scan mikroskop ile, hücre siklüs analizleri flow sitometri ve lazer scan mikroskop ile, proapopitotik ve antiapopitotik faktörler Western blot ile ve kaspazların proteaz aktiviteleri kolorimetrik kit kullanılarak hesaplanmıştır. Çalışmanın sonucunda atorvastatinin aktive HSH'lerde apopitozisi indüklediği görülmüştür. Atorvastatin ile uyarılmış aktive HSH'lerin apopitozisi, kaspaz-3 ve kaspaz-9 artmış proteaz aktivitesi ile ilişkili bulunmuştur.

Sonuç olarak Aprigliano ve ark. (164) yaptığı bu çalışmada atorvastatinin aktive HSH'lerde apopitozisi indüklemesi ERK bağımlı Bid'in bölünmesi ve yüksek düzeyde kaspaz-3 ve kaspaz-9 proteaz aktivitesi artışı ile olduğu saptanmıştır. Bizim çalışmamızda Aprigliano ve ark.'nın (164) yaptığı çalışmadan farklı olarak atorvastatin yerine pravastatin kullanıldığından, ilaçların moleküler yapılarının farklı olmasından kaynaklanan kaspaz-3 ve kaspaz-9 proteaz aktiviteleri her iki ligasyon grubunda benzer olarak sonuçlanmış olabilir. Ayrıca bizim çalışmamızda HSH'ler doku kültürleri ile değil, safra yolu ligasyonu yapılan ratların karaciğer kesitlerinde HSH'ler düz kas hücrelerinden ayırd edilmek amaçlı α-SMA ile boyanarak işaretlendi. Sonrasında kaspaz-3 ve kaspaz-9 ile muamele edilerek apopitosizleri değerlendirildi. Kaspaz-3 ve kaspaz-9 proteaz aktivite artışının safra yolu ligasyonu yapılan her iki grupta artmış olmasına karşın pravastatin verilen grupla aynı düzeyde olması *in vivo* ve *in vitro* birtakım farklıların olmasına bağlı olabilir. Son olarak da pravastatinin apopitozisi mitekondriyal yolak dışındaki diğer iki yolaktan (Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan

ölüm aktivatörleri ile tetiklenme veya endoplazmik retikulum aracılı apoptozis oluşturulması) herhangi birini izleyerek uyarmış olabileceğinden apopitozis saptanamamış olabilir.

Rombouts ve ark. 'nın (161) yaptığı çalışmada HMG-CoA redüktaz inhibitörleri olan lovastatin ve simvastatinin HSH proliferasyon hızına ve kararlı durum düzeyleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada metot olarak statin ve/veya PDGF ve mevalonate etkisindeki hücresel DNA sentezi BrdU hesaplanarak değerlendirilmiştir. Kollajen tip I, III, IV ve fibronektin ELİSA ile sayısallaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda lovastatin ve simvastatinin doz bağımlı olarak HSH proliferasyon oranını inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Lovastatin ve simvastatin kollajen tip I kararlı durum düzeyini %240, tip III düzeyini %245 ve tip IV düzeyini %227 azaltmıştır. Sonuçta lovastatin ve simvastatin, HSH proliferasyonunu ve kollajenin kararlı durum düzeylerini, lipid düzeylerini düşürücü etkilerinden farklı bir mekanizmayla azaltmışlardır. Bizim çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak *in vitro* hücre kültürleri yerine safra yolu ligasyonu yöntemi kullanılarak *in vivo* hepatik hasar oluşturulmuş ve HSH'ler ECM üretimini artırarak fibrozise yol açmış, α-SMA ile artmış olan HSH'ler işaretlenmiştir. Pravastatinin HSH proliferasyonu üzerine belirgin inhibe edici etkisinin olmaması, ilacın kendi moleküler yapısının lovastatin ve simvastatinden farklı olmasına bağlı olabileceği gibi, dozunun bizim çalışmamızdan farklı dozda (5 mg/kg/gün tek doz gavaj yöntemiyle uygulandı) olması ile de ilişkili olabilir. Çalışmamızda literatürde uygulanan ve Yang ve ark.'ın (167) uyguladığı doza uygun olarak verilmiştir. Ayrıca *in vivo* ve *in vitro* uygulamalardan kaynaklanan farklılıklar da sonucu etkilemiş olabilir.

Trebicka ve ark. (176) atorvastatinin safra yolu bağlanmış sıçanlarda antifibrotik etkilerini araştırmak amaçlı yaptığı çalışmada sıçanlarda ligasyon sonrası hemen atorvastatin (15mg/kg/gün) verilen profilaksi grubu ile, fibrozisi devam eden sıçanlarda atorvastatin verilen tedavi grubu ile sham ve kontrol grupları oluşturulmuş. Fibrozis hidroksiprolin içeriği ve Sirius kırmızı işaretleme ile değerlendirilmiş. HSC aktivasyonu, α-SMA ekspresyonu, sitokinlerin mRNA düzeyleri, RT-PCR ile prokollajen ve zimografi ile MMP-2 analizleri ile değerlendirilmiş. Proliferasyon, Katepsinlerin (B ve D) ekspresyonları, prolifere olan nükleer antijen (PCNA) ve Ki67 boyama ile değerlendirlmiştir. Apopitozis kaspaz-3 aktivitesi, PARP-1 ayrılması ve TUNEL ile değerlendirilmiştir. Hepatik inflamasyon serum biyokimyasal parametreleri ve karaciğer histolojisi ile değerlendirilmiş. Sonuç olarak ligasyon yapılan *in vivo* modelde çok erken atorvastatin tedavisi HSH aktivasyonunu ve fibrozisi azaltmıştır. Bizim çalışmamızda da yöntem olarak benzer şekilde safra yolu ligasyonu yapıldı ve hemen sonrasında pravastatin 5 mg/kg/gün dozunda gavaj yoluyla verildi. Trebicka ve ark.'ın (176) verdiği dozdan daha az olmasından kaynaklanan nedenle fibroziste gerileme

saptanmamış olabilir. Yine bu çalışmada HSH aktivasyonunu göstermede birden çok yöntem α-SMA, mRNA, RT-PCR ile prokollajen ve MMP-2 analizleri kullanılmış ve HSH ‘ lerde aktivasyon saptanmıştır. Bizim çalışmamızda α-SMA boyaması ile HSH ‘ler işaretlendi ve kaspaz-3 ve kaspaz-9 ile apopitozis safra yolu bağlı sıçanlarda artmış olarak saptandı. Ancak pravastatin verilen grupla kıyasla belirgin fark saptanmadı. Çalışmamızda başka analiz yöntemi kullanılmadığından pravastatinin apopitozis üzerine kaspaz bağımlı yolak dışındaki diğer yolakları kullanmış olmasından kaynaklanan nedenlerle belirgin fark saptanmamış olabilir. Ayrıca hepatik inflamasyonun göstergesi olan karaciğer enzim düzeylerinde de bizim çalışmamızda olduğu gibi bu çalışmada da gerileme olmamıştır.

Sonuç olarak pravastatinin safra yolu bağlanmış sıçanların karaciğer dokusunda hepatik fibrozis, nekroinflamasyon ve HSH apopitozisi üzerine çalışmada kullandığımız yöntemler ile olumlu etkisi saptanmamıştır.

SONUÇLAR

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı, Patoloji Bilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı ile Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızın sonucunda;

1. SYL grubunda 7 ratta AST değeri 389±124 bulundu. SYL-İ grubunda 8 ratta AST değeri 441±136 bulundu. Pravastatin, safra yolu ligasyonu yapılan ratlarda AST değerleri üzerine etki göstermedi ($p<0.45$).
2. SYL grubunda 7 ratta ALT değeri 73.4±20 bulundu. SYL-İ grubunda 8 ratta ALT değeri 70 ±18 bulundu. Pravastatin, safra yolu ligasyonu yapılan ratlarda ALT değerleri üzerine etki göstermedi ($p=0.71$).
3. SYL grubunda 7 ratta ALP değeri 264 ± 56 bulundu. SYL-İ grubunda 8 ratta ALP değeri 204±65 bulundu. Pravastatin, safra yolu ligasyonu yapılan ratlarda ALP değerleri üzerine etki göstermemiştir ($p=0.79$).
4. SYL grubunda 7 ratta GGT değeri 30.1±9.5 bulundu. SYL-İ grubunda 8 ratta GGT değeri 38±16 bulundu. Pravastatin, safra yolu ligasyonu yapılan ratlarda GGT değerleri üzerine etki göstermemiştir ($p=0.29$).
5. SYL grubunda 7 ratta TBİL değeri 7.5±3.4 bulundu. SYL-İ grubunda 8 ratta TBİL değeri 9.5±2.8 bulundu. Pravastatin, safra yolu ligasyonu yapılan ratlarda TBİL değerleri üzerine etki göstermemiştir ($p=0.24$).
6. SYL grubunda 7 ratta DBİL değeri 5.9±2.6 bulundu. SYL-İ grubunda 8 ratta DBİL değeri 7.7±2.3 bulundu. Pravastatin, safra yolu ligasyonu yapılan ratlarda DBİL değerleri üzerine etki göstermemiştir ($p=0.18$).

7. Duktül proliferasyonu SYL grubunda %32 ±11 ve SYL-İ grubunda %52.5 ± 19 saptandı. Pravastatin, safra yolu ligasyonu yapılan ratlarda duktül proliferasyonunu önemli ölçüde artırmıştır (p=0.02).
8. İnflamasyon SYL grubunda 2 ratta, SYL-İ grubunda 1 ratta izlendi. Az sayıda ratta inflamasyon nedeni ile istatistiksel karşılaştırma yapılmadı.
9. SYL grubu ile pravastatin verilen SYL-İ grubu arasında kaspaz-3 şiddeti benzer gözlendi (p=0.40).
10. SYL grubu ile pravastatin verilen SYL-İ grubu arasında kaspaz-3 yaygınlığı benzer gözlendi (p=0.17).
11. SYL grubu ile pravastatin verilen SYL-İ grubu arasında kaspaz-9 şiddeti benzer gözlendi (p=0.34).
12. SYL grubu ile pravastatin verilen SYL-İ grubu arasında kaspaz-9 yaygınlığı benzer gözlendi (p=0.87).
13. SYL grubu ile pravastatin verilen SYL-İ grup arasında fibrozis olarak benzer gözlendi (p=0.73).

ÖZET

Kırk adet Spraque-Dawley cinsi erişkin sıçan çalışmaya dahil edilmiş; sağlıklı kontrol (n=10) ,sham (n=10), safra yolu ligasyonu (n=10) ve safra yolu ligasyonu+ pravastatin (n=10) (5 mg/kg/gün gavaj yoluyla verildi) olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır. Kontrol, sham ve safra yolu ligasyonu yapılan gruplara dört hafta boyunca haftada 5 gün gavaj yoluyla serum fizyolojik verildi. Safra yolu bağlanmış ilaç verilen gruba ise 4 hafta boyunca haftada 5 gün 5 mg/kg/gün pravastatin gavaj yoluyla verildi. Toplam 4 haftanın sonunda bütün sıçanlar sakrifiye edilmiştir. Dört haftalık süre sonunda safra yolu bağlanmış sıçanlarda histopatolojik incelemede pravastatin alan ve almayan gruplarda nekroinflamasyon skorları ve hepatik fibrozis dereceleri arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Pravastatin, safra yolu ligasyonu yapılan ratlarda serum karaciğer enzim değerleri üzerine olumlu bir etki göstermemiştir ($p>0.05$). Karaciğer dokularının immünohistokimyasal olarak semikantitatif değerlendirmesinde pravastatin tedavisi ile safra yolu ligasyonu yapılan ratlarda kaspaz-3 ve kaspaz-9 şiddet ve yaygınlığının ilaç almayan gruba göre değişmediği gözlendi ($p>0.05$).

Sonuç olarak pravastatinin safra yolu bağlanmış sıçanların karaciğer dokusunda hepatik fibrozis, nekroinflamasyon ve hepatik stellat hücre apopitozisi üzerine etkisi saptanmamıştır.

Anahtar kelimeler: Hepatik fibrozis, nekroinflamasyon, hepatik stellate hücre

THE EFFICIENCY OF PRAVASTATIN ON RETARDATION OF HEPATIC FIBROSIS IN BILIARY OBSTRUCTED RATS

SUMMARY

Forty Spraque-Dawley adult rat are enrolled in this study, divided into four groups as healthy groups (n=10), sham (n=10), bile duct ligation (n=10) and bile duct ligation with pravastatin (n=10). Saline via gavage 5 days per week administered to healthy, sham and bile duct ligation group. Pravastatin administered to bile duct ligation with pravastatin group 5 mg/kg/day via gavage 5 days per week. Drugs were administered by daily gavage over a 4-week period as soon as bile duct ligatiıon was performed. At the end of the four weeks all rats have been sacrificed.

At the end of the four week, the degree of necro-inflammation and the grade of hepatic fibrosis were evaluated histopathologically with light microscobe in the pravastatin given bile duct ligation groups and only saline given bile duct ligation groups . There were no statistical difference of necro-inflammation and hepatic fibrosis between the two groups ($p>0.05$). Pravastatin treatment had no positive effect on the serum levels of liver enzyms in the bile duct ligation groups. ($p>0.05$). Liver tissue's immunohistochemical semi-quantitative evaluation on pravastatin treatment given bile duct ligation rat groups, caspase-3 and caspase-9 intensivity and generality did not differ between the pravastatin given and not given groups ($p>0.05$).

As a result, pravastatin treatment does not have any preventive effect on hepatic fibrosis, necroinflammation and hepatic stellate cell apopitosis in the liver tissues of bile duct ligated rats

Key words: Hepatic fibrosis, necroinflammation, hepatic stellate cell

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

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.ed. Ankara: Güneş Kitabevi, 2006;3:168-80.

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

15. Guyton AJ, Fizyoloji, Çeviri Editör; Türk Fizyolojik Bilimler Derneği. 5.ed, Ankara: Güneş Kitabevi,2008428-9, 585-94

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

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

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

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

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

21. 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.

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

23. 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.

24. 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; 7: 97-132.

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

26. Gall EA, Dobrogorski O. Hepatic alterations in obstructive jaundice. Am J Clin Pathol 1964;4:126-39.

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

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

29. 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.

30. 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.

31. 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.

32. 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.

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

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

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

36. 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.

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

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

39. Blumberg RS, Chopra S, Ibrahim R, Crawford J, Farraye FA, Zeldis JW et al. Primary hepatocellular carcinoma in idiopathic hemochromatosis after reversal of cirrhosis. Gastroenterology 1988;95:1399-402.

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

41. 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.

42. 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.

43. 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.

44. 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.

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

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

47. 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.

48. 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

49. 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.

50. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease:the biology and regulation of apoptosis. Cancer Biology 1995:6;3-16.

51. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol 1995;146:3-15.

52. Schwartzman RA, Cidloski JA. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. Endocrine Reviews 1993;14:133-44.

53. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 1980;284:555-6.

54. Cohen JJ. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. Hosp Pract 1993;15:35-43.

55. Sudhir Gupta, Anshu Agrawal, Sudhanshu Agrawal, Houfen Su, Sastry Gollapudi. A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. 2006, 3:5.

56. Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS. Apoptosis and delayed generation after spinal cord injury in rats and monkeys. Nat Med 1997;3:73-6.

57. Takagi T, Takayasu M, Mizuno M, Yoshimoto M, Yoshida J. Caspase activation in neuronal and glial apoptosis following spinal cord injury in mice. Neurol Med Chir (Tokyo) 2003;43:20-9.

58. Benedict MA, Ding LY. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-I-mediatcd caspase-9 activation and apoptosis. EMBO J. 1999;18:3586-95.

59. Krajewski S, Krajewska M, Ellerby L M, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL et al. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. Proc Natl Acad Sci, USA 1999;96:5752-7.

60. Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea JR, Krajewski S, Reed JC, Dietrich WD. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. J Neuropathol Exp Neurol 2001;60:422-9.

61. Choi WS, Lee EH, Chung CW. Cleavage of bax is mediated by caspase dependent or independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl 2. J Neurochem 2001;77:1531-41.

62. Newton K, Strasser A. The Bcl-2 family and cell death regulation. Curr Opin Genet Dev 1998;8:68-75.

63. Takahaski K, Schwarz E, Ljubetic C, Murray M, Tessler A, Saavedra RA. DNA plasmid that codes for human Bcl-2 gene preserves axotomized Clarke's nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adults rats. J Comp Neurol 1999;404:159-71.

64. Lu J, Ashwell K, Ken WS, Waite P. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. Spine 2000;25:1859-66.

65. Nakatsuka H, Ohta S, Tanaka J, Toku K, Kumon Y, Maeda N et al. Release of cytochrome c from mitochondria to cytosol in gerbil hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia. Brain Research 1999;849:216-9.

66. Banasiak KJ and Haddad GG. Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. Brain Res 1998;797:295-304.

67. Kromer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere J L and Mignotte B. The biochemistery of programmed cell death. Fedn Am Soc Exp Biol J 1995;9:1277-87.

68. Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. J Cell Biol 2000;150:731-40.

69. Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation. J Biol Chem 2001;276:869-74

70. Bao F, Liu D. Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptosis cell death and activates caspase-3. Neuroscience 2003;116:59-70.

71. Malignant Melanoma in the 21st Century: The Emerging Molecular Landscape . Mayo Clin Proc. 2008;83(7):825-46.

72. Akins PT, Liu PK, Hsu CY. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia: Friend or Foe ?. Stroke 1996;27:1682-7.

73. Nowell PC. Cytogenetics of tumor progression. Cancer 1990;65:2172-5.

74. Caotes PJ, Hales SA, Hall PA. The association between cell proliferation and apoptosis; studies using cell cycle-associated proteins Ki67 and DNA polymerase alpha. J Pathol 1996;178:71-7.

75. Nakano R. Apoptosis: Gene directed cell death. Horm Res 1997;48:2-4.

76. Wyllie A H. The genetic regulation of apoptosis. Curr Opin Genet Dev 1995;5:97-104.

77. Miyashita T, Krajewski S, Krajewsko M. Tumor supressor p53 is a regülator of bcl-2 bax gene expression in vivo. Oncogene 1994;9:1799-805.

78. Spencer S, Cataldo NA, Jaffe RB. Apoptosis in the human female reproductive tract. Obstetrical and Gynecological Survey 1996;5:314-23.

79. Evan GL, Wyllie AH, Gilbert GS, Littlewood TD, Lond H. Breaks M. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. Cell 1992;69:119-28.

80. Wagner A J, Small M B, Itoy N. Myc-mediated apoptosis is blocked by ectopic expression of bcl-2. Mol Cell Biol 1993;13:2432-440.

81. Li M, Ona VO, Chen M, Kaul M, Tenneti L, Zhang X ET AL. Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and caspase-3 in a Mouse model of traumatic spinal cord injury. Neuroscience 2000;99:333-42

82. Wingrave J M, Schaecher K E, Sribnick E A. Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats. J Neurosci Res 2003;73:95-104.

83. Eastman A. Survival factors, intranuclear signal transduction and the activation of endonucleases in apoptosis. Cancer Biology 1995;6:45-52.

84. Touchette N, Fogle S. Apoptosis: it chimes with mitosis. JNIH Res 1991:3:75.

85. Earnshaw WC. Nuclear changes in apoptosis. Curr Opin Cell Biol 1995;7:337-43.

86. Balakumran A, Champbell G A, Maslen M T. Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. Toxicol Appl Pharmacol 1996;139:122-7.

87. Ulukaya E. Apopitozis ders notları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı 2003;15-26

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

89. 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.

90. 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.

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

92. 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.

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

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

95. Türkay C, Yönem O, Arıcı S, Koyuncu A, Kanbay M. Effect of Angiotensin converting Enzyme Inhibition on Experimental Hepatic Fibrogenesis. Dig Dis Sci. 2008;53(3):789-93

96. 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.

97. 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.

98. 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.

99. 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;74:2251–63.75

100. 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.

101. 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.

102. 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.

103. 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.

104. 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.

105. 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.

106. 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.

107. 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.

108. 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.

109. 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.

110. Mason RP, Walter MF, Day CA, Jacob RF. Active metabolite of atorvastatin inhibits membrane cholesterol domain formation by an antioxidant mechanism . J Biol Chem 2006; 7; 281(14): 9337-45.

111. Liao JK, Bettmann MA, Sandor T, Tucker JI, Coleman SM, Creager MA. Differential impairment of vasodilator responsiveness of peripheral resistance and conduit vessels in humans with atherosclerosis. Circ Res 1991;68:1027-34.

112. Libby P, Sukhova G, Lee RT, Liao JK. Molecular biology of atherosclerosis. Int J Cardiol 1997;62(2):23-29.

113. Paoletti R, Bolego C, Cignarella A. Lipid and non-lipid effects of statins. Handb Exp Pharmacol 2005;170:365-88.

114. Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. N Engl J Med 1995;332:488-93.

115. O'Driscoll G, Green D, Taylor RR. Simvastatin an HMG-Co A reductase inhibitor improves endothelial dysfunction within 1 month. Circulation 1997;95:1126-31.

116. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. Circulation 1998;97:1129-35

117. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ et al. The HMG-Co A reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. Nat Med 2000;6:1004-10.

118. Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T, Azumi H, Yasuhara M et al. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-Co A reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Atherosclerosis 2001;154:87-96.

119. Dulak J, Loboda A, Jazwa A, Zagorska A, Dorler A, Alber H et al. Atorvastatin affects several angiogenic mediators in human endothelial cells. Endothelium 2001;12(5-6):233-41.

120. Laufs U, La Fata V, Liao JK. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down regulation of endothelial nitric oxide synthase. J Biol Chem 1997;272:31725-9.

121. Essig M, Nguyen G, Prie D, Escoubet B, Srae JD, Fredlander G. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolitic activity in rat aortic endothelial cells: role of geranylgeranylation and Rho proteins. Circ Res 1998;83:683-90.

122. Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascula R, Hernandez G, Diaz C, Lamas S. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. J Clin Invest 1998;101:2711-9.

123. Lee TM, Lin MS, Chou TF, Chang NC. Additive effects of combined blockade of AT1 receptor and HMG-CoA reductase on left ventricular remodeling in infarcted rats. Am J P hysiol Heart Circ Physiol 2006;291(3):1281-9.

124. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress . Circ Res 2000;87:840-4.

125. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia: mechanisms, pathophysiological importance, and therapeutic interventions. Semin Thromb Hemost 2000;6:529-37.

126. Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Muller K, Ahlbory K, Linz W, Itter G et al. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. Hypertension 2001;37:1450-7.

127. Munzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance: a novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. J Clin Invest 1995;95:187-94.

128. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. J Clin Invest 1997;100:2153-7.

129. Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Dzau VJ. Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease. Circulation 1998;98:82-9.

130. Kobashigawa JA, Katznelson S, Laks H, Johnson JA, Yeatman L, Wang XM et al. Effects of pravastatin on outcomes after cardiac transpalantation. N Engl J Med1995;333:621-7.

131. Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing Rho GTPase-induced downregulation of p27 (Kip 1). J Biol Chem 1999;274:21926-31.

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

133. Hughes DA. Control of signal transduction and morphogenesis by Ras. Semin Cell Biol 1995;6:89-94.

134. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. J Biol Chem 1998;273:24266-71.

135. Hengst L, Reed SI.Translational control of p27 Kip1umulation during the cell cycle. Science 1996;271:1861-4.

136. Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F, Fitzgerald GA. Platelet activation in unstable coronary disease. N Eng J Med 1986;315:983-9.

137. Fuster V, Badimon JJ, Badimon L. Clinical-pathological correlations of coronary disease progression and regression. Circulation 1992;86(6):1-11.

138. Tremoli E, Colli S, Maderna P, Baldassarre D, Di Minno G. Hypercholesterolemia and platelets. Semin Thromb Hemost 1993;19:115-21.

139. Notarbartolo A, Davi G, Averna M, Barbagallo CM, Ganci A, Giammarresi C et al. Inhibition of thromboxane biosynthesis and platelet function by simvastatin in type IIa hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995;15: 247-51.

140. Baldassarre D, Mores Ni, Colli S, Pazzucconi F, Sirtori CR, Tremoli E. Platelet alpha-2 adrenergic receptors in hypercholesterolemia: relationship between binding studies and epinephrine-induced platelet aggregation. Clin Pharmacol Ther 1997;61:684-91.

141. Le Quan Sang KH, Levenson J, Megnien JL, Simon A, Devynck MA. Platelet cytosolic Ca+2 and membrane dynamics in patients with primary hypercholesterolemia: effects of pravastatin. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995;15:759-64.

142. Serebruany VL, Miller M, Pokov AN, Malinin AI, Lowry DR, Tanguay JF, Hennekens CH. Effect of statins on platelet PAR-1 thrombin receptor in patients with the metabolic syndrome (from the PAR-1 inhibiton by statins PARIS study). Am J Cardiol 2006;97(9):1332-6.

143. Huhle G, Ablesthauser C, Mayer N, Weidinger G, Harenberg J, Heene DL. Reduction of platelet activity markers in type II hypercholesterolemic patients by a HMG-CoA reductase inhibitor. Thromb Res 1999;95:229-34.

144. Schror K. Platelet reactivity and arachidonic acid metabolism in type II hyperlipoproteinaemia and its modification by cholesterol-lowering agents. Eicosanoids 1990;3:67-73.

145. Vaughan CJ, Gotto AM Jr, Basson CT. The evolving role of statins in the menagement of atherosclerosis. J Am Coll Cardiol 2000;35:1-10.

146. Alfon J, Fernandez de Arriba A, Gomez-Casajus LA, Merlos M. Alternative binding assay of gp IIb/IIIa antagonists with a nonradioactive labeling method of platelets. Thromb Res 2001;102:247-53.

147. Alfon J, Royo T, Garcia-Moll X, Badimon L. Platelet deposition on eroded vessel walls at a stenotic shear rate is inhibited by lipid-lowering treatment with atorvastatin. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999;19:1812-7.

148. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. Circulation.1995;91:2844-50.

149. Fuster V, Stein B, Ambrose JA, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis: evolving concepts. Circulation 1990;82(Suppl II):47-59.

150. Fernandez-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, Fuster V, Meyer B, Mailhac A et al. Characterization of the relative thrombogenecity of plaque rupture. J Am Coll Cardiol 1994;23:1562-9.

151. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: implications for plaque rupture. Circulation1994;90:775-8.

152. Fukumoto Y, Libby P, Rabkin E, Hill CC, Enomoto M, Hirouchi Y et al.Statins alter smooth muscle cell acumulation and collogen content in established atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. Circulation 2001;103:993-9.

153. Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Frukawa Y et al. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases, and tissue factor in vivo and in vitro. Circulation 2001;103:276-83.

154. Ross R. Atherosclerosis is an inflamatory disease. Am Heart J 1999;138:419-20.

155. Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C et al.Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatary integrin site. Nat Med 2001;7:68.

156. Lefer AM, Scalia R, Lefer DJ. Vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) unrelated to cholesterol lowering: new concepts for cardiovascular disease. Cardiovasc Res 2001; 49:281-287 Ankara Ecz Fak Derg 2006;35(3):197-209.

157. Stalker TJ, Lefer AM, Scalia R. A new HMG-CoA reductase inhibitor, risovastatin, exerts anti-inflammatory effects on the microvascular endothelium: the role of mevalonic acid. Br J Pharmacol 2001;133:406-12.

158. Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, Gotto AM Jr. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. N Engl J Med 2001;344:1959-65.

159. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein: the cholesterol and recurrent events (CARE) investigators. Circulation 1999;100:230-35.

160. 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.

161. Krista Rombouts, Elton Kisanga, Karine Hellemans, Annemie Wielant, Detlef Schuppan, Albert Geerts. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on proliferation and protein synthesis by rat hepatic stellate cells. . J Hepatol 2003;38:564–72.

162. Gerling B, Becker M, Waldschmidt J, Rehmann M, Schuppan D. Elevated serum aminoterminal procollagen type-IIIpeptide parallels collagen accumulation in rats with secondary biliary fibrosis. J Hepatol 1996;25:79-84.

163. Chang ML, Yeh CT, Chang PY, Chen JC. Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation. World J Gastroenterol 2005;11: 4167–4172.

164. Aprigliano I, Dudas J, Ramadori G. Saile B. Atorvastatin induces apoptosis by a caspase-9-dependent pathway: an in vitro study on activated rat hepatic stellate cells. Liver Int 2008;28(4):547-57.

165. Jaster R, Brock P, Sparmann G, Emmrich J, Liebe. Inhibition of pancreatic stellate cell activation by the hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor lovastatin. Biochem Pharmacol 2003;65: 1295–1303.

166. Li C, Yang CW, Park JH, Lim SW, Sun BK, Jung JY et al . Pravastatin treatment attenuates interstitial inflammation and fibrosis in a rat model of chronic cyclosporine-induced nephropathy. Am J Physiol Renal Physiol 2004;286:F46-57.

167. Louneva N, Huaman G, Fertala J, Jimenez SA. Inhibition of systemic sclerosis dermal fibroblast type I collagen production and gene expression by simvastatin. Arthritis Rheum 2006;54:1298–1308

168. Saka M, Obata K, Ichihara S, Cheng XW, Kimata H, Noda A et al. Attenuation of ventricular hypertrophy and fibrosis in rats by pitavastatin: potential role of the RhoA-extracellular signal-regulated kinase-serum response factor signalling pathway. Clin Exp Pharmacol Physiol 2006;33: 1164–1171.

169. Tanaka K, Honda M, Takabatake T. Anti-apoptotic effect of atorvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, on cardiac myocytes through protein kinase C activation. Clin Exp Pharmacol Physiol 2004; 31: 360–364.

170. Jacobsen W, Kirchner G, Hallensleben K, Mancinelli L, Deters M et al. Comparison of cytochrome P-450-dependent metabolism and drug interactions of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors lovastatin and pravastatin in the liver. Drug Metab Dispos 1999;27: 173–179.

171. Shitara Y, Sugiyama Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. Pharmacol Ther 2006; 112: 71–10 .

172. Yang J, Yoon JH, Bang YJ, Lee SH, Lee SM, Byun HJ et al. Synergistic Anti-Fibrotic Efficacy of Statin and Protein Kinase C Inhibitor in Hepatic Fibrosis Articles. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2011;300(5):703-708

173. Frederic Oberti, Christophe Pilette, Her &Rifflet. Effects of simvastatin, pentoxifylline and spironolactone on hepatic fibrosis and portal hypertension in rats with bile duct ligation. J Hepatol 1991;26:1363-22.

174. Poo JL, Feldmann G, Erlinger S, Braillon A, Gaudin C, Dumont M, Lebrec D. Ursodeoxycholic acid limits liver histologic alterations and portal hypertension induced by bile duct ligation in the rat. Gastroenterology 1992;102:1752-9

175. Poo JL, Feldmann G, Moreau A, Gaudin C, Lebrec D. Early colchicine administration reduces hepatic fibrosis and portal hypertension in rats with bile duct ligation. J Hepatol 1993;19: 904.

176. Jonel Trebicka, Martin Hennenberg, Margarete Odenthal, Khanwali Shir, Sabine Klein, Michaela Granzow et al. Atorvastatin attenuates hepatic fibrosis in rats after bile duct ligation via decreased turnover of hepatic stellate cells. J Hepatol 2010;53:702-12.

EKLER

Ek 1

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 7 **Karar Tarihi: 20.10.2010**

KARAR NO: 2010/07.02

Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç.Dr. Ali Rıza Soylu'nun yaptığı Arş.Gör.Dr. Yeliz Kömürcü'nün tıpta uzmanlık tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2010/042 protokol nolu "SAFRA YOLLARI TIKALI RATLARDA HEPATİK FİBROZUN ÖNLENMESİNDE PRAVASTATİN TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİ" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvani/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
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	