

1. GİRİŞ

Dünyada karaciğer sirozuna bağlı ölümler uzun zamandan bu yana artış göstermektedir.

Karaciğer sirozu, karaciğer fibrozis (HF) inden kaynaklanır. Karaciğer fibrozisi; karaciğer yıldız hücre (HSC) aktivasyonu ile karakterize edilen ve kronik karaciğer hastalığına bağlı oluşan bir yara iyileşme sürecidir ve hücre dışı matriks bileşenlerinin (ECM)' nin aşırı üretimi anlamına gelir.

Bazı kronik viral enfeksiyonlar, alkol, otoimmünite, ilaç toksisitesi ve metabolik nedenler karaciğerde inflamatuvar reaksiyonların meydana gelmesine neden olurlar. Zarar gören hepatositler, onların membran bileşenleri, toksik ajanların metabolitleri, süzülen inflamatuvar hücreler Kupffer hücrelerinin aktivatörleridir. Aktive edilen kupffer hücreleri eriyebilir ajanların bir bölümünü; sitokin, reaktif oksijen türleri ve diğer faktörleri serbest bırakırlar.

Fibrotik karaciğerdeki reaktif oksijen ürünlerinin artmış üretiminin, kollajen sentezini artıran TGF- β geninin ekspresyonundaki düzensizliğe karşı bir cevap olabileceği rapor edilmiştir (1).

Yıldız hücreler ECM'nin artışına neden olan esas hücresel elementtir. Ekstraselüler proteinlerden olan kollajen tip I, III, IV, fibronektin, laminin ve proteoglikanlar fibrojeniz süresince üretilir. Bu proteinlerden en fazla kollajen tip I ve III bulunur.

Yüksek ölüm oranına ve ölümcül komplikasyonlara sebep olan sirozun erken safhasında HF önemli bir yer tutar. Buna karşın HF için geçerli, uygulanabilir bir tedavi yöntemi yoktur. Bu sebeple teori ve pratikte HF'nin önlenmesi çok önemlidir.

Dimetilnitrozamin (DMN) güçlü bir hepatotoksin, karsinojen ve mutajendir. DMN'nin temel hedefi DMN'nin metabolik aktivasyonunu gerektiren enzimleri içeren karaciğerdir. Karaciğer metabolizması ise mikrozomal membrana bağlı bir enzim olan sitokrom p450 2E1 (CYP 2E1) tarafından sürdürülür.

DMN'nin aktivasyonu ve yıkımı sonucu formaldehit, metanol, alkilenmiş ara ürünler ile metilenmiş makromoleküller olan nükleik asitler ve proteinler üretilir. DMN ile oluşturulan deneysel karaciğer fibrozis modelinde DMN' nin aşırı nekroza ve aynı zamanda karaciğerde hücre dışı matriks proteinlerinin ve özellikle kollajenin birikimine sebep olduğu görülmüştür (2).

Sıçanlarda DMN ile oluşturulan siroz modeli fibrozis oranındaki yüksek bir artış ve deney hayvanlarında düşük bir ölüm oranı açısından tercih edilen bir yöntemdir.

Karvakrol; *Labiatae* (Ballıbabagiller) familyasından birçok bitkinin uçucu yağlarında bulunan başlıca monoterpenik fenoldür.

Sunulan çalışmada Gaziantep yöre bitkisi olan *Thymbra spicata* L. (kara kekik) bitkisinin kurutulmuş yapraklarından elde edilen % 80' lik karvakrol içeren kekik yağı kullanıldı.

Bu çalışma dimetilnitrozamin (DMN) ile oluşturulan karaciğer fibrozisine karşı karvakrolün antifibrojenik etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KARACİĞER DOKUSUNUN FİZYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Karaciğer, safra kanalları ve safra kesesi ile birlikte karın boşluğunun sağ üst tarafını doldurur. Bu yapılar; anatomik yakınlıklarının yanı sıra birbiri ile ilişkili fonksiyonları ve bu organları etkileyen hastalıkların ortak özellikleri olması nedeniyle de birlikte değerlendirilirler (3).

Karaciğer bağırsaklardan gelen besin maddelerini metabolize etmek üzere vücudun dolaşım sistemi içinde oluşmuştur. Portal ven ve hepatik arter olmak üzere karaciğere açılan iki kan damarı bulunur. Portal ven, gastrointestinal emilim sonrası emilen sıvıları karaciğer kapillerine doğru taşıırken hepatik arter ise karaciğer dokusunun ihtiyaçları doğrultusunda birçok düzenleyici ajana benzer cevap verir (4).

Karaciğer dokusunda dört tip hücre bulunur:

Karaciğer hücresi (hepatosit) aktif metabolizması sebebiyle organel bakımından zengindir. Karaciğer hücreleri normalde yenilenir ve yenilenmenin (rejenerasyon) 50 -75 günde olduğu tahmin edilmektedir. Karaciğer hastalığında rejenerasyonun zayıf olduğuna dair kanıt yoktur; gerçekte, artmış nekrozu kompanse etmek için artmış rejenerasyon yeteneği vardır (4).

Kupffer hücreleri, dinlenme halinde partiküler elemanları fagosite ederler, çözünen (solubl) materyali reseptörleri ile hücre içine alırlar ve vücudun immün sistemi içine katarlar (4).

Ito hücresi (adiposit, yıldız hücresi) hepatositler arasında yerleşir. Ito hücresi, pozisyonu ve lipid vakuolleri içermesi ile tanınır. A vitamini fazlalığında bu hücrelerin sayısının artması nedeniyle, yağda eriyen vitaminlerin depo yeri olduğuna inanılır (3).

Pit hücreleri, içinde nöroendokrin granüller içerir fakat karaciğer dokusundaki önemi bilinmemektedir (3).

Sindirim kanalı ile vücudun diğer kısımları arasında tam kesişme noktasında yer alan karaciğerin, vücudun metabolik dengesini sağlamada birçok önemli rolü vardır. Bunlar; sindirilen proteinlerin, karbonhidratların, lipidlerin ve doğrudan kana emilen vitaminlerin işlenmesi, serum proteinlerinin sentezi, endojen atık ürünlerin ve zararlı xenobiyotiklerin detoksifikasyonu ve safra ile atılmasıdır (3). Karaciğerin diğer işlevleri; safranin oluşturulması ve salgılanması, toksinler ve steroidlerin etkisizleştirilmesi, pıhtılaşma faktörlerinin ve steroid bağlayan hormonların sentezi, bağışıklık, bilirübinin metabolize edilmesi ve atılımı şeklinde sıralanabilir (5).

2.2. KARACİĞER HASARI

Çok çeşitli metabolik, toksik, mikrobik, dolaşımsal ve neoplastik hastalıklar karaciğeri etkiler. Bazı durumlarda hastalık karaciğerde primer olarak oluşurken, kalp yetmezliği, yaygın kanser, alkolizm ve ekstrahepatik enfeksiyonlar gibi birçok hastalıkta karaciğer sekonder olarak hasara uğrar. Erken hepatik hasarın klinik sonuçları, belli bir sınıra kadar karaciğerin fonksiyonel kaynakları nedeniyle kompanse edilebilir ancak diffüz hastalığın ilerlemesi ve safra akımının stratejik harabiyeti nedeniyle karaciğer fonksiyonlarının bozulması, hayatı tehlikeye sokar (3).

Karaciğerin hasar verici nitelikteki olaylara karşı beş adet genel cevap şekli vardır. Bu olaylar ve morfolojik açıklamaları aşağıda kısaca özetlenmiştir:

(1) İnflamasyon

Akut ya da kronik inflamatuvar hücrelerin karaciğere gelmesi ile ilişkili hepatosit hasarına hepatit adı verilir. İnflamasyon lökositlerin giriş bölgesinde (portal bölgede) sınırlı olabileceği gibi, tüm parankime de yayılabilir. İnflamasyonu hepatosit nekrozu izlese de, bunun tam tersi de gerçekleşebilir. Hepatositler nekroza uğradığında kupffer hücreleri (makrofajlar) ölü hücreleri hemen fagosit ederler ve normal parankim içerisinde inflamatuvar hücre grupları oluştururlar (3).

(2) Dejenerasyon

Toksik ya da immunolojik nedenlerle meydana gelen hasar, hepatositlerin büyük berrak boşluklar içeren düzensiz kümelenmiş, sitoplazmalı, ödemli bir görünüme sahip olmalarına neden olur (balonlaşma dejenerasyonu). Demir, bakır, atılamayan safra materyali gibi bazı maddeler canlı hepatositlerde birikebilir. Yağ damlacıklarının hepatositler içinde birikmesine steatoz denir. Nukleusun yerini değiştirmeyen birden fazla küçük yağ damlacığının varlığı mikrovesiküler steatoz olarak tanımlanır. Bu alkolik karaciğer hastalığı, gebeliğin akut yağlı karaciğeri gibi bazı durumlarda meydana gelir. Nukleusu iten bir tek büyük yağ damlacığının varlığına makrovesiküler steatoz denir ve alkolik karaciğerde ya da şişman ve diyabetik kişilerin karaciğerlerinde görülür (3).

(3) Nekroz

Karaciğerde hasara yol açan herhangi bir olay hepatosit nekrozuna yol açabilir.

İskemik nekrozda, soluk boyanan mumyalaşmış hepatositler kalır (koagulatif nekroz). Toksik ya da immunolojik nedenlerle meydana gelen nekrozda, izole hepatositler,

büzülmüş piknotik koyu eozinofilik Councilman cisimcikleri şeklini alırlar. Bu nekroz şekli apoptozisin bir sonucudur (3).

Nekroz sıklıkla bölgesel bir yayılım gösterir. Bu durum, santral venin hemen çevresindeki hepatositlerin nekrozunda oldukça belirgindir (sentrilobüler nekroz). Bu tip nekrozda inflamasyona rastlanması; iskemik hasarın, bazı ilaca bağlı ve toksik reaksiyonların niteliğidir. Karaciğer hasarına neden olan çoğu durumda, nekroz ve inflamasyonun her ikisi birden mevcuttur (3)

Hepatosit nekrozu, karaciğer lobülleri içerisinde tek tek hücrelerde görülebilir (odaksal nekroz) ya da periportal parankim ile inflamasyonlu portal bölgeler arasında izlenebilir (güve yeniği nekrozu). Daha ağır bir iltihabi hasar meydana geldiğinde hepatosit gruplarının nekrozu, birbirlerine komşu lobülleri, portal-portal, portal-santral ya da santral-santral bağlantıları ile birleştirebilir (köprüleşme nekrozu) (3).

Hücre Nekrozu Testleri

Serum alanin aminotransferaz (ALT) hepatosellüler nekrozun ölçümünde kullanılan en özel ve en yaygın testtir. Beslenme durumu iyi ve yeterli intrasellüler (hücre içi) enzim deposuna sahip bir kişide yüzde bir kadar küçük oranda karaciğer hücresi harabiyeti ALT'nin serum seviyesini yükseltir. Serum aspartat aminotransferaz (AST) da benzer şekilde davranır, fakat her çeşit çizgili kas bu enzimi içerdiği için hepatosit nekrozu için daha az özeldir (4).

(4) Fibrozis

İnflamasyona ya da doğrudan toksik hasara cevap olarak fibrotik doku oluşur. Kollajen birikiminin hepatik kan akımının düzeni ve hepatosit perfüzyonu üzerinde uzun süreli sonuçları vardır. Başlangıç döneminde, fibrozis portal bölgenin içinde, çevresinde ya da santral venler çevresinde gelişebilir ya da sinüzoidler içerisinde depolanabilir. Zamanla fibröz bandlar karaciğerin çeşitli bölgelerini birleştirir (portal-portal, portal-santral, santral-santral). Bu olay köprüleşme fibrozisi olarak adlandırılır (3).

(5) Siroz

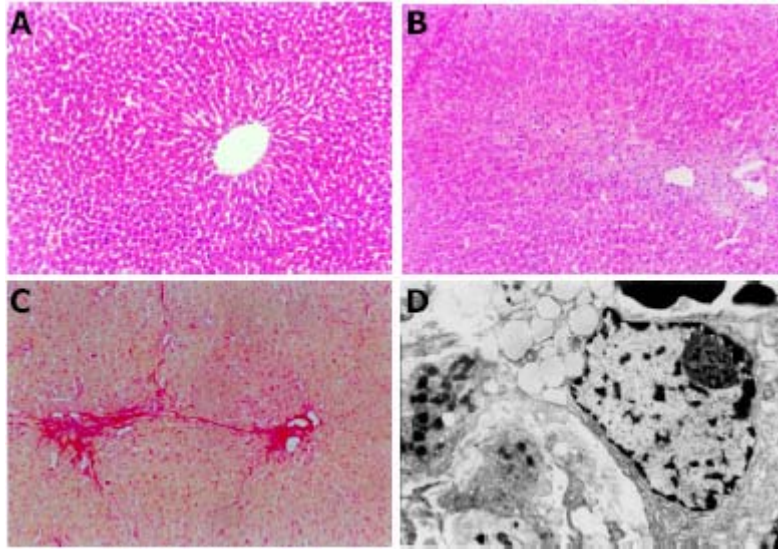
Siroz, batı ülkelerinde başta gelen 10 ölüm nedeninden biridir. Kronik karaciğer hastalığının bu son dönemi üç karakteristik özellik ile tanımlanabilir:

1. İnce bandlar ya da lobüllerin yerini alan geniş skar dokusu şeklinde köprüleşen fibröz septumlar,

2. Çevrelenmiş hepatositlerin rejenerasyonundan kaynaklanan çok küçük ya da büyük parankimal nodüller,

3. Tüm karaciğerin genel yapısının bozulması (3).

DMN ile oluşturulmuş HF' li sıçanlarla ilgili yapılan bir çalışmada sıçan karaciğerlerine ait kesitlerde aşağıdaki histolojik bulgular elde edilmiştir (6).



Resim 1. DMN uygulamasından sonra giderek artan yapısal değişimler (6).

A: Kontrol grubu karaciğerlerinde santral venlerle birlikte normal lobüler yapı,

B: DMN uygulamasının 7. gününden sonra portal alanlarda artmış nekroz,

C: DMN uygulamasının 14. gününden sonra santral alanlara bağlanmış ince fibrotik bölmeler,

D: DMN uygulamasının 21. ya da 28. gününden sonra kalın intralobüler bölmeler açıkça görülmüştür (6).

Parankimal hasar ve sonucunda oluşan fibrozis diffüz olup, tüm karaciğer boyunca yaygın olarak gözlenir (3).

2.2.1. Sirozun Patogenezi

Sirozun patogenezindeki merkezi olay, programlanmış fibrozistir. Normal bir karaciğerde, interstisyel kollajenler (tip I ve tip II) portal bölgeler ve santral venler çevresinde yoğunlaşmıştır. Parankime doğru seyrek demetler oluşturmaktadır. Sinozoidal endotelial hücreler ve hepatositler arasındaki boşlukta (Disse aralığında) tip IV kollajenden oluşan belirgin bir retikülün çatı yer almaktadır. Sirozda tip I ve tip III kollajen, lobülün tüm bölümlerinde birikir (3).

Sirozdaki fazla kollajenin başlıca kaynağı; Disse aralığında bulunan ve yağ depolayan yıldızlı hücre ya da Ito hücresidir. Normalde yağ ve A vitamini depolamak ile görevli bu hücreler, siroz gelişimi sırasında aktive olarak retinil ester depolarını kaybeder ve miyofibroblast benzeri hücrelere dönüşürler (3).

Kollajen sentezi ve birikimini başlatan uyarı çeşitli kaynaklardan gelebilir. Bu kaynaklar; hasara uğrayan endojen hücrelerin (Kupffer hücreleri, endotel hücreleri, hepatositler, safra kanalı epiteli hücreleri) sitokin üretmesi, ekstrasellüler matriks harabiyeti yıldızlı hücrelerin toksinler tarafından doğrudan uyarılmasıdır (3).

2.2.2. Sirozun Klinik Özellikleri

Sirozun tüm tipleri, klinik olarak sessiz gidebilir. Semptomatik olduklarında ise, sadece siroza özel olmayan belirtiler verirler. Bu belirtiler; anoreksi, kilo kaybı, halsizlik ve ileri evrelerde ağır derecede güçsüzlüktür.

Sirozlu birçok hastada ölüm şu mekanizmalar ile meydana gelir: Programlanmış karaciğer yetmezliği, portal hipertansiyon ile ilişkili komplikasyonlar ve sonucunda hepatosellüler karsinom gelişimi görülür (15).

2.3. KARACİĞER FİBROZİSİNİN MOLEKÜLER DÜZENLENMESİ:

DOKU HASARINA KARŞI OLUŞAN KARMAŞIK HÜCRESEL CEVAP

Fibrozisle oluşan hasarın özeti, ergin dokuların yüksek oranda gelişmiş cevabıdır. Karaciğerde fibrozise yol açan kronik hasar; viral hepatit (özellikle hepatit B ve C), alkol alışkanlığı, ilaçlar, demir ya da bakır birikimine neden olan metabolik hastalıklar, hepatosit ya da safra yolu epitelyumunun otoimmün saldırısı ya da konjenital (doğum ve doğum öncesi) anormallere neden olan cevaba karşı oluşur (7).

Karaciğer fibrozisi geri dönüşümlüdür buna rağmen son dönem fibrozisle gelişen siroz genelde geriye dönüşümsüzdür (8).

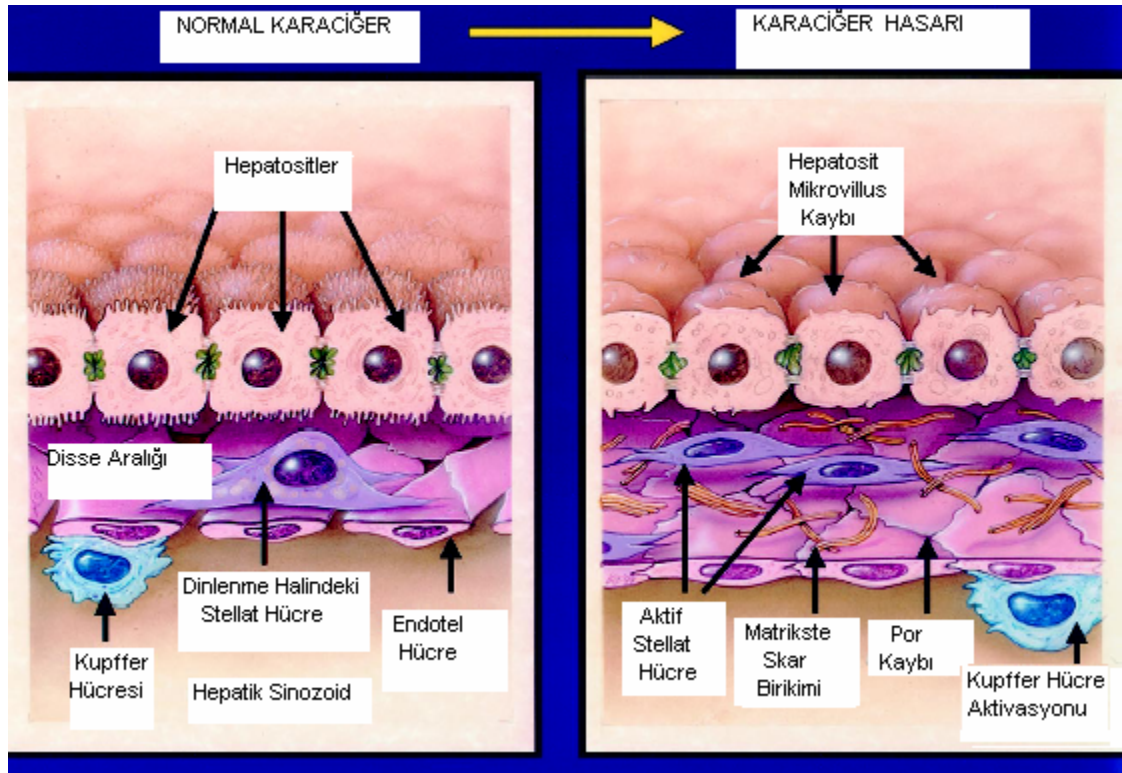
Bu sebeple skarın erken dönemde birikimine yol açan vakalarda, fibrozis ilerleyişini yavaşlatmak amacıyla tedavi hedefleri saptamayı ümit eden çabalar gösterilmeli ve bunun için ilk olarak fibrozisin meydana geldiği merkezi yer anlaşılmalıdır (8).

Normal karaciğer parankimi; epitelyal bir bileşim (hepatosit), endotelin üst tabakası (porlarla oluşmuş sakin bir tabaka), doku makrofajları ve stellat hücre adı verilen perivasküler mezenşimal hücreleri içerir. Stellat hücreler karaciğer fibrozisinde anahtar rolü gören fibrojenik hücrelerdir. Karaciğerin hücresel elementleri, sinozoid ya da

mikrovasküler birimin içinde ve epitelyumu (hepatositler) sinüzoidal endotelyumdan ayıran subendotelyal disse aralığında organize olurlar (8).

Normal karaciğerin disse aralığı membran benzeri bir matriks içerir. Ancak membrana benzeyen bu matriks yoğun elektron içermez. Normal subendotelyal ekstrasellüler matriks (ECM) karaciğerde bulunan tüm hücrelerin farklılaşmış olan fonksiyonlarını sürdürebilmesi için gereklidir. Suni karaciğer dokusunun gelişmesi için de ECM gereklidir (9).

Karaciğerde fibrozis meydana gelirken karaciğer ECM bileşenlerinde nitelik ve nicelik bakımından değişiklikler görülür. Kollajenlerin ve kollajen dışındaki bileşenlerin toplam miktarında 3 - 5 kat artış olur. Subendotel aralıkta normal düşük yoğunluktaki matriksten kollajen fibrilleri içeren interstisyel tip matrikse doğru ECM' de hafif bir değişim buna eşlik eder (8).



Resim 2. Karaciğer hasarında meydana gelen fibrozis süresince gelişen sinüzoidal olaylar (8).

Resim 2’de hücrel cevaplar ve ECM’ deki değişiklikleri kapsayan karaciğer hasarının cevabı; Disse’nin subendotelyal aralığı ve sinozoidde oluşan değişimler sonucu fibrozis gelişimi görülmektedir. Stellat hücrelerin aktivasyonu matrikste skar birikimine yol açar. Biriken skar hepatositlerin (aynı zamanda mikrovillusların kaybı) ve sinozoidal endotel porların kaybına neden olur. Mikrovillus ve por kaybı hepatik fonksiyonların bozulmasıyla sonuçlanır. Kupffer hücre aktivasyonu karaciğer hasarına eşlik eder ve stellat hücrelerin parakrin aktivasyonuna katkıda bulunur (8).

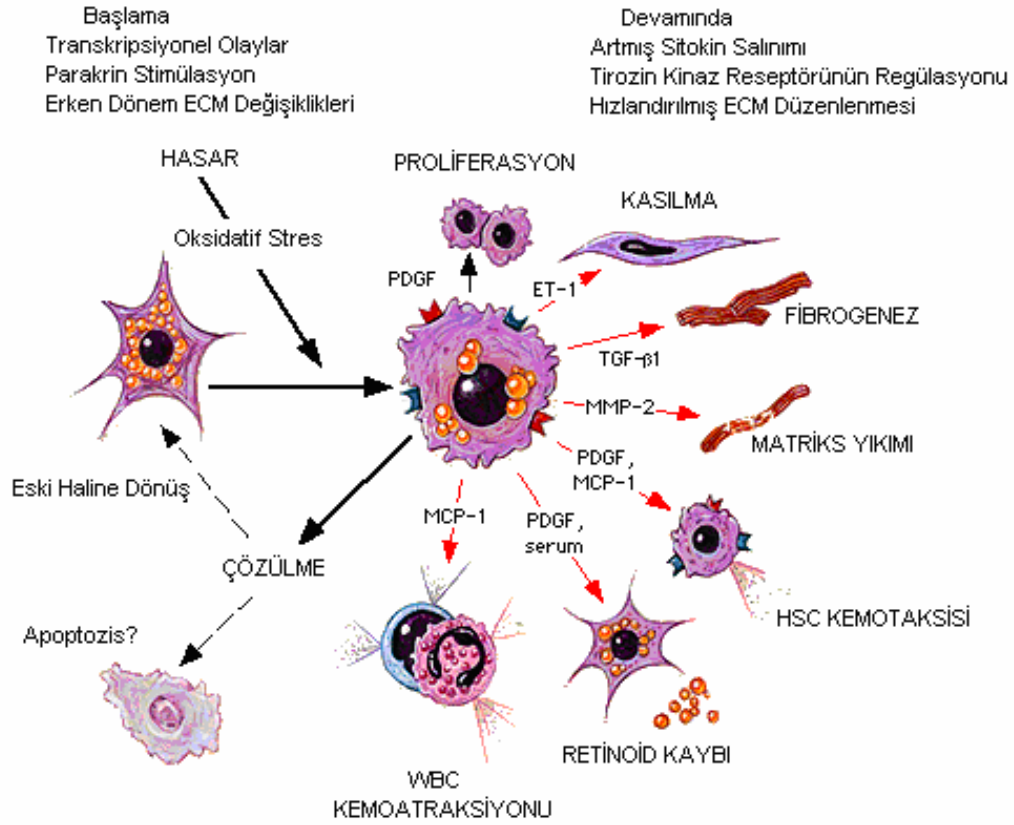
2.3.1. Hepatik Yıldız Hücreler: Karaciğerin Temel Fibrojenik Hücre Tipi

HSC, fonksiyonel ve anatomik olarak benzer bir grup heterojen hücrelerinden meydana getirir. Ama bu heterojen hücrelerin hücre iskelet filamentlerinin ekspresyonu, retinoid miktarı ve ECM üretim potansiyelleri farklıdır (10).

HSC ‘nin embriyolojik orijini (kökeni) ilginçtir. HSC ‘nin nöral kökenli olduğuna dair kanıt vardır. Çünkü HSC asidik proteinler olan glial fibrilleri ve netsini eksprese eder (11).

2.3.2 HSC’ nin Aktivasyonu: Doku Hasarına Karşı Titizlikle Oluşturulan Cevap

Etiyolojisi ne olursa olsun karaciğer hasarında, stellat hücreler aktivasyon olarak bilinen bir cevaba maruz kalırlar. HSC aktivasyonu, sesiz, dinlenme halindeki HSC’ nin proliferatif, fibrojenik ve kontraktıl miyofibroblastlara dönüşümünü ifade eder. HSC aktivasyonunda proliferasyon (çoğalma) sırasında meydana gelen cevabın sıkı sıkıya programlanmış olması dikkate değerdir (8).



Şekil 1. Karaciğer hasarı boyunca aktif HSC' nin fenotipik özellikleri ve çözülmesi (8).

HSC karaciğer hasarının devamında aktivasyona maruz kalır. Vitamin A bakımından zengin sessiz, dinlenme halindeki HSC proliferatif, fibrojenik ve kontraktıl miyofibroblast forma dönüşür. HSC aktivasyonundan sonraki büyük fenotipik değişimler; HSC proliferasyonu, HSC kasılması, fibrozis oluşumu, matriks yıkımı, kemotaksis, retinoid kaybı ve beyaz kan hücreleri (WBC, akyuvarlar)' nin kemoatraksiyonudur. Bu değişimlere sebep olan mediyatörler (oksidatif stres mediyatörleri, PDGF, TGF- β 1 gibi) Şekil 1'de gösterilmiştir.

Karaciğer hasarının çözülmesi sürecinde aktif HSC' nin durumu belirsizdir ama çözülmenin sebebi aktif HSC' nin tekrar sessiz, dinlenme halindeki fenotipine dönüşmesi ya da apoptozisin ECM birikimini özel olarak açmasıdır (8).

HSC aktivasyonu başlangıç (initiation) ve devam (perpetuation) dönemi olmak üzere birbirini takip eden iki olayla organize olur (8).

2.3.3. Başlangıç (Initiation) Dönemi: Parakrin Uyarılma ve Hücresel Cevapların Kaskadı Olan Transkripsiyonel Olaylar Başlar

HSC aktivasyonunu başlatan uyarı hasarlanmış hepatositler, komşu endotel hücreler ve Kupffer hücrelerden kaynaklanır (8).

Hepatositler ve kupffer hücreleri, reaktif oksijen intermediyatörleri (ROI) nin güçlü kaynağıdır (12). Bu bileşikler HSC' nin parakrin olarak uyarılmasını sağlar. Hasarlı karaciğerde HSC aktivasyonu, in vivo antioksidan azalmasına bağlı olarak artar. Kültüre alınmış HSC' de, oksidatif strese maruz kalan hepatositlerde proliferasyon ve kollajen sentezi artar (13). HSC' de ROI oluşturan sitokrom p450 2E1 enziminin artmış ekspresyonu ve kollajen I gen ekspresyonunu uyaran bu etki antioksidanlar ile azaltılabilir (14).

Endotelial hücreler erken dönem HSC aktivasyonunda iki şekilde rol oynar: Sinozoidal endotel hücrelerin hasarı HSC' yi aktive eden hücresel fibronektinin bir çeşidi olan EIIIA izoformu' nun üretimini uyarır (15).

Buna ek olarak endotelial hücreler plazmin aktivasyonu için latent TGF- β 1' i aktif fibrojenik forma dönüştürürler (16).

2.3.4. Devam (Perpetuation) Dönemi: Sitokin Aktivitesi ve Stellat Hücrelerin Aktif Fenotipini Devam Ettiren ECM Düzenlenmesi

Stellat hücre aktivasyonunun devam dönemi, artmış sitokin etkilerini ve ECM' nin düzenlenmesi aracılığı ile fenotipik cevapları gerektirir. Çeşitli ve çok sayıda mekanizma sayesinde yükselmiş sitokin cevapları oluşur. Bunlar arasında hücre membranı reseptörlerinin artmış ekspresyonu ve yükselmiş sinyal oluşumu özellikle önemlidir (16). Bilhassa birçok stellat hücre cevabına yol açan sitokinelere karşı tirozin kinaz reseptörleri genel olarak hasar süresince yeniden düzenlenir (17).

Bu faz süresince devam eden ECM düzenlenmesi, devam eden karaciğer hasarıyla karakterize tüm hücresel cevapların temelini oluşturur. Düşük yoğunluklu subendotelial matriks bu süreçte kollajen fibriller ile zengin matrikse dönüşür. ECM bileşimindeki bu esaslı değişim hepatositlerin, sinozoidal endotelin ve stellat hücrelerin davranışını etkiler ve değiştirir (8).

Fibril içeren ECM aynı zamanda stellat hücre aktivasyonunu artırır. Bu etkiler sadece integrinler ve ECM reseptörlerinin etkileşimiyle değil, aynı zamanda en az bir tirozin kinaz reseptörü (RTK)'nün bağlanması ile gerçekleşir. Çeşitli integrinler ve integrin efektörleri $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$ ve $\alpha_6\beta_4$ reseptörlerini taşıyan stellat hücrelerde tanınırlar (18).

Tirozin kinaz reseptörlerinin bir alt ailesi olan discoidin domain reseptörleri (DDRs), diğer tirozin kinaz reseptörlerinden farklı olarak, büyüme faktörlerinden çok kollajen fibrillere cevapta etkilidir (19). Discoidin domain reseptörü-2 (DDR2) mRNA' sını tanıyan stellat hücrelerin karaciğerde matriks hücre etkileşimine girmesi, sinozoidal fibrozis süresince özellikle tip I kollajen içeren matriksin stellat hücre aktivasyonunu neden artırdığı bu yolla açıklanabilir (17). Stellat hücre aktivasyonu DDR2 reseptörünün kollajene bağlanmasıyla başlatılabilir. Böylece subendotelyal membran kollajen fibrilleriyle yeniden şekillenebilir (19).

2.3.5. Aktif Stellat Hücrelerin Fenotipik Cevapları

Karaciğer hasarının devamına karşı oluşan genel cevapta, HSC' yi aktive eden ve HSC' ye ait farklı fenotipik cevapları meydana geliş sırasına göre şöyle sıralayabiliriz:

- (a) Proliferasyon (Çoğalma)
- (b) Kasılma (Kontraksiyon)
- (c) Fibrozis oluşumu (Fibrogenesis)
- (d) Matriks yıkımı (Degredasyonu)
- (e) Stellat hücre kemotaksisi
- (f) Retinoid kaybı
- (g) Sitokin serbestlenmesi ve beyaz kan hücrelerinin kemoatraksiyonu (8).

(a) Proliferasyon

Hasarlanmış karaciğerde tirozin kinaz reseptörüne sinyal oluşturan birçok polipeptid yapıdaki büyüme faktörlerine karşı oluşan cevapta stellat hücreler proliferasyona uğrar ve stellat hücre sayısı artar. En çok bilinen Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF), karaciğer fibrozisindeki proliferatif faktörlerin en güçlüsüdür. Hasar PDGF' nin otokrin artışı ve PDGF reseptörünün düzenlenmesi (up-regulation) ndeki artış ile ilişkilendirilir (18).

ERK / mitozu aktive eden protein kinaz yolunun aktivasyonunu takiben aktif PDGF reseptörü Ras molekülünün sinyalini alır. ERK aktivasyonundan bağımsız olarak genelde fosfoinositol 3-kinaz' ın aktivasyonu da mitoz oluşumu ve kemotaksis için gereklidir (20).

PDGF' ye karşı proliferatif bir cevabın oluşabilmesi için hücre dışındaki (ekstrasellüler) Ca^{2+} un hücre içine alınması ve hücre içi (intraseellüler) pH' nın artmış olması gerekir (18).

(b) Kasılma (Kontraksiyon)

Aktif stellat hücrelerin kasılması, karaciğer hasarında artmış portal dirence maruz kalan önemli bir mekanizmayı temsil eder. Stellat hücreleri kasılması için uyaran esas uyarı, otokrin kaynaklı endotelin-1 (ET-1)' dir . ET -1; güçlü kasılma etkisine ek olarak aynı zamanda stellat hücre proliferasyonunu da düzenler (21).

(c) Fibrozis Oluşumu (Fibrogenesis)

TGF- β 1 stellat hücrelerde ECM sentezini uyaran başlıca uyarandır (16). TGF- β 1 deneysel oluşturulan fibrozis ve insan hepatik fibrozisinde artar. Bunun birçok kaynağı vardır ama en önemlisi otokrin ekspresyonudur (22). TGF- β 1' in sinyal oluşumu için tip I ve tip II reseptörlerine bağlanması gerekir. Ancak HSC aktivasyon sürecinde tip II mRNA' sı azalır (16).

(d) Matiks Degredasyonu

Karaciğer hasarında hepatik ECM' nin yeniden düzenlenmesine neden olan matriks proteaz aktivitesindeki değişimler, doğrudan ve dolaylı olarak HSC aktivasyonu ile ilişkilidir. Stellat hücreler matriks degradasyonunu gerektiren hemen hemen tüm anahtar bileşenleri eksprese eder (10).

Stellat hücreler normal subendotelyal ECM' yi yıkan metalloproteinaz-2 (MMP-2)' nin kaynağıdır (23).

Normal subendotelyal ECM' nin yıkımı kollajen fibrillerin matrikse yeniden yerleşmesi sonucu hızlanır. Kollajen fibriller pozitif feed back (geri bildirim) mekanizması ile stellat hücre büyümesini ve MMP-2 sentezini ileri düzeyde aktive eder (24).

(e) Stellat Hücre Kemotaksisi

Aktif stellat hücreler hasarlı alana doğru göç ederek bölgede birikirler. PDGF ve monosit kemotaktik protein -1 (MCP-1) aktif stelat hücrelerin kemoatraktanları olarak tanımlanırlar ama bu moleküller sessiz, dinlenme halindeki HSC' de görev yapmazlar (20).

(f) Retinoid Kaybı

Stellat hücre aktivasyonunun en belirgin özelliği hücre içi vitamin A kaybıdır. Ancak stellat hücrelerin aktivasyonu için retinoid kaybının gerekli olup olmadığı ve retinoidlerin

in vivo stellat hücre aktivasyonunu hızlandırabileceği ya da engelleyebileceği bilinmemektedir (8).

(g) Sitokin Serbestlenmesi ve Lökosit Kemoatraksiyonu

Artmış sitokin sentezi ve aktivitesi, HSC aktivasyonunun devamı için önemlidir. Stellat hücre aktivasyonunun hemen hemen tüm özellikleri otokrin sitokinlerle ilişkili olabilir (16).

Karaciğer ekstrasellüler matriksi büyüme faktörlerinin yer aldığı önemli bir bölgedir (16). Stellat hücreler nötrofil ve monosit kemoatraktanların serbestlenmesiyle inflamasyonu artırabilir. İnflamatuar kemokinler; koloni uyaran faktör ve MCP-1' dir (25).

2.3.6. Karaciğer Fibrozisinin Çözülmesi ve Aktif Stellat Hücrelerin Sonu

İnsanda ve deneysel olarak akut oluşturulmuş karaciğer hasarından iyileşme sürecine kadar doku bütünlüğünün yeniden oluşması için aktif HSC miktarı azalmaktadır. Bunun nedeni dönüşüm (reversion) ya da apoptozise yönelim olabilir. Aktif stellat hücrelerin dinlenme halindeki formuna dönüşüp dönüşmediği henüz aydınlatılamamıştır. Bu cevabı kontrol edebilen uyarı interlökin-10 (IL-10) olabilir. Bu da HSC aktivasyonu sürecinde oluşur, inflamasyonu düzenler ve interstisyel kollajenaz aktivitesini artırır (26).

Aktif HSC' nin potansiyel sonu, apoptozistir (27). HSC apoptozisi, deneysel oluşturulan karaciğer hasarının iyileşme fazında rapor edilen azalmış TIMP-1 ekspresyonu ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (28). Stellat hücreler spontan aktivasyonları süresince CD95 L (Fas ligandı), Bcl-2 ve p53' ün artmış ekspresyonuna paralel olarak apoptozise maruz kalırlar (27).

Stellat hücrelerde sadece özel hücre şekli değil, gen ifadesi ve protein sentezi de düzenlenir. Mediyatörlerin etkileri, hücresel aktivasyonunun farklı durumlarında farklılaşır. Hücresel aktivasyonda geç dönem karaciğer hasarına karşın erken dönemde farklı yolların bu mekanizmaya katılması olasıdır. Karmaşık hücresel olayların nasıl bütünleştiğiyle ilgili en muhtemel fikir farklı bir biyolojik mekanizma sonucu doku hasarının "skar" ile çevrelenmesidir (8).

Hepatik fibröz; kronik yarayla ve hücre dışı matriks bileşiminin aşırı derecede üretimi ve birikmesi ile karakterize edilen yaraların iyileşme sürecidir. (29). **Yara iyileşme** terimi, normal yapıya dönüşüm sürecini akla getirir. Yara iyileşmesi, bazı zamanlarda skar oluşumuyla birlikte, temelde derinin bütünlüğünü sağlamak için gereklidir. Oluşan skarlar, komplike kutanöz yaralarda gerilime destek vermek amacıyla gereklidir. İyileşmenin

bahsedilen sistemini kullanan internal epitelyum için de aynı durum geçerlidir. Fibrozis sonucu skar oluşumu, kronik karaciğer hastalıkları ve çeşitli epitelyum patolojisinde temel olarak gerçekleşir (30).

Skarın ilerlemiş safhasında karaciğer sirozundan bahsedilir. Karaciğer sirozu, düzensiz büyüme ve kanserle yakından ilişkilidir. Bu sebeple sirozun hücresel temeli ve düzenlenmesinin anlaşılması güncel, ilginç bir konudur. Skar oluşumu tüm epitellerde temelde aynı süreci mi temsil eder? Bu bakış açısı, karaciğer, akciğer, böbrekte deri oluşumunu sağlayan skar oluşum sürecinin benzerlik göstermesi nedeniyle geliştirilmiştir (30).

Yara iyileşmesi genel olarak, endotelyum, makrofaj ve perisitleri içeren mezenşimal alanda gerçekleşir. Hasarın uyarılması ile yıldız hücreler bir değişikliğe uğrar: HSC aktivasyonu. HSC'nin karmaşık doğasına ek olarak hızlıca dikkate değer bir aktivasyon görülür. Hasara karşı oluşan hücresel cevabın başında ECM'nin en önemli kaynağını ortaya çıkaran başlıca hücreler miyofibroblastlardır. Yapılan bir çalışma sinozoidal endotelyal hücrelerin iyileşme cevabının başlangıç adımına katıldığını bildirmektedir. ECM proteinazların diğer bir kaynağı da Kupffer hücreleridir. Proteinazlar iyileşmenin gelişmesi ve ECM'nin modifiye edilmesi için erken dönemde faaliyet gösterebilir. Aynı zamanda proteinazlar geç dönemde ECM'nin normal yapısına döndürülmesi için de başlıca rol alır (30).

Başarılı bir iyileşme için hücresel cevapların koordinasyonu ve zamanlaması önemlidir.

2.3.7. Fibrogenезisin Dönemleri

Hasara karşı cevapta kısmen birbirini takip eden dönemler görülür:

- (a) Lökosit, platelet ve 'miyofibroblastlar'dan ibaret olan hücresel infiltratın birikimi.
- (b) Bölgesel ECM'nin değişimi
- (c) Anjiyogenez ve epitelyum proliferasyonunun ardından miyofibroblastların yara alanına göçü ve hizalanması
- (d) Yaranın kapanmasının ardından kontraksiyon
- (e) Fibrozisi geriye döndüren artmış ECM'nin çözülmesi ve miyofibroblastların azalması.

Bu adımların her biri dinamik olup, başarılı bir iyileşme ile geriye döndürülebilir. Çünkü miyofibroblastlar bu adımların her birinde ayrı ayrı önemli rol oynar (30).

(a) Hücresel infiltrat

Hücresel infiltrat çoğunlukla lökosit ve plateletleri kapsar. İnfiltratın özel bileşimi hasarın tipine göre değişiklik gösterir. İnfiltrat akut viral hepatitte mononüklear hücrelerden, ilaçla oluşturulan hasarda ise önemli miktarda plazma hücreleri ve eozinofillerden, alkolle ilişkili akut hepatitte ise başlıca nötrofillerden oluşur (31).

Bu inflamatuvar hücrelerin tümü, güçlü şekilde sitokin serbestler ya da yara iyileşme sürecinin hücresel fazını ilerleten sitokinleri ortaya çıkarmak için hasar bölgesindeki hücrelerle (sinuzoidal epitelyum hücreleri ve yıldız hücrelerin aktivasyonu gibi) etkileşime girerler. Sinyal moleküllerinin diğer tipleri inflamatuvar hücreler ve Kupffer hücrelerinden salınan oksijen radikalleridir (32).

Sitokinler, saf ve rekombinant proteinler üzerinden biyolojik cevapları modifiye eden ve çeşitli gruplardan oluşan geniş bir sınıftır. İzole edilen sitokinler üzerinde yapılan bir in vitro çalışmada, sitokinler profibrojenik ya da antifibrojenik olarak nitelendirilmiştir. TGF- β bu noktada önemli bir sitokindir. Bu faktör genel olarak profibrojenik olarak kabul edilir, çünkü TGF- β doğrudan endotel hücreler ve HSC 'nin ECM üretimini uyarır ve fibrozise sebep olur. Hücresel immün cevabı baskılamaktadır (33).

TGF- β 'nın oluşumu fibrozis hasarında HSC'nin sitokin üretimini artırmasıyla uygunluk gösterir (34).

Yara iyileşme sürecinin başlangıç fazında çeşitli sorunlar ortaya çıkar. Hasar alanındaki yerleşik inflamatuvar hücrelerden sorumlu mekanizma dışında başka olaylara da gerek vardır. Mekanizmayı başlatan doku hücreleriyle ilişkili olmasına rağmen, inflamatuvar infiltrat tarafından oluşturulan sitokin ekspresyonunun profili genelde bilinmemektedir. İnfiltrattaki çeşitli hücrelerle (nötrofiller gibi) sitokin ekspresyonu olsa da olmasa da hatta oluşabilecek sitokin ekspresyonu, fibrojenik cevabın hızını ve önemini etkilese de etkilemese de bu profilin oluştuğu bilgisi ilginç ve önemlidir (30).

(b) Bölgesel ECM' deki Değişmeler

Aktif HSC (miyofibroblastlar) yaranın olduğu bölgede ECM miktarını artıran en önemli kaynaktır. Eğer inflamatuvar hücrelerin bir grubu ECM'yi çok az sentezler ya da hiç sentezlemezse tahminen ECM üretimi HSC ile gerçekleşir. Üstelik aktif HSC tüm süreçte diğer hücre tiplerinin rolünü engeller (35).

Fibriler kollajenin karaciğer ve birçok dokuda tipI ve tipIII kollajenleri oluşturduğu bilinir. Stellat hücreler tarafından mRNA ifadesi ile sonuçlanan ECM sentezi, yara iyileşme sürecinin erken fazında diğer değişikliklere maruz kalır. Örneğin, fibriler

kollajenlerden başlıca tipI kollajen miktarı artış göstermesine karşın fibriler kollajenler tipIII kollajen de içerir (36). Üstelik tipIII kollajenin tümü delesyona uğramış bir farenin gerilme gücü ve stabilitesi yoktur (37).

Yara iyileşmesinde ECM'nin yeniden düzenlenmesi ile ilgili olarak ECM degradasyonu (Yıldız hücreleri anti- aktive eden faktörler) da ECM düzenlenmesi (Yıldız hücreleri pro- aktive eden faktörler) kadar önemlidir. Hasarın erken fazı boyunca artmış proteinaz aktivitesi vardır. Kültüre alınmış hepatik perisinözoidal hücreler tarafından kollajenaz ve jelatinaz salgılır (38). İnflamatuar hücreler de ECM proteinazlarının önemli ve güçlü bir kaynağıdır (39).

Tablo1. Yıldız Hücre Aktivasyonunu Düzenleyen Faktörler

Yıldız Hücre Aktivasyonunu Düzenleyen Faktörler	
Anti- aktive eden faktörler	Pro- aktive eden faktörler
Dekörin ⁴⁰	Transforme olan büyüme faktörü β ³⁴
İnterferon γ ⁴¹	Platelet aktive eden faktör ⁴⁵
İntersitisyel kollajen EDA-fibronektin ³⁵	ECM' nin temel membranı ⁴⁶
Prostaglandinler ⁴²	İnterlökin 1 ⁴⁷
Retinoidler (?) ⁴³	Endotelinler ⁴⁸
Antioksidanlar (?) ⁴⁴	Prooksidanlar ³²

(c) Göç, Anjiyogenez ve Karaciğer Proliferasyonu

Lokalize hasara erken cevap, aktif HSC (miyofibroblast)'nin hasar alanına göçü ile karakterizedir. Hasar aynı zamanda mezenşimal ve epitelyal alanda hücre proliferasyonunu başlatır. PDGF'nin hasarın erken cevabında yıldız hücrelerdeki PDGF reseptörünün ekspresyonunda önemli bir rol oynar (49).

Karaciğer hasarında iki tip anjiyogenez görülür:

- (1) Hasar, kısmi (parsiyal) hepatektomide olduğu gibi zamanında sınırlandırılırsa normal sinuzoid proliferatlarının endotelyuma doğru düzensiz ağsı yapılanması söz konusudur.

- (2) Hasar kronik ise fibroze neden olur. Ancak endotelyumun yanında bulunan lifli yollar düzensiz ve ağsı değildir, periferel vasküler endotelyuma benzerdir.

En son değışiklik, normal sinozoidal endoteliyal hücrelerin fenotipik transformasyonu ve hasar alanında geniş damar endotelyumunun yeni yeni oluşmasıdır. Bu durum anjiyogenez olarak tanımlanır ve anjiyogenez skar oluşum sürecinde görülen portal hipertansiyon ve intrahepatik şantlarla ilişkilidir (50).

Yara iyileşmenin mezenşimal olayları epitelyal proliferasyon için hazırlık oluşturur. Hasar sistemli bir epitelyum geri büyümesi ve normal hepatik yapıya tekrar dönüşümü ile karakterizedir. Hepatositlerin morfogenezi hepatosit proliferasyonunu açıklamak için yetersiz kalır. Kültür modelleri ile ECM'nin hepatositlerdeki DNA replikasyonu için önemli bir regülatör olduğunu göstermektedir (51).

(d) Kontraksiyon ve Yaranın Kapanması

Miyofibroblast terimi, miyositlere (düz kas hücreleri) ve fibroblast fenotipine dönüşebilen hücreyi ifade eder. Miyofibroblastlar, kutanöz yaraların kapanmasına morfolojik olarak katılırlar. Karaciğer hasarında ise, normal kasılamayan HSC'nin kasılabilen aktif HSC'ye dönüşmektedir (52). Gerçekten de bu değışikliğin hızı dikkat çekicidir ve HSC'nin in situ (hücre içi) kasılabilme yeteneği kazanabileceği fikrini uyandırmaktadır. Aslında HSC endotelin benzeri bir yapıdır ve sinozoidal kan akımını hafifçe değıştirebilir. Kronik hasarda aktif HSC fibrotik yollara yerleşir ve HSC kontraksiyonu lobüler yapının bozulmasına ve portal hipertansiyona katkıda bulunur. Aktif HSC'nin bu etkileri sebebiyle, HSC'nin kasılabilme yeteneği terapotik müdahaleler için çarpıcı bir hedeftir. Yıldız hücreler endotelin reseptörlerine bağlanır (53) ve HSC'nin kültürdeki kasılabilme yeteneği endotelin reseptör antagonistleri tarafından engellenir (54).

(e) Fibrozisin Dönüşebilirliği: Hasarlı Dokunun Normal Yapıya Yeniden Dönüşü

Fibrozis süresince ortaya çıkan ECM proteinaz aktivasyonundaki yetersizlik sebebiyle hasarlı karaciğer dokusunun normal yapıya yeniden dönüştürülmesi çok kolay değildir. Ancak fibrojenik uyarılma engellenebilirse aktif HSC miktarı azalır ve bu yolla HSC aktivasyonu yavaşlar. Mevcut proteinazların etkisiyle fibrozis geriye döndürülebilir (38).

Eğer fibrozis siroz safhasına ilerlemiş ise fibrozisin geriye dönüşümsüz olduğuna inanılır. İnsan karaciğer hastalıklarıyla ilgili çalışmalar bazı istisnalar dışında bu düşüncüyü desteklemektedir (55).

2.3.8. Fibrozisin Teşhisi

Fibrozisin değerlendirilmesinde geleneksel bir metot olan, şırınga iğnesi ile biyopsi örneği alınmaktadır. Alınan çeşitli örnekler birbiriyle uyumlu olmasa dahi biyopsi metodu hala fibrozisin büyüklüğü ve siroz olasılığı (ECM'deki hepatosit nodüllerin varlığı geç dönemde siroz olasılığını artırır) hakkında tam bilgi sağlar. Fibrojenik aktivite, inflamatuvar infiltrat ve nekroza uğramış hepatositlerin varlığından yola çıkarak dolaylı yoldan tahminler yapılabilir (30).

2.3.9. Tedaviye Yönelik Stratejiler

Fibrogenesis, yara iyileşme cevabının özel bileşenleri olan kollajenler ile oluşur. Artmış kollajen hepatik fibrozisin bariz özelliği olmasına karşın, kollajen artışının inhibisyonu sadece hepatik fibrozisin güvenliği ile alakalıdır. Çünkü normal dokunun yapısında da kollajen temel ve yaygın olarak bulunur. Hasar cevabına mahsus olaylarda merkezi bölgede başlayan yaygın stratejiler geliştirilir. Ajanlar, hasarlanmış bölgeyi sınırlayan olayları hedefler ve sadece karaciğerde değil, genel olarak bütün dokularda patolojik fibrozis için kullanışlı olabilirler (30).

Stellat hücre aktivasyonunu doğrudan düzenleyen yeni antifibrotik ajanlar geliştirilmektedir. Keşfedilen bu ajanların HSC aktivasyonu sürecinde nükleus çevresinde etkili oldukları kabul edilmektedir (30). İnterferon- γ bu ajanlardan biridir (52). Diğer safironil grubundan türetilen piridin dekarboksilat' tır. Piridin dekarboksilat kollajenin stabil trimerik formunu koruyan prolil-4-hidroksilaz' ın yarışmalı inhibitörü olarak işlev görür. Buna rağmen safironil ile yapılan çalışmalarda safironilinin prolil-4-hidroksilaz üzerindeki etkisi bulunamamış; ancak az da olsa stellat hücre aktivasyonu üzerindeki etkisi bilinmektedir (56).

Yapılan çalışmalarda erkek ve dişi sıçanların ajanlara karşı cevaplarında önemli farklılıklar görülmüş ve bu farklılıklar daha sonra kültüre alınmış erkek ve dişi izole yıldız hücrelerde kanıtlanmıştır. Dişilerden çok erkek sıçanlarda daha hızlı fibrozis ve sonrasında siroz, sirozun komplikasyonları olan hepatosellüler karsinom görülmesi gibi nedenlerle tedavinin etkinliği için erkek ve dişilerde farklı antifibrotik ajanların tasarlanması gerektiğini göstermiştir (30).

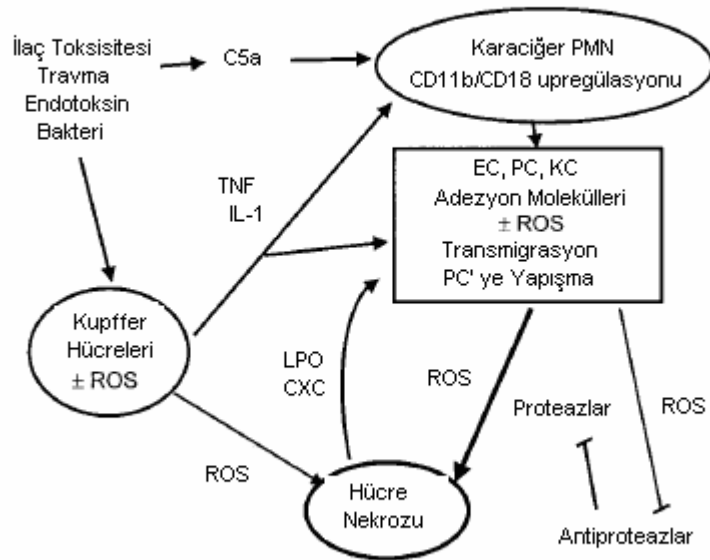
Kontraksiyonun dinamik bir süreç olması sebebiyle tedavide kontraktil antagonistlerin kullanımı daha cazip bir yöntemdir. Kontraktil antagonistleri kullanılarak artmış intrahepatik basınç geriye döndürülebilir. Böylece varis kanamaları gibi komplikasyon riskleri azaltılabilir. İstenmeyen sistemik etkileri de düşünülerek antagonist seçiminin daha dikkatli yapılması gerekir (30).

2.3.10. İnflamatuvar Karaciğer Hasarında Adezyon Molekülleri Ve Oksidan Stres

Son10 yılda yapılan çalışmalar inflamatuvar karaciğer hasarının patofizyolojisinde nötrofillerin rolünün olduğunu ve nötrofillerden kaynaklanan sitotoksikite ile alakalı birçok özelliğin diğer mononükleer hücrelere de uyganabileceğini gösterdi (57).

Nötrofiller TNF- α , IL-1, komplement faktörler, platelet aktive eden faktör ve CXC kemokinleri kapsayan inflamatuvar mediyatörlere maruz kalabilir. Bu mediyatörlerin her biri nötrofillerde β_2 integrinlerini upregüle eder. Genel olarak nötrofiller sinozoidlerde birikir fakat hücresel adezyon moleküllerine (CAMs) bağlanmazlar. Nötrofillerin sitoplazmasındaki değişiklikler sebebiyle adezyon moleküllerinin yakalanması sonucu, sinozoidlerde vazokontrüksiyon aktive olur ve sinozoidal hücreler şişer (58). Buna rağmen endotelial hücreler adezyon moleküllerinin sıkı bir şekilde bağlanmasından sonra hücresel adezyon moleküllerinden ICAM-1 ve VCAM-1 hepatositlere doğru göç eder ve hepatositlere bağlanırlar (59). CAM' lar farklı şekilde eksprese olurlar ve tüm karaciğer hücre tiplerinde sitokin indükleyicisidirler (58). Lökositlerdeki β_2 -(CD18)-integrin ailesinin üyeleri nötrofil kaynaklı oluşan hasarda önemlidir (60). LFA-1 (CD11a/CD18) ve Mac-1 (CD11b/CD18) transmigrasyon ve hepatositlerdeki adezyon olayında gereklidir (61). Mac-1' in upregülasyonu nötrofil sitotoksitesisi için ilk gerekli mekanizmadır (60). Mac-1' in proteaz serbestlemesi ve reaktif oksijen oluşumunu sürdürmesi ile nötrofiller hedef hücrelere bağlanır. Nötrofiller sinozoidlerde iken nadiren sitotoksiktir, doku hasarına sebep olabilmeleri için subsinozoidal bölgeye göç etmeleri gerekir (62). Nötrofillerin göçü ve hareketi için kemotaktik bir sinyale gerek vardır. Hepatositlerde oluşan CXC kemokinleri nötrofillerle oluşan hasarı başlatabilirler (63). Ayrıca lipid peroksidasyon ürünleri de oldukça kemotaktik özelliğe sahiptir ve hasarın başlaması ile hızlanmasından sorumlu olabilirler (64, 65). Hepatositlerin apoptotik hücre ölümü de nötrofil ekstravazasyonu ve endotoksin kaynaklı hasarın ilerlemesi için güçlü bir uyarı olarak bilinir (66). İnsan alkolik hepatitinde apoptotik hepatositler nötrofillerle kolokalize olurlar ve bu durum doku hasarının ciddiyetine göre güçlü bir korelasyon gösterir (67).

Nötrofil kaynaklı hepatotoksitenin anlaşılmasına karşın hücre ölümünün moleküler mekanizması tartışmalıdır (68). Nötrofil-hepatosit kokültürleri hazırlanarak yapılan in vitro çalışmalarda hücre hasarının önemli mediyatörleri olan proteazlar tanımlandı. Çalışmaların sonucuna göre proteaz inhibitörleri in vivo nötrofil aktivitesini azaltırlar (61). Nötrofil kaynaklı reaktif oksijen türlerinin bir saatten daha az sürede nekrotik karaciğer hasarını başlatan hepatositlerdeki intrasellüler oksidan stresi başlatabileceğini gösterdi (69). Hasarın mekanizması önemli derecede lipid peroksidasyonunu gerektirmez, ama lipid peroksidasyonu membran geçirgenliği için porların açılmasına ve mitokondrial membran potansiyelinin ani düşüşüne neden olur (70). Reaktif oksijen türleri hücre hasarına sebep olmakla birlikte sitokin, kemokin ve adezyon moleküllerinin oluşumunu kontrol eden NF- κ B aktivasyonunu artırmak suretiyle inflamasyonu başlatır (68).



Şekil 2. Nötrofil ile oluşan karaciğer hasarının mekanizması (57).

Yukarıdaki şekilde doku travması, endotoksin ve bakteri gibi uyarıcılar komplement faktörler (C5a), sitokinler (TNF- α , IL-1) ve CXC kemokinleri gibi inflamatuvar mediyatörlerin oluşumunu tetiklerler. Bu faktörlerin her biri ROS oluşumu için ilk olarak nötrofillerde β_2 integrini (CD11b/CD18)' nin ekspresyonunu düzenleyebilir (upregulation). C5a ROS serbestlemesi için Kupffer hücrelerini (KC) uyarır. Sitokinler endotelial hücreler (EC) ve hepatositlerde (PC) adezyon moleküllerin ifadesini aktive eder. Nötrofiller ilk olarak parankimden kemotaktik bir sinyal alırsa hepatositlere doğru

göç eder ve yapışırlar. Nötrofillerin aktivasyonu son olarak hücre nekrozuna sebep olan proteaz serbestlenmesi (degranülasyon) ve oksidan stres bağımlı yapışmaya yol açar. Lipid peroksidasyon ürünleri (LPO) gibi hücre hasarı süresince oluşan mediyatörler ve kemokinler nötrofil aktivasyonu ve transmigrasyonun daha ilerisi için kemotaktik sinyaller oluştururlar (57).

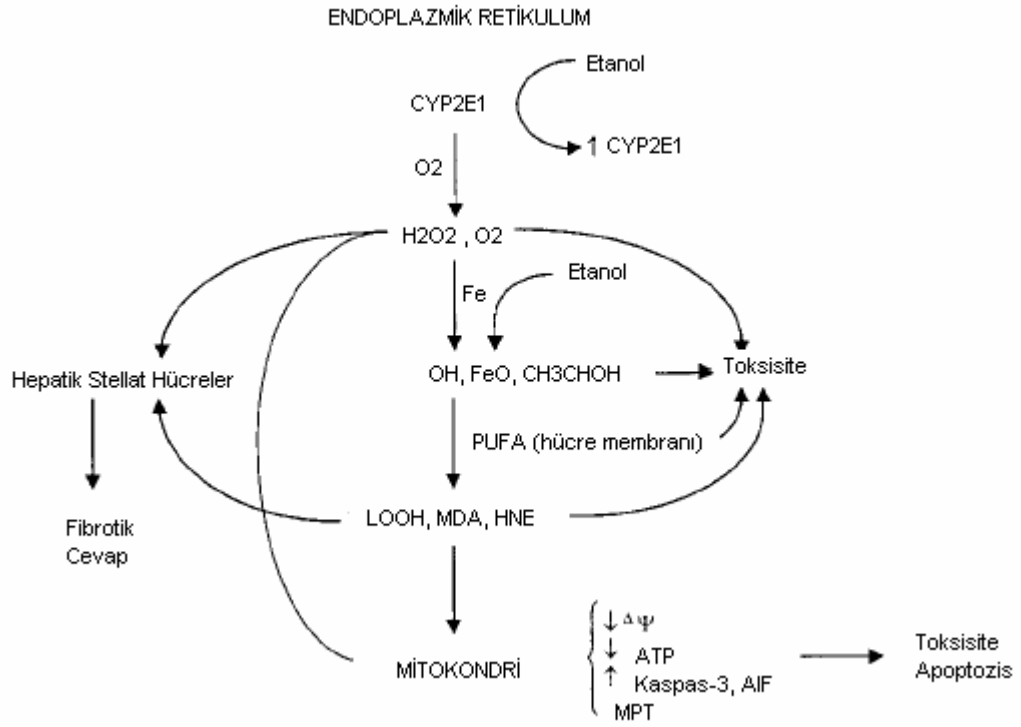
İlaç toksisitesi, doku travması, iskemi/reperfüzyon, sepsis ve diğer patofizyolojik olaylar nötrofilleri ve kupffer hücreleri doğrudan ya da komplemen aktivasyonu aracılığıyla aktive eder. Kupffer hücreleri reaktif oksijen türleri gibi sitotoksik mediyatörleri ya da sitokinler ve kemokinler gibi proinflamatuvar mediyatörleri serbestler. C5a gibi komplement faktörler ve sitokinler; nötrofilleri hepatik damar sistemine katmak için aktive ederler. Kemotaktik uyarılma sonucu nötrofiller ekstrasvazate olurlar ve reaktif oksijen salınımı ve proteazların etkisiyle nekrotik hücre ölümünü indükleyen parankimal hücrelere yapışırlar. Nötrofillerdeki adezyon molekülleri (β_2 integrinler, özellikle de CD11b/CD18), endotelyal hücrelerdeki ICAM-1 ve hepatositler temel olarak nötrofil marjinasyonu, nötrofil ekstrasvazasyonu ve oksidan molekül üretimi yaparlar. Sitokinler hepatik adezyon molekülünü ve oksidan stresi modüle eden kemokinleri oluşturabilirler (57).

2.3.11. Hücrelerde CYP 2E1-Bağımlı Toksisite

Sitokrom p450 2E1 (CYP 2E1) etanolle indüklenebilir bir formdur ve etanol, CCl₄, asetaminofen, N-nitrosodimetilamin gibi birçok toksik substratı metabolize ve aktive eder (71) Sitokrom p450 2E1 (CYP 2E1)-bağımlı etanol metabolizması ROS oluşumu sonucu oksidatif stres oluşturur (72).

Hepatik stellat hücreler karaciğer hasarının fibrotik cevabında merkezi bir rol alır ve ROS stellat hücreleri aktive eder (8). CYP 2E1 ROS ürettiği andan itibaren etanolle oluşturulan CYP 2E1 ifadesi stellat hücrelerde kollajen tip-I biyosentezini başlatabilir. Buna rağmen CYP 2E1 daha çok hepatositlerde bulunur; ama stellat hücreler düşük düzeyde CYP 2E1 içerir (57).

Etanolün CYP 2E1 indüksiyonu etanol ile oluşan oksidatif streste merkezi bir mekanizma olabilir. Çeşitli mekanizmalar alkolle oluşturulan karaciğer hasarına benzer şekilde gelişir ama CYP 2E1-bağımlı oksidatif stres, mitokondriyal hasar ve stellat hücrelerdeki artmış kollajen oluşumu etanolün karaciğerdeki toksisitesine katkıda bulunan diğer mekanizmalar olabilir (57).



Şekil 3. Etanol sonrası sitokrom p450 2E1 (CYP 2E1) 'in oksidatif stresteki rolü (57).

Yukarıdaki şekil etanol ile oluşturulan oksidatif stres ve hepatotoksistide CYP 2E1' in rolünü ifade eden bir hipotezi göstermektedir. Etanol, degradasyona karşı stabilizasyonu kapsayan posttranskripsiyonel bir mekanizma ile CYP 2E1 düzeyini artırır. CYP 2E1 katalitik döngü süresince süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerini meydana getirir. Etanol uygulamasından sonra artan demir (Fe) varlığında hidroksil radikalleri, ferril türleri ve 1-hidroksietil radikali gibi daha güçlü oksidanlar üretilir. Bu çeşitli oksidanlar protein oksidasyonu ve enzim inaktivasyonu ile toksisiteyi, lipid peroksidasyonu ile hücre membranlarının hasarlanmasını ve malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksionenal gibi reaktif lipid aldehytlerinin üretimini başlatabilir. Mitokondriler; CYP 2E1-kaynaklı oksidanların neden olduğu hasar sebebiyle önemli hücresel organellerdir. Mitokondriyal membran potansiyelindeki artış ve belki de mitokondriyal membran geçirgenliğindeki artış proapoptotik faktörlerin serbestlenmesine neden olur. CYP 2E1-kaynaklı bazı reaktif oksijen türleri (H_2O_2 , LOOH, MDA, HNE gibi) diffüz olabilir ve hepatositlerden çıkarak stellat hücreler gibi karaciğerin diğer hücre tiplerine girerler ve bu hücreleri kollajen üretimi için uyarırlar ve fibrotik cevabı ortaya çıkarırlar (57).

2.4. MİTOKONDİRİYAL FONKSİYON BOZUKLUĞU SONUCU OLUŞAN KARACİĞER TOKSİSİTESİ

Birincil ve ikincil mitokondriyal fonksiyon bozukluğu; ilaçla oluşturulan steatoz, nonalkolik steatohepatit (NASH) ve sitolitik hepatitin önemli bir mekanizmasıdır. Mitokondriyal yağ asidi β -oksidasyonunun aşırı bozulması hepatosit sitoplazmasında küçük yağ veziküllerinin birikmesi ile karakterize edilen mikroveziküler steatoza neden olur. Zayıf mitokondriyal oksidasyon sebebiyle yağ asitleri karaciğerde birikir ve trigliseridlere esterleşirler. Büyük olasılıkla trigliseridler amfifilik yağ asitleri ile emilerek küçük yağ vezikülleri şeklinde biriktirilir (73).

Mikroveziküler steatoz, enerji üretimindeki eksikliğe neden olan ciddi metabolik bozuklukların en ayırt edici histolojik görünümüdür. β -oksidasyonunun inhibisyonu hücrelerin en önemli enerji kaynağını yok eder. Üstelik yağ asitleri ve yağ asitlerinin dikarboksilik asit metabolitleri doğrudan mitokondriyal enerji sentezini aksatır. Hepatik mitokondriyal β -oksidasyonunun bozulması sonucu hepatik keton cisimleri ve glukozun periferel dokulara taşınması azalır. Enerji kaynaklarının yetersizliği renal yetmezlik, pankreatit, koma ve ölüme neden olabilir (73).

Mitokondriyal DNA (mtDNA) hasarı ve mitokondriyal solunumun doğrudan inhibisyonu β -oksidasyonunu engelleyebilir (73). β -oksidasyonu NAD⁺ ı kullanır ve NAD⁺ ı NADH'a dönüştürür. Mitokondriyal solunum sırasında β -oksidasyonunun devamı için NADH oksidasyona uğrayarak NAD⁺ a dönüştürülür. Bu sebeple bozulmuş bir solunum β -oksidasyonunu engeller. Çeşitli endojen ve ekzojen maddeler mitokondriyal β -oksidasyonunu bozar ve farklı mekanizmalarla mikroveziküler steatoza neden olurlar. Etanol sonrası meydana gelen oksidatif stres mitokondriyal proteinlerin, lipidlerin ve DNA' nın hasarına sebep olur. İnsanlarda bu oksidatif lezyonlar mtDNA delesyonlarına sebep olur (74).

Solunum inhibisyonu mitokondrilerde ROS oluşumuna yol açar ve yağların lipid peroksidasyonuna neden olur (75).

Aşırı alkol kullanımında olduğu gibi artmış ROS oluşumu lipid peroksidasyonuna ve steatohepatite neden olur. Lipid peroksidasyonu ve ROS ile oluşturulan sitokin serbestlenmesi (TGF- β , TNF- α , IL-8) NASH' ın oluşmasına sebep olabilir (76).

Sitolitik hepatit; karaciğer yetmezliğine ve mitokondriyal solunum inhibisyonuna neden olabilen ciddi bir karaciğer lezyonudur (77). Mekanizma mitokondriyal permeabilite transiyonu (MPT) ile başlar. MPT ise mitokondri iç membranındaki porların permeabilite transiyonu (PT) nu açması ile gelişir. PT por açılımı depolarizasyona neden olur, hücre

şişer ve sonuçta nekrotik ve apoptotik hücre ölümüne yol açabilir. Hücrenin bütün mitokondrilerinde PT por açılımı apoptozisi önleyen ATP azalmasına neden olur. Çünkü apoptozis enerji gerektiren bir süreçtir. PR por açılımı sonrası nekroz gelişir (78). Yalnızca bazı mitokondrilerde oluşan PT por açılımı bu olaydan etkilenmeyen diğer mitokondrilerde ATP sentezine izin verir. Böylece nekroz önlenir. MPT' ye maruz kalan mitokondride matriks şişer, dış membran da şişerek patlar, mitokondriyal sitokrom c serbestlenerek kaspaslar aktive olur ve apoptozise yol açar (79).

3. *Thymbra spicata* L. (KARA KEKİK)

Thymus, *Origanum*, *Thymbra*, *Cordothymus* ve *Satureja* gibi karvakrol ve timol içeren bitkilerin baharat ya da bitkisel çaylar olarak kullanıldığı ve bu bitkilerin özellikle çeşitli medikal rahatsızlıkların tedavisi için alındığı Muller-Riebau ve ark. (1995) tarafından rapor edildi (80). *Thymbra spicata* ballıbabagiller (Labiatae) familyasının bir üyesidir ve bazı Doğu Akdeniz ülkelerinde doğal olarak yetiştirilir. Kurutulmuş yaprakları baharat ya da bitkisel çay olarak kullanılır (81). *Thymbra spicata* bitkisinin uçucu yağlarının; bitkisel besin, alkollü içki üretimi, parfümeri ve içerdiği antibakteriyel ajanlar sebebiyle antiseptik olarak kapsamlı ticari bir kullanımı vardır (82).

Uçucu yağlar çeşitli bileşenlerin kompleks bir karışımıdır. Bu bileşenler üç grupta sınıflandırılabilir:

- i) Genel formülleri $(C_5H_8)_n$ olan hidrokarbonlar. Formülde $n=2$ ise terpenler, $n=3$ ise sesquiterpenler, $n=4$ ise diterpenler olarak adlandırılırlar.
- ii) Hidrokarbonlardan türetilen oksijenlenmiş bileşikler (Alkol, aldehit, ester, eter, keton, fenol, oksitler, v.s.)
- iii) Sülfür ya da nitrojen içeren diğer özel bileşikler (83).

Terpenoid hidrokarbonlar oksidasyona uğrayabilirler ve sonunda yağın tat ve kokusunda bozulmalar olabilir (84). Yağın lezzeti oksijenlenmiş bileşiklerle ilişkili olarak kıyaslandığında bu bileşiklerin fazla bir önemi yoktur. Hatta oksijenlenmiş bileşikler uçucu yağların önemli bir bölümünü oluşturarak tedavilerde bir avantaj sağlar (83).

Thymbra spicata bitkisinin kimyasal bileşiminde çok yüksek miktarda karvakrol ve düşük yüzdelerde ise α - pinen, p- simen, α - terpinen gibi diğer monoterenler bulunur (82).

Tablo 2. Nizip’te toplanan *Thymbra spicata* bitkisinin yapraklarından 30 dak. 100 °C ‘de ekstrakte edilen 100 gr. kara kekik yağındaki uçucu yağların bileşenleri ve kurutulmuş yaprağın 100 gramındaki uçucu yağların % ağırlık miktarı (81)

<i>Thymbra spicata</i> , Nizip	100 °C
Uçucu yağ miktarı	2.0
α - Thujen	0.19
(-)- α - Pinen	0.37
(+)- α - Pinen	0.50
p- Simen	0.64
γ - Terpinen	1.90
E-3- karen-2- ol	3.08
Terpinen-4- ol	0.41
l- karvon	0.26
Timol	3.67
Karvakrol	86.2
Karyofillen	0.29
Bilinmeyen bileşikler	2.52

Thymbra spicata ekstraktının bileşimi Thymus türlerinin bileşimine benzer olmakla birlikte karvakrol ve timol miktarının daha yüksek olduğu (yaklaşık %90) görüldü (81). Karvakrol ve timolün besinlerle alınan birer antioksidan oldukları bilindiğine göre bu yönüyle *Thymbra spicata* bitkisi bir avantaj niteliğinde görülmektedir.

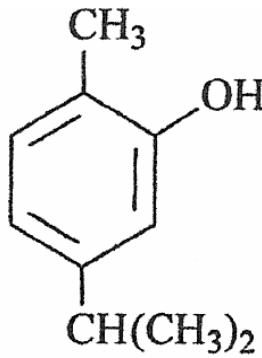
4. KARVAKROL

Karvakrol, birçok aromatik bitkinin önemli doğal bir bileşeni ve onların uçucu yağ bileşenlerinden biridir (85). Karvakrol; *Thymbra spicata* bitkisinden elde edilen uçucu yağların fenolik ve fungitoksik bir bileşenidir (86). Karvakrol bakımından zengin uçucu yağlar antibakteriyal ve antifungal ajanlar olarak yüksek bir potansiyele sahip olduklarından hayvansal besinlerde besin değerinin korunabilmesi için de ticari bir kazanç olarak kullanılırlar (82)

Karvakrolün farklı organizmalardaki önemli antibakteriyal, antifungal ve insektisidal etkileri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (87). Aydın ve ark. (1996) karvakrolün analjezik

aktivitelerini rapor etmişlerdir (88). Ultee ve ark. (1999) karvakrolün sitoplazmik membranda potasyum iyonları ve protonların geçirgenliğini değişikliğe uğratan reaksiyonlara girdiğini ve karvakrolün *Bacillus cereus* patojeninin diareye sebep olan toksin üretimini engellediğini rapor etmişlerdir (89). Zeytinoğlu ve ark. karvakrolün sıçan iskelet kası hücrelerinden CO25 hücrelerinin proliferasyonunu engelleyen inhibitör etkisinin bulunduğunu rapor etmişlerdir (90).

Karvakrol; açık formülü; 2-metil-5-(1-metil etil)fenol, kapalı formülü; $C_{10}H_{14}O$, molekül ağırlığı; 150,21 gram/mol olan bir bileşiktir. Sinonimleri; isopropil-o-cresol, p-cymen-2-ol, 2-hidroksi-p-cymen, 5-izopropil-2-metilfenol, iso-timol 'dür (85).



Şekil 4. Karvakrolün kimyasal yapısı

Karvakrol mutajenik çalışmalarda zayıf bir aktivite gösterir ancak şimdiye kadar karvakrolün toksisitesiyle ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. Sadece; karvakrolün akut toksisitesi ile ilgili olarak gavajla verilen 1,5 mM/kg (%93 karvakrol + % 7 timol) 'lık tek doz, karaciğer bifenil-4 hidrolaz üretiminde hafif bir artışa neden olur. Bunun dışında şimdiye kadar subakut, kronik ya da karsinojenik toksisitesine dair bir bilgi bulunmamaktadır. Metabolik çalışmalarda, karvakrolün 24 saat sonra önemli bir miktarının ürünle birlikte, serbest halde ya da glukoronid ve sülfat konjugatları şeklinde sekrete olabileceği gösterildi (85).

Karvakrolün DNA üzerindeki olası aktivitesine ve nüklear fragmentasyona sebep olmasına rağmen, karvakrolün genotoksik potansiyeli çok zayıftır (91).

Erkek albino sıçanlarda gavajla 1 mM/kg doz uygulanan karvakrol, serbest halde ya da glukoronid ve sülfat konjugatları şeklinde salgılanabilir. Tam anlamıyla oksidasyon, başlıca metil(-CH₃) gruplarında ortaya çıkar. Metil gruplarının karboksilik asitlere dönüşmesiyle benzil alkol ve 2-fenil propanol türevleri artar. Hidroksilasyon döngüsü sadece önemsiz bir metabolit üretir (92).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Etik Komitesinden (2110 sayılı, 26/12/2005 tarihli etik kurul kararı) onay alınarak Fizyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

5.1. HAYVAN MATERYALİ

Çalışma için Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden sağlanan toplam 70 adet erkek sıçan kullanıldı. Çalışmaya alınan sıçanlarda deneylerin tüm aşamalarında 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' (NIH Publication 86-23, revised 1985) kurallarına uyulmuştur.

Deney boyunca hayvanlar 20-22 °C oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamda tutuldu. Ortalama ağırlığı 250-300 g. arasında olan hayvanlar, standart sıçan yemi ve musluk suyu ile beslendi. Çalışmaya başlamadan önce yapılan muayenede sağlık durumu elverişli olmayan sıçanlar çalışmanın dışında bırakıldı.

5.2. BİTKİ MATERYALİ

Bu çalışma için materyal olarak kullanılan karvakrol Türkiye' nin güneydoğusunda yer alan Gaziantep'in Nizip ilçesinde 2002 Haziran ayında toplanan *Thymbra spicata* L. (Kara kekik) bitkisinden elde edilmiştir. Bu amaçla açık havada kurutulmuş olan *Thymbra spicata* (Kara kekik) materyallerinden uçucu yağların ayrıştırılma işlemi Clavenger aygıtında 3 saatlik buhar distilasyonu ile gerçekleştirilmiştir ve ışık almayan cam bir şişede muhafaza edilmiştir.

5.3. DENEYSEL SİROZ MODELİ

Dimetilnitrozamin ($C_2H_6N_2O$) , ticari ürün olarak Sigma'dan (Louis, MO) alındı. DMN ile siroz oluşturma modeli, Joseph' in modelinde belirttiği üzere tasarlandı (93).

Bu çalışmada 70 Wistar-Albino erkek sıçan kullanıldı ve sıçanlar her grupta 10 tane olmak üzere toplam 7 gruba ayrıldı:

1. Grup; Bu grup "kontrol" grubu olup, haftanın ardışık 3 gününde toplam 4 hafta boyunca intraperitoneal olarak serum fizyolojik enjekte edildi (salin %0.9'luk NaCl, intraperitoneal (ip), haftanın ilk 3 günü / 4 hafta).

2. Grup; Bu gruptaki hayvanlara karvakrol 40 mg/kg/ip, haftanın ilk 3 günü / 4 hafta uygulandı.

3. Grup; Bu gruptaki hayvanlara dimetilnitrozamin (DMN) %1'lik 10 mg/kg/ip, haftanın ilk 3 günü / 4 hafta uygulandı (Siroz grubu, deney grubu, model grubu).

4. Grup; Bu gruptaki hayvanlara önce karvakrol 40 mg/kg/ip, haftanın ilk 3 günü / 1 hafta verildikten sonra DMN %1'lik 10 mg/kg/ip, haftanın ilk 3 günü / 4 hafta uygulandı.

5. Grup; Bu gruptaki hayvanlara önce DMN %1'lik 10 mg/kg/ip, haftanın ilk 3 günü / 4 hafta verildi, daha sonra karvakrol 40 mg /kg/ip, haftanın ilk 3 günü 1 hafta uygulandı.

6. Grup; Bu gruptaki hayvanlara önce DMN %1'lik 10 mg/kg/ip, haftanın ilk 3 günü / 4 hafta verildi, daha sonra karvakrol 10 mg /kg/ip, haftanın ilk 3 günü 1 hafta uygulandı.

7. Grup; Bu gruptaki hayvanlara eş zamanlı olarak karvakrol 40 mg/kg/ip ve DMN %1'lik 10 mg/kg/ip, haftanın ilk 3 günü / 4 hafta uygulandı.

Çalışma sonunda hayvanlar ketamin (50 mg/kg) ile intraperitoneal olarak anesteziye edilerek intra kardiyak kan örnekleri alındı. Alınan kanlar düz tüplere konularak 5 dakika 3 bin devirde santrifüj edilerek serumlarına ayrıldı ve serumlar -70 °C'de dondurucuda saklandı. Kan alımını takiben tüm hayvanlar servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edilerek, karaciğerleri çıkartıldı. Karaciğer doku örnekleri %10'luk nötral tamponize formalin çözeltisine alındı.

5.4. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

Sıçanların serumlarında serum alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkalın fosfataz (ALP), gamaglutamil transpeptidaz (GGT), total bilirubin (T. BIL.) ve direkt bilirubin (d. BIL.), albümin (ALB) ölçümleri Abbott marka ticari kit kullanılarak Japon malı toshiba firmasının Abbott aeroset otoanalizör cihazında rutin biyokimya kitleri kullanılarak yapıldı.

5.5. DOKUNUN HAZIRLANMASI

Karaciğer doku örnekleri %10'luk nötral formalin çözeltisi içerisinde 24 saat fikse edildi. Karaciğerlerden 6 - 7 mm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler rutin histolojik doku takibi metodlarına göre otomatik takip makinesine alınarak, sırasıyla alkol, ksilol ve parafin çözeltilerinden geçirilip, parafin blok içerisine gömüldü. Parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak hemotoksilen ve eozin (H&E) ile boyama yapıldı.

5.5.1. Kesitlerin Boyanması ve Parafinsizleştirme:

Histopatolojide kullanılan genel doku boyası; H&E (hemotoksilen-eozin) boyama işlemi aşağıdaki sıra ile gerçekleşti:

1. Deparafinizasyon
2. Dehidratasyon
3. Boyama
4. Saydamlaştırma
5. Kapama(Montaj)

Kesitler 50 - 60 °C'lık etüvde 1 saat, ardından ksilolde yarım saat bekletildi ve deparafinizasyon işlemi tamamlandı. Dehidratasyon işlemi için alkol serileri kullanıldı. Bu işlemin amacı dokunun sudan uzaklaştırılarak tespit edilmesidir. Bu amaçla deparafinize dokular saf alkolden %70'lik alkole doğru yoğunluğu giderek azaltılmak sureti ile alkol serilerinden yeterli süre ile geçirildi. Hemotoksilen-eozin boyası ile boyandı. Ksilol serilerinden geçirilerek saydamlaştırma (şeffaflandırma) yapıldı. Materyaller entellan ile kapatıldı ve ışık mikroskobunda değerlendirildi.

5.6. KARACİĞERİN HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Kesitler histokimyasal boyanmadan sonra ışık mikroskopu ile incelendi. Preparatlar modifiye Knodell sınıflandırmasına göre (Tablo 3) 6 puan üzerinden incelenerek değerlendirildi (94).

5.6.1. Knodell Skorlaması

Tablo 3. Modifiye edilmiş knodell skorlaması (94)

BIANCHI'NİN MODİFİYE KNODELL SKORLAMASI	
1- Portal iltihap:	
a- Yok	0/4
b- Seyrek iltihap hücreleri	1/4
c- Hafif derecede iltihap	2/4
d- Orta derecede iltihap	3/4
e- Belirgin iltihap, lenfoid follikül oluşumu	4/4
2- Güve yeniği nekrozu:	
a- Yok	0/6
b- Seyrek (Tek PT' de 1-3 nekroz)	1/6
c- Orta derecede (Birçok PT' de %50' den az)	3/6
d- Belirgin (Birçok PT' de %50' den fazla)	4/6
e- Şiddetli, septal-portal-portal (çevresi nekroz)	6/6
3- Lobüler nekrozlar, iltihap:	
a- Yok	0/10
b- Seyrek (lobulusların 1/3 alanından az)	1/10
c- Orta derecede (lobulusların 2/3 alanında)	3/10
d- Belirgin (lobulusların 2/3 alanından fazla) veya köprüleşme	5/10
e- Ağır (santral-santral) nekroz	6/10
f- Çok ağır (santral-portal) nekroz	8/10
g- Yaygın ağır nekroz	10/10
Skor 0-6	Hafif aktivite
Skor 7-12	Orta aktivite
Skor 13-18	Ağır aktivite
4- Fibrozis:	
a- Yok	0/4
b- Portal ve septal	1/4
c- Portal-portal	2/4
d- Portal-santral	3/4
e- Fokal tam olmayan veya fokal tam nodül oluşumu	3-4/4
f- Diffüz fibrozis ve nodül oluşumu (siroz)	4/4

Aşağıdaki tablo (Tablo 4) Knodell skorlamasının modifiye bir şeklidir (95).

Tablo 4. Sirozun farklı bir modifiye evrelemesi (95)

Modifiye evreleme: Yapısal değişiklikler: fibrozis ve siroz	
Değişiklik	Skor
Fibrozis yok	0
Bazı portal alanlarda kısa fibroz setumlu veya setumsuz fibroz genişleme	1
Çoğu portal alanlarda kısa fibroz setumlu veya setumsuz fibroz genişleme	2
Çoğu portal alanlarda kısa fibroz genişleme, nadir P-P köprüleşme	3
Portal alanlarda belirgin köprüleşmeyle birlikte hem P-P hem P-C köprüleşme	4
Nadir nodüllerle birlikte belirgin köprüleşme (P-P ve/veya P-C) inkomplet siroz	5
Siroz, muhtemel veya kesin	6

5.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler, SPSS 10.0 windows software hesaplama programı ile analiz edildi. Bütün sonuçların standart sapmaları ve ortalamaları hesap edildi. Gruplar arasındaki farkın karşılaştırılması için tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) kullanıldı. Grupların birbiriyle olan anlamlılıklarında Tukey testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak verildi. P değerinin <0.01 olması anlamlı olarak kabul edildi. (Tukey HSD, p:0.01)

6. BULGULAR

Bu çalışma; ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen toplam 70 adet Wistar cinsi erkek sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Deney süresince grup 6 ve grup 7' den üçer sıçan öldü.

Yedi gruptan oluşan deney sonunda elde edilen sıçan karaciğer preparatları ışık mikroskopu ile incelendi ve grupların fibrozis ortalamaları Tablo 5' te verildi. Tablo 6' da ise grupların hepatik aktivite indeksi verildi. Kontrol grubu (0±0) ile karvakrol grubu (0±0) ve deneysel oluşturulan siroz sonrası 40 mg/kg karvakrol verilen grup (0.75±0.62) arasında anlamlı bir farklılık yoktu (Tukey HSD, p>0.01). Grup 3 (Siroz grubu)' ün fibrozis ortalamasını 5.70±0.17 olarak tespit ettik. Siroz grubunda kontrol grubuna kıyasla ortalama fibroziste anlamlı bir artış görüldü (Tukey HSD, p<0.01). Deneysel siroz öncesi

40 mg/kg karvakrol verilen grup (Grup 4) 2 ± 0 , deneysel oluşturulan siroz sonrası 10 mg/kg karvakrol verilen grup (Grup 6) 2 ± 1.63 , eşzamanlı grup (Grup 7) 5.14 ± 0.37 'lük fibrozis ortalamalarıyla kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gösteriyordu (Tukey HSD, $p<0.01$).

Tablo 5. Gruplar arasındaki fibrozis ortalamaları

Gruplar	Denek Sayısı (n: 64)	Fibrozis Ortalamaları $\pm$ SD	P değeri
Grup1 (SF)	10	$0\pm0^*$	0.01
Grup2 (Karv)	10	$0\pm0^*$	
Grup3 (DMN)	10	5.70 ± 0.17	
Grup4 (K40_D)	10	$2\pm0^*$	
Grup5 (D_K40)	10	$0.75\pm0.62^*$	
Grup6 (D_K10)	7	$2\pm1.63^*$	
Grup7 (K+D)	7	5.14 ± 0.37	

* deney grubuna kıyasla anlamlı

SD=Standart deviasyon

Anlamlı değerler $\pm$ Standart sapmalar

SF: Serum fizyolojik verilen grup: Kontrol grubu

D-K40: Önce DMN, sonra karvakrol (40 mg/kg)

K40-D: Önce karvakrol (40 mg/kg), sonra DMN

D-K10: Önce DMN, sonra karvakrol (10 mg/kg)

K+D: Karvakrol(40 mg/kg), DMN eşzamanlı

Tablo 6. Grupların Hepatik Aktivite İndeksi

Gruplar	Kontrol	Karv	DMN	K40-D	D-K40	D-K10	K+D
Portal Alan İltihabı	0	0	1	1	1	1	2
Fibrozis	0/6	1/6	6/6	3/6	0-1/16	2/6	4/6
Fokal Nekroz	0	0	0	1	0	2	2
Konfilient Nekroz	0	0	0	1	0	0	3
Piece-meal nekroz	0	0	0	1	0	0	2
HAİ	0/18	0/18	1/18	4/18	1/18	3/18	9/18

HAİ: Hepatik Aktivite İndeksi

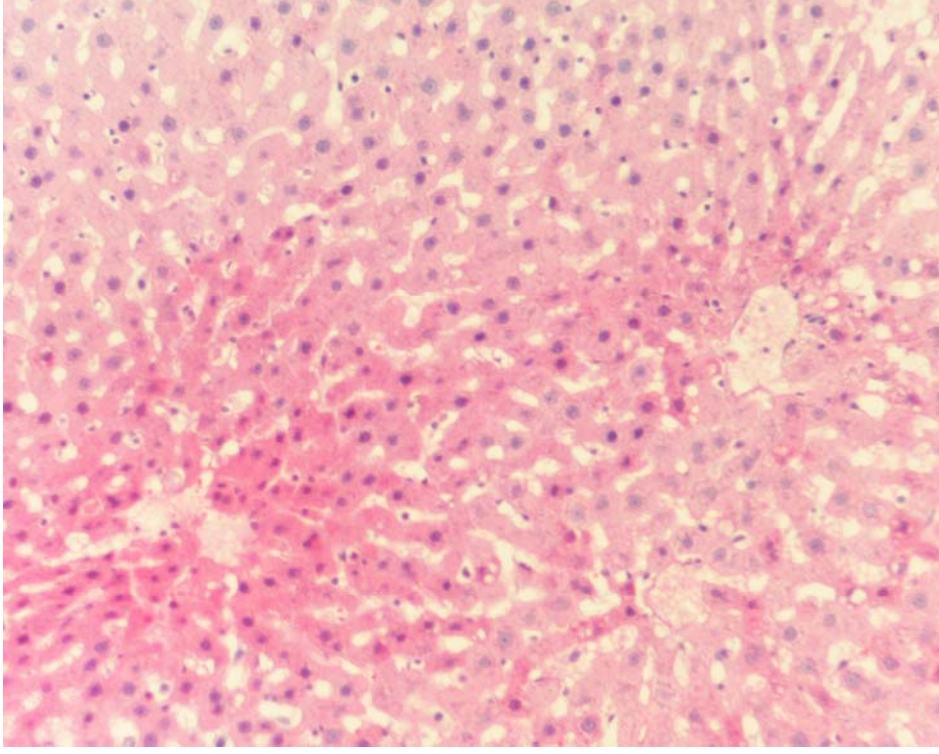
Deney sonunda grupların ortalama vücut ağırlıkları, serum enzim (ALT, AST, ALP, GGT) düzeyleri, serum total bilirubini (T. BİL), serum direkt bilirubini (d. BİL) ile serum albümin (ALB) düzeyleri Tablo 7’ te verildi. Siroz grubu (210 ± 22), deneysel siroz öncesi 40 mg/kg karvakrol verilen grup (206 ± 11) ve eşzamanlı grupta (225 ± 15) kontrol grubuna (259 ± 18) kıyasla ortalama vücut ağırlığında anlamlı bir azalma tespit ettik (Tukey HSD, $p < 0.01$). Siroz grubu (126 ± 44), deneysel siroz sonrası 10 mg/kg karvakrol verilen grup (108 ± 35) ve eşzamanlı grubun (106 ± 18) ortalama serum ALT düzeyleri kontrole (64 ± 13) kıyasla anlamlı bir artış gösteriyordu (Tukey HSD, $p < 0.01$). Siroz grubu ve eşzamanlı grubun AST ve GGT düzeyleri kontrole kıyasla anlamlı bir artış gösteriyordu (Tukey HSD, $p < 0.01$). ALP düzeyi bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu (Tukey HSD, $p > 0.01$). Siroz grubu (0.5 ± 0.2), deneysel siroz öncesi 40 mg/kg karvakrol verilen grup (0.6 ± 0.4) ve eşzamanlı grubun (0.4 ± 0.1) T. BİL düzeyleri kontrol grubu (0.1 ± 0.02) ile kıyaslandığında anlamlı artış gösteriyordu (Tukey HSD, $p < 0.01$). d. BİL. düzeyinde gruplar arasında belirgin bir fark tespit edilemedi (Tukey HSD, $p > 0.01$). Siroz grubu (0.8 ± 0.3), deneysel siroz öncesi 40 mg/kg karvakrol verilen grup (0.8 ± 0.08) ve eşzamanlı grubun (0.7 ± 0.1) albümin düzeyleri kontrole (1 ± 0.1) kıyasla anlamlı bir azalma; deneysel siroz sonrası 10 mg/kg karvakrol verilen grup (1.2 ± 0.18) ise kontrole (1 ± 0.1) kıyasla anlamlı bir artış gösteriyordu (Tukey HSD, $p < 0.01$).

Tablo 7. Tüm Grupların Biyokimyasal Değerleri

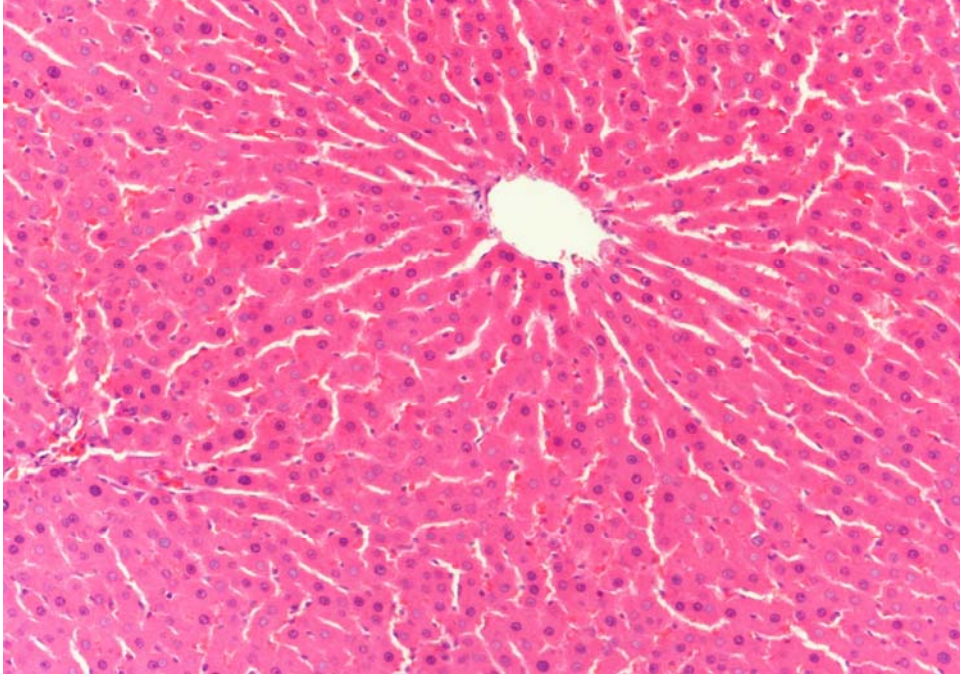
Gruplar	Kontrol	Karv	DMN	K40-D	D-K40	D-K10	K+D	P değeri
Vücut ağırlığı(g)	259±18*	242±18*	210±22	206±11	255±13*	248±10*	225±15	0.01
ALT	65±13*	73±24*	126±44	72±25*	81±21*	108±35	106±18	
AST	174±69*	179±75*	352±217	288±104*	158±39*	213±77	328±126	
ALP	328±126	156±52	154±77	205±52	214±28*	236±63	219±55	
GGT	4.5±1.7*	4.5±0.9*	11.4±5	8.8±2.6	5.6±2.2*	3.4±1.9*	13.6±7.9	
T. BİL	0.1±0.02*	0.2±0.06*	0.5±0.2	0.6±0.4	0.2±0.03*	0.3±0.1*	0.4±0.1	
d. BİL	0.05±0	0.06±0.02	0.08±0.06	0.3±0.2*	0.04±0.03	0.02±0.04	0.09±0.05	
ALB	1±0.1*	1±0.09*	0.8±0.3	0.8±0.08	1±0.1*	1.2±0.18*	0.7±0.1	

* deney grubuna kıyasla anlamlı

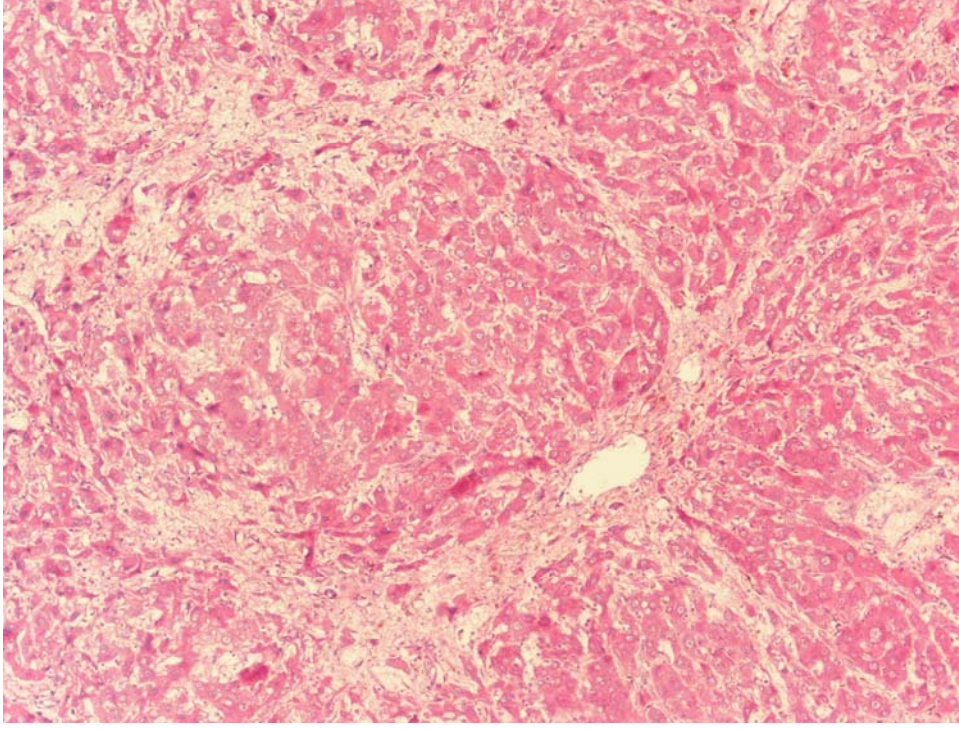
Grupların sıçan karaciğerlerinin hemotoksilen-eozin boyası ile boyanması sonrası 100X' lik büyütme altında dokulardaki histopatolojik görüntüleri Resim 3, Resim 4, Resim 5, Resim 6, Resim 7, Resim 8 ve Resim 9'da gösterilmektedir.



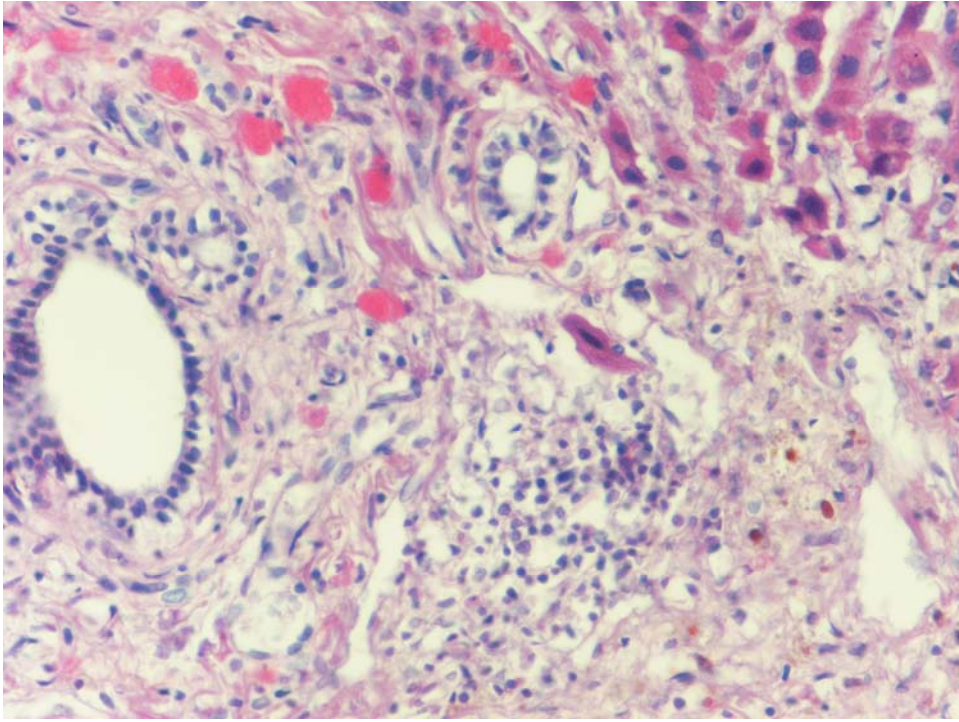
Resim 3: Kontrol grubu sıçan karaciğer dokusunun ışık mikroskobu ile X100 büyütme altında normal lobüler görünümü



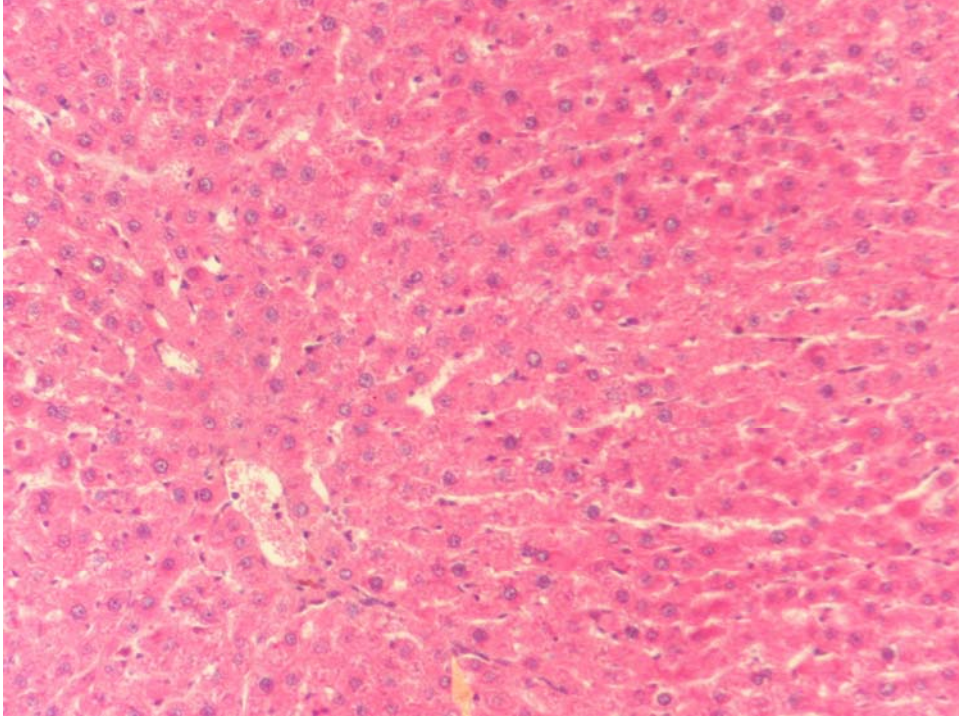
Resim 4: Karvakrol grubu sıçan karaciğer dokusunun ışık mikroskobu ile X100 büyütme altında normal lobüler görünümü



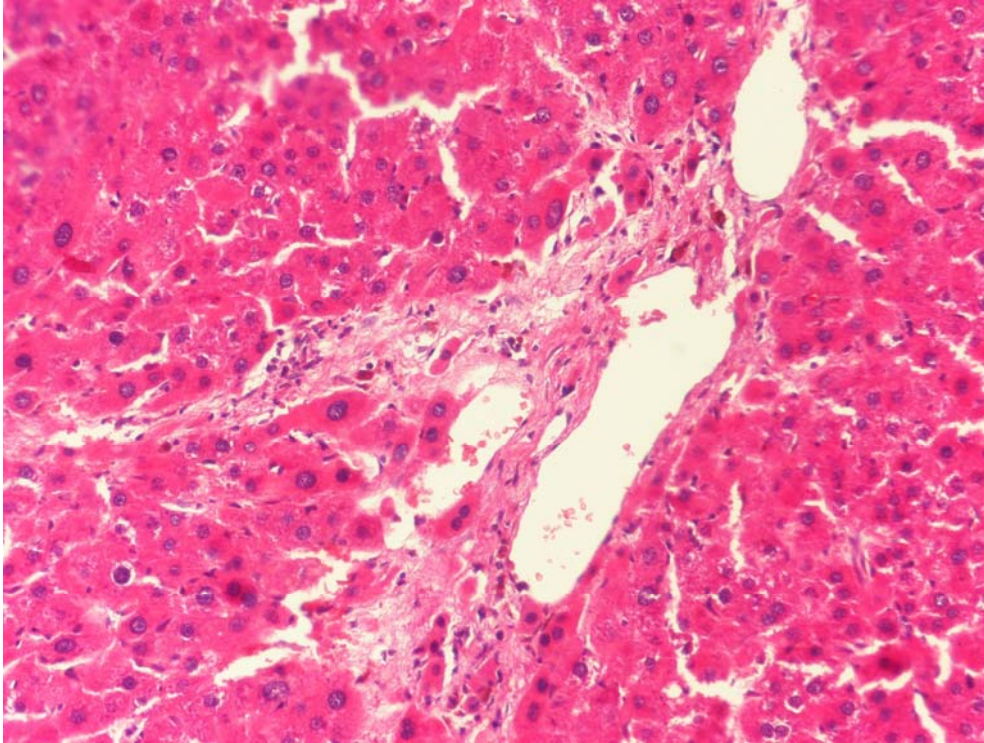
Resim 5: DMN grubu sıçan karaciğer dokusunun ışık mikroskobu ile X40 büyütme altında görülen sentriolobüler nekroz



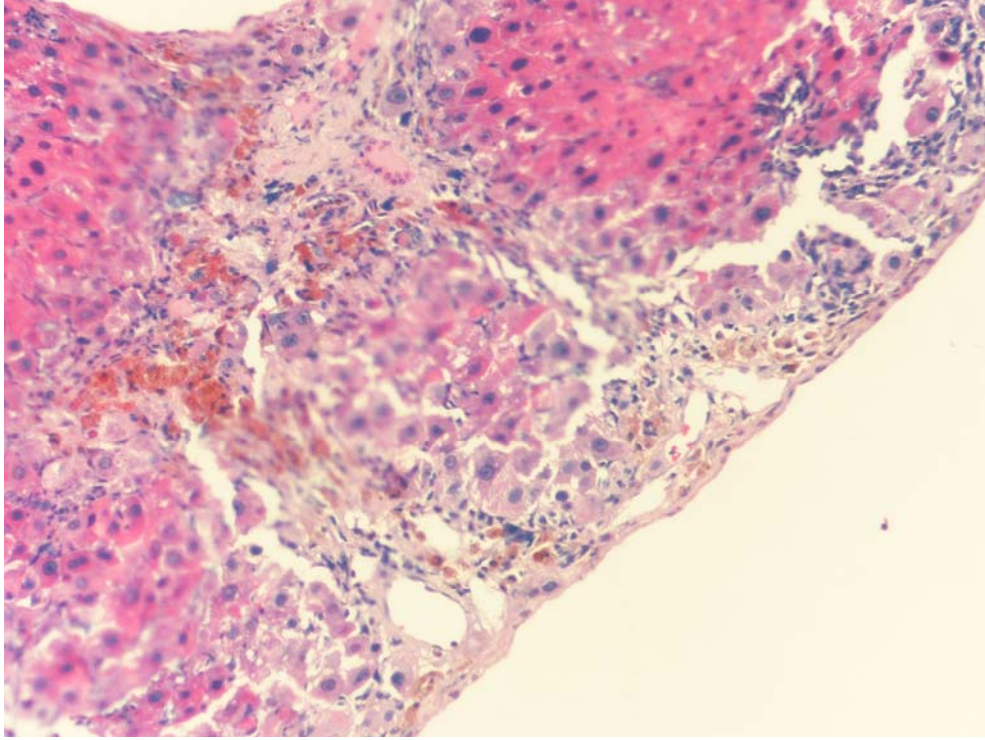
Resim 6: K40-D grubu sıçan karaciğer dokusunun ışık mikroskobu ile X100 büyütme altında görülen ince fibrotik bölmeler



Resim 7: D-K40 grubu sıçan karaciğer dokusunun ışık mikroskobu ile X40 büyütme altında normal lobüler görünüm



Resim 8: D-K10 grubu sıçan karaciğer dokusunun ışık mikroskobu ile X100 büyütme altında görülen fibrotik bölmeler



Resim 9: Eşzamanlı grubu sıçan karaciğer dokusunun ışık mikroskobu ile X100 büyütme altında görülen belirgin skar dokusu

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çeşitli mekanizmalar karaciğer hücre hasarını başlatır ve hasar olaylarını giderek ağırlaştırır. Mitokondriler birçok kimyasalın sebep olduğu hepatotoksisite için seçkin hedeflerdir. Hayati önem taşıyan hücre organellerinin fonksiyon bozukluğu enerji metabolizmasının bozulması ile sonuçlanır. ROS oluşumundaki artış ve peroksinitrit; intrasellüler oksidan strese neden olur. Mitokondrilerde CYP2E1 gibi sitokrom P450 izoenzimlerinin indüksiyonu oksidan stresi ve hücre hasarını başlatır. Hepatosellüler fonksiyon bozulduğu zaman biriken safra asitleri stres ve sitotoksisiteye neden olur.

Hücre hasarı ve organdan kaynaklanan endotoksinler ya da her ikisinin kombinasyonu Kupffer hücrelerini aktive eder, nötrofillerin karaciğere göçüne neden olur. Hücre parçalarını uzaklaştırmak ve savunma sisteminin bir bölümünü oluşturmaktan sorumlu olan bu inflamatuvar hücreler aynı zamanda karaciğer hasarını başlatırlar.

Buna rağmen hücre hasarı ve hücre ölümü sadece kimyasallarla değil, aynı zamanda bireyin gen ekspresyon profili, antioksidan durumu ve rejenerasyon kapasitesi gibi faktörlerle de belirlenir. Karaciğerde kimyasallarla oluşturulan doğrudan ve dolaylı birçok mekanizma sebebiyle, bu kimyasallara karşı koyacak farmakolojik gelişimi ve klinik kullanımı olan bir madde hepatotoksisiteyi önleyebilir (57).

Literatürde deneysel siroz modellerinde CCl₄ ve DMN kullanılmıştır (6, 29, 96). Biz yaptığımız çalışmada deney protokolünü oluştururken, %1' lik 10 mg/kg DMN ile oluşturulan deneysel siroz modelini kullandık. Çalışmamızdaki siroz grubu karaciğer preparatlarının histopatolojik görüntülerinin Rolando Hernandez-Munoz ve ark. (2003)'nın CCl₄ ile oluşturulan mikronodüler siroz grubu ve Chun-Hui Li ve ark. (2005)'nin DMN ile oluşturulan hepatik fibrozis grubu karaciğerleri ile uyumlu olduğunu gördük (6, 96). Üstelik DMN ile oluşturulmuş modelde CCl₄ ile oluşturulan siroz modeline kıyasla dört hafta gibi daha kısa sürede daha belirgin bir siroz tablosu görülmüştür. CCl₄' ün ise ancak 8 haftalık ya da 10 haftalık uygulama sonunda sıçanlarda deneysel siroz oluşturabildiği bildirilmektedir (96, 97).

Hepatik fibrozis sirozun ara ve kritik bir dönemidir. Eğer bu dönemde uygun bir maddeyle tedavi edilirse siroz başarılı bir şekilde önlenabilir (98).

Çalışma *Thymbra spicata* L. (kara kekik) bitkisinin uçucu yağlarının önemli bir yüzdesini oluşturan (%80' lik) ve fenolik bir bileşik olan karvakrolün sıçanlarda oluşturulan deneysel siroz modeli üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla *Thymbra spicata* bitkisi çiçeklendikten sonra Haziran ayında toplanmıştır. Çünkü *Thymbra spicata*'nın uçucu yağlarının yoğunluğu ve fenolik bileşenlerinden olan karvakrolün miktarının bitkinin gelişmesiyle yavaş yavaş arttığı ve çiçeklenme sonrası Haziran ile Temmuz ' da ise kısa aralıklarla maksimum düzeye ulaştığı bildirilmektedir (86).

Müller-Riebau ve ark. (1995) ile Yegen ve ark. (1992) karvakrolün *Thymbra spicata*'nın uçucu yağlarının temel fenolik bileşenlerinden biri olduğunu rapor ettiler (80, 99). Bizim çalışmamızda da kara kekik bitkisinden ekstrakte ettiğimiz uçucu yağ bileşenlerinin % 80' ini karvakrol oluşturdu (81).

Chun-Hui Li ve ark. (2005) DMN ile oluşturulan hepatik fibrozisli sıçanlarda karaciğerin morfolojik değişimlerini araştırdılar ve karaciğer fibrozisini 0 dan 4 e kadar derecelendirdiler. Çalışma sonunda kontrol grubunda (10 sıçan) hepatik fibrozise rastlamazken (0 derece:10), haftanın ardışık 3 günü/4 hafta süreyle DMN uygulanan grupta (10 sıçan) fibrozis derecesinde ciddi artışlar (2 derece:2, 3 derece:4, 4 derece:4) gördüler. Aynı çalışmada kontrol grubuna kıyasla DMN uygulanan grupta kollajen alan-yoğunluk (aria-density) yüzdesinde de anlamlı bir artış (kontrole kıyasla yaklaşık %15) rapor ettiler (6).

Qing-Wei Hu ve ark. (2006) DMN ile oluşturulan karaciğer fibrozisli sıçanlarda bisiklolün etkilerini ve bisiklolün etki mekanizmasını araştırdılar. Bulgulara göre kontrol

grubu ile model grubu (DMN uygulanan grup/ haftanın ardışık 3 günü /4 hafta süreyle) arasında fibrozis skorlaması bakımından belirgin bir fark tespit ettiler. Model grubunda (12.6 ± 1.9) kontrol grubuna (0.0 ± 0.0) kıyasla anlamlı bir artış gözlediler. (100).

Bizim çalışmamızda da DMN enjekte edilen sıçan karaciğerlerindeki ortalama fibrozis değeri (5.70 ± 0.17) ve histopatolojik görüntüdeki sentriolobüler nekroz; deney protokolündeki deneysel karaciğer fibrozis modelinin başarılı bir şekilde uygulandığını göstermektedir.

Hepatik fibrozis sonrası 40 mg/kg karvakrol uygulanan sıçanlarda fibrozis değeri anlamlı şekilde azaldı. Ancak hepatik fibrozisli sıçanlarda daha düşük miktarda (10 mg/kg) karvakrol uygulaması fibrotik alanların azaltılmasında yeterli olmadı. Hepatik fibrozis oluşumu sırasında (Grup 7) sıçanlara uygulanan karvakrol de fibrozis oluşumunu engelleyemedi. Karaciğerde hücreler arası konnektif dokuyu oluşturan moleküllerden kollajen; karaciğer fibrozis oluşumunda ECM'nin esas yapısını oluşturur. Bu çalışmada karvakrolün fibrozis skorunu azaltması kollajen miktarının kantitatif olarak azalması ile de doğrudan ilişkili olabilir.

Hücre nekrozuna sebep olan krizlerde, mitokondriyal membran hasarlandığı için sitoplazmik ve mitokondriyal enzimler kanda saptanır. Böylece uygun enzimler kanda ölçülürse ve enzimlerin intrasellüler yerleşimi hakkında bilgi edinilirse patolojik sürecin doğası ve derecesi hakkında bilgi sağlanabilir. Aminotransferazlar; amino asitler ile 2-okzo-asitlerin birbirine çevrilmesini, amino gruplarının transferi yolu ile gerçekleştiren enzimlerdir. AST (önceleri glutamat oksaloasetat olarak adlandırılmıştır) ve ALT (önceleri glutamat pirüvat olarak adlandırılmıştır) klinik önem taşıyan aminotransferazların örnekleridir. Hepatik nekrozla birlikte görülen karaciğer hastalıklarında hastalığın klinik semptomları (sarılık gibi) ortaya çıkmadan önce serum ALT ve AST düzeyleri yükselir (101). Yaptığımız çalışmada DMN enjeksiyonlu grupta hepatik fibrozis sebebiyle anlamlı yükselmiş serum ALT ve AST değerleri tespit ettik. Hepatik fibrozis sonrası 40 mg/kg karvakrol uygulaması; yükselmiş serum ALT ve AST düzeylerini anlamlı olarak azalttı. AST düzeyi 10 mg/kg karvakrol uygulaması ile de anlamlı olarak azaldı ancak 40 mg/kg lık dozda daha çok azalma tespit ettik. Karaciğerin bütünlüğünü etkileyen hastalıklarda serum AST ve ALT düzeyleri artmış olup, ALT karaciğere daha özgün bir enzimdir (102). Parankimal karaciğer hastalıkları dışında serum ALT aktivitesinde artış, nadiren gözlenir (101). Hepatik fibrozis sonrası 10 mg/kg karvakrol uygulaması ALT düzeyindeki artışı önleyemedi. Eşzamanlı karvakrol uygulaması ile de hem AST hem ALT düzeyinde anlamlı bir azalma tespit edilememiştir.

Çok sayıda doğal ve sentetik substratın alkali hidrolizini katalizleyen ALP' nin; vücuttaki doğal substratı bilinmemektedir. ALP karaciğerde yüksek miktarda bulunur. Hepatobilyer hastalıklarda safra kanalları tıkanmasına yanıt olarak karaciğerde ALP sentezi artar (101). Bizim çalışmamızda gruplar arasında serum ALP düzeyi bakımından bir fark tespit edilemedi. Yaptığımız çalışmada hepatik fibrozis modeli kimyasal bir toksin olan DMN ile oluşturulduğu için ALP düzeyinde bir değişiklik olmamış olabilir.

GGT (Gamma glutamiltransferaz) küçük peptidler veya peptidleri oluşturan amino asitlerin hidrolitik ayrılmasını katalizleyen peptidaz enzimidir. Kas dışındaki hücrelerde ve serumda bulunur. GGT aktivitesi tüm karaciğer hastalıklarında artar. Serumda GGT saliverilmesi, karaciğer hücrelerinin mikrozomal yapılarına alkol ve diğer ilaçların toksik etki gösterdiğini yansıtır (101). Çalışmamızda serum GGT düzeylerinin 40 mg/kg ve 10 mg/kg karvakrol ile azaldığı görüldü.

Bu çalışmada karvakrolün yüksek dozunun (40 mg/kg) DMN enjeksiyonu ile hepatik fibrozis oluşturulan sıçanlarda hepatositleri fibrozisten koruduğu ve karaciğer fonksiyonundaki anormalileri anlamlı olarak normale dönüştürdüğü görülmektedir.

Hasarlanan hepatositler ya da aktiflenen Kupffer hücrelerinden salınan bazı çözünebilir faktörlerin uyarısı sonucu yıldız hücreler, morfolojik olarak miyofibroblast hücrelerine dönüşürler ve kontrolsüz çoğalırlar. Morfolojik değişime uğrayan HSC, ECM' nin büyük bir kısmını üretmektedir (103, 104). Hasarlanan hepatositler aynı zamanda HSC' nin parakrin stimülasyonu ile reaktif oksijen intermediyatörlerini oluşturabilir (105).

Bu çalışmanın sonunda ilaç toksikasyonu ile oluşturulan hepatik fibrozisli sıçanlarda karvakrolün belirli dozlarda tedavi edici, koruyucu ve antifibrotik etkisinin olabileceği sonucuna varıldı.

8. KAYNAKLAR

1. GARCIA-TREVIJANO ER, IRABURU MJ, et al. Transforming growth factor β 1 induces the expression of α 1(I) procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBP β -dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, 29:960-70, 1999.
2. ALA-KOKKO, L., PIHLAJANIEMI, T., MYERS, J.C., KIVIRIKKO, K.I., SAVOLAINEN, E.R. Gene expression of type I, III and IV collagens in hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine in the rat. *Biochem. J.*, 244:75-79, 1987.
3. VINAY KUMAR M.D., RAMZI S. COTRAN, M.D., STANLEY L. ROBBINS, M.D. *Temel Patoloji*, 6. Baskı. Çeviri: Uğur Çevikbaş, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, sf. 517, 2000.
4. WILLIAM A. SODEMAN, JR., M.D., THOMAS M. SODEMAN, M.D. *Sodeman's Fizyopatoloji*, 1. Baskı, 2. Cilt. Çeviri: Hekimler Birliği Vakfı, Türkiye Klinikler Yayınevi, Ankara, sf. 954 - 956, 1992.
5. GANONG F. *Tıbbi Fizyoloji*, 19. Baskı. Çeviri: Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, Barış Kitabevi, İstanbul, sf. 529, 1999.
6. CHUN-HUI LI, DONG-MING PIAO, WEN-XIE XU, ZHENG-RI YIN, JING-SHUN JIN, ZHE-SHI SHEN. Morphological and serum hyaluronic acid, laminin and type IV collagen changes in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis of rats. *World J Gastroenterol*, 11(48):7620-7624, 2005.
7. FRIEDMAN, S. L. In *Diseases of the Liver* (Schiff, E., Sorrell, M., and Maddrey, W., eds) 8th Ed., pp. 371-386, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998.
8. FRIEDMAN SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*, 275:2247–2250, 2000.
9. MITAKA, T., SATO, F., MIZUGUCHI, T., YOKONO, T., and MOCHIZUKI, Y. Reconstruction of hepatic organoid by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology*, 29:111-125, 1999.
10. KNITTEL, T., KOBOLD, D., SAILE, B., GRUNDMANN, A., NEUBAUER, K., PISCAGLIA, F., AND RAMADORI, G. Rat Liver Myofibroblasts and Hepatic Stellate Cells: Different Cell Populations of the Fibroblast Lineage With Fibrogenic Potential *Gastroenterology* 117:1205-1221, 1999.
11. NIKI, T., PEKNY, M., HELLEMANS, K., BLESER, P. D., BERG, K. V., VAEYENS, F., QUARTIER, E., SCHUIJT, F., AND GEERTS, A. Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 29, 520–527, 1999.

12. MAHER, J. J. Leukocytes as Modulators of Stellate Cell Activation. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 23, 917–921, 1999.
13. SVEGLIATI BARONI, G., D'AMBROSIO, L., FERRETTI, G., CASINI, A., DI SARIO, A., SALZANO, R., RIDOLFI, F., SACCOMANNO, S., JEZEQUEL, A. M., AND BENEDETTI, A. Fibrogenic effect of oxidative stress on hepatic stellate cells. *Hepatology* 27, 720–726, 1998.
14. NIETO, N., FRIEDMAN, S. L., GREENWEL, P., AND CEDERBAUM, A. CYP2E1-mediated oxidative stress induces collagen type I expression in rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, 30, 987–996, 1999.
15. JARNAGIN, W. R., ROCKEY, D. C., KOTELIANSKY, V. E., WANG, S. S., and BISSELL, D. M. J. Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *Cell Biol.* 127, 2037–2048, 1994.
16. FRIEDMAN S. L. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis*, 19: 129-140, 1999.
17. ANKOMA-SEY, V., MATLI, M., CHANG, K. B., LALAZAR, A., DONNER, D. B., WONG, L., WARREN, R. S., and FRIEDMAN, S. L. Coordinated induction of VEGF receptors in mesenchymal cell types during rat hepatic wound healing. *Oncogene* 17, 115–121, 1998.
18. PINZANI M, MARRA F, and CARLONI V. Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver* 18: 2–13, 1998.
19. SHRIVASTAVA, A., RADZIEJEWSKI, C., CAMPBELL, E., KOVAC, L., MCGLYNN, M., RYAN, T. E., DAVIS, S., GOLDFARB, M., GLASS, D. J., LEMKE, G., and YANCOPOULOS, G. D. An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol. Cell* 1, 25–34, 1997.
20. MARRA, F., GENTILINI, A., PINZANI, M., CHOUDHURY, G. G., PAROLA, M., HERBST, H., DIANZANI, M. U., LAFFI, G., ABBOD, H. E., and GENTILINI, P. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for platelet-derived growth factor's actions on hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 112, 1297–1306, 1997.
21. ROCKEY, D. C., FOUASSIER, L., CHUNG, J. J., CARAYON, A., VALLEE, P., REY, C., and HOUSSET, C. Cellular localization of endothelin-1 and increased production in liver injury in the rat: potential for autocrine and paracrine effects on stellate cells. *Hepatology* 27, 472–480, 1998.

22. GRESSNER, A. M. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells J. Hepatol. 22, Suppl. 2: 28–36, 1995.
23. ARTHUR MJP, FRIEDMAN SL, ROLL FJ et al. Lipocytes from normal rat liver release a neutral metalloproteinase that degrades basement membrane (type IV) collagen. J Clin Invest, 84, 1076–85, 1989.
24. BENYON, R. C., HOVELL, C. J., DA GACA, M., JONES, E. H., IREDALE, J. P., and ARTHUR, M. J. P. Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation Hepatology 30: 977–986, 1999.
25. MARRA, F., DEFRANCO, R., GRAPPONE, C., MILANI, S., PASTACALDI, S., PINZANI, M., ROMANELLI, R. G., LAFFI, G., and GENTILINI, P. Increased expression of monocyte chemotactic protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. Am. J. Pathol. 152, 423–430, 1998.
26. WANG, S. C., TSUKAMOTO, H., RIPPE, R. A., SCHRUM, L., and OHATA, M. Expression of interleukin-10 by in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. J. Biol. Chem. 273, 302–308, 1998.
27. GRESSNER, A. M. The cell biology of liver fibrogenesis - an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. Cell Tissue Res. 292, 447–452, 1998.
28. IREDALE, J. P., BENYON, R. C., PICKERING, J., MCCULLEN, M., NORTHROP, M., PAWLEY, S., HOVELL, C., and ARTHUR, M. J. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. J. Clin. Invest. 102, 538–549, 1998.
29. MI-HYE LEE, SIK YOON, and JEON-OK MOON. The Flavonoid Naringenin Inhibits Dimethylnitrosamine-Induced Liver Damage in Rats. Biol. Pharm. Bull. 27(1) 72-76, 2004.
30. D. MONTGOMERY BISSELL. Hepatic fibrosis as wound repair: A progress report. J Gastroenterol 33: 295-302, 1998.
31. MAHER JJ. SCOTT MK. SAITO JM. Et al. Adenovirus-mediated expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in rat liver induces a neutrophilic hepatitis. Hepatology, 25: 624-630, 1997.
32. PIETRANGELO A. Metals, oxidative stress, and hepatic fibrogenesis. Semin Liver Dis, 16: 13-30, 1996.
33. O’KANE S. FERGUSON MW. Transforming growth factor betas and wound healing. Int J. Biochem Cell Biol, 29: 63-78, 1997.

34. BISSELL DM, WANG SS, JARNAGIN WR, et al. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest*, 96: 447-455, 1995.
35. JARNAGIN WR, ROCKEY DC, KOTELIANSKY VE, et al. Expression of variant fibronectins in wound healing: Cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol*, 127: 2037-2048, 1994.
36. GEERTS A, SCHUPPAN D, LAZEROMS S, et al. Collagen type I and III occur together in hybrid fibrils in the space of Disse normal rat liver. *Hepatology*, 12: 233-241, 1990.
37. LIU X, WU H, BYRNE M, et al. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 1852-1856, 1997.
38. VYAS SK, LEYLAND H, GENTRY J, ARTHUR MJ. Rat hepatic lipocytes synthesize and secrete transin (stromelysin) in early primary culture. *Gastroenterology* 109: 889-898, 1995.
39. JOHNATTY RN, TAUB DD, REEDER SP, et al. Cytokine and chemokine regulation of proMMP-9 and TIMP-1 production by human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 158: 2327-2333, 1997.
40. ISAKA Y, BREES DK, IKEGAYA K, et al. Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. *Nature Medicine*, 2: 418-423, 1996.
41. LORTAT-JACOB H, BALTZER F, DESMOULIERE A, et al. Lobular- but not periportal-inhibition of collagen deposition in the liver of *S. Mansoni* infected mice using interferon-gamma. *J Hepatol*, 26: 894-903, 1997.
42. ROEB E, ROSE-JOHN S, EREN A, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in rat liver cells is increased by lipopolysaccharide and prostaglandin E2. *FEBS Lett*, 357: 33-36, 1995.
43. KNOOK DL, BOMSA A, SCIFERT WF. Role of vitamin A in liver fibrosis. *J Gastro Hepatol*, 10(Suppl 1): 47-49, 1995.
44. BROWN KE, POULOS JE, LI L, et al. Effect of vitamin E supplementation on hepatic fibrogenesis in chronic dietary iron overload. *Am J Physiol*, 272: G116-123, 1997.

45. PINZANI M, CARLONI V, MARRA F, et al. Biosynthesis of platelet-activating factor and its 1O-acyl analogue by liver fat-storing cells. *Gastroenterology*, 106: 1301- 1311, 1994.
46. BUCHER NL, ROBINSON GS, FARMER SR. Effects of extracellular matrix on hepatocyte growth and gene expression: implications for hepatic regeneration and the repair of liver injury. *Semin Liver Dis*, 10: 11- 19, 1990.
47. ZHANG HY, GHARAEI-KERMANI M, PHAN SH. Regulation of lung fibroblast alpha-smooth muscle actin expression, contractile phenotype, and apoptosis by IL-1 beta. *J Immunol*, 158: 1392- 1399, 1997.
48. ROCKEY DC, CHUNG JJ. Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing. *J Clin Invest*, 98: 1381- 1388, 1996.
49. WONG L, YAMASAKI G, JOHNSON RJ, et al. Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *J Clin Invest*, 94: 1563- 1569, 1994.
50. BHUNCHET E, FUJIEDA K. Capillarization and venularization of hepatic sinusoids in porcine serum-induced rat liver fibrosis: A mechanism to maintain liver blood flow. *Hepatology*, 18: 1450- 1458, 1993.
51. RANA B, MISCHOULON D, XIE Y, et al. Cell- extracellular matrix interactions can regulate the switch between growth and differentiation in rat hepatocytes: Reciprocal expression of C/EBP alpha and immediate-early growth response transcription factors. *Mol Cell Biol*, 14: 5858- 5869, 1994.
52. REEVES HL, BURT AD, WOOD S, et al. Hepatic stellate cell activation occurs in the absence of hepatitis in alcoholic liver disease and correlates with the severity of steatosis. *J Hepatol*, 25: 677- 683, 1996.
53. HOUSSEER C, ROCKEY DC, BISSELL DM. Endothelin receptors in rat liver: Lipocytes as a contractile target for endothelin 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 9266 -9270, 1993.
54. ROCKEY DC, CHUNG JJ. Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing. *J Clin Invest*, 98: 1381- 1388, 1996.
55. ROJKIND M, DUNN MA. Hepatic fibrosis. *Gastroenterology*, 76: 849- 863, 1979.

56. SAKAIDA I. MATSUMURA Y, KUBOTA M. Et al. The prolyl 4-hydroxylase inhibitor HOE 077 prevents activation of Ito cells, reducing procollagen gene expression in rat liver fibrosis induced by choline-deficient l- amino acid-defined diet. *Hepatology*, 23: 755- 763, 1996.
57. HARTMUT JAESCHKE, GREGORY J. GORES, ARTHUR I. CEDERBAUM, JACK A. HINSON, DOMINIQUE PESSAYRE, and JOHN J. LEMASTERS. Mechanisms of Hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, 65: 166- 176, 2002.
58. JAESCHKE, H. Cellular adhesion molecules: Regulation and functional significance in the pathogenesis of liver diseases. *Am. J. Physiol.* 273: G602–G611, 1997.
59. ESSANI, N. A., BAJT, M. L., FARHOOD, A., VONDERFECHT, S. L., and JAESCHKE, H. Transcriptional activation of vascular cell adhesion molecule-1 gene in vivo and its role in the pathophysiology of neutrophil-induced liver injury in murine endotoxin shock. *J. Immunol.*, 158: 5941–5948, 1997.
60. JAESCHKE, H., FARHOOD, A., BAUTISTA, A. P., SPOLARICS, Z., SPITZER, J. J., and SMITH, C. W. Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Hepatology* 17: 915–923, 1993.
61. JAESCHKE, H., and SMITH, C. W. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J. Leukoc. Biol.*, 61: 647–653, 1997.
62. CHOSAY, J. G., ESSANI, N. A., DUNN, C. J., AND JAESCHKE, H. Neutrophil margination and extravasation in sinusoids and venules of the liver during endotoxin-induced injury. *Am. J. Physiol.* 272: G1195–G1200, 1997.
63. MAHER, J. J., SCOTT, M. K., SAITO, J. M., and BURTON, M. C. Adenovirusmediated expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in rat liver induces a neutrophilic hepatitis. *Hepatology*, 25: 624–630, 1997.
64. CURZIO, M., ESTERBAUER, H., DI MAURO, C., CECCHINI, G., and DIANZANI, M. U. Chemotactic activity of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and homologous hydroxyalkenals. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 367: 321–329, 1986.
65. LIU, P., VONDERFECHT, S. L., MCGUIRE, G. M., FISHER, M. A., FARHOOD, A., and JAESCHKE, H. The 21-aminosteroid tirilazad mesylate protects against endotoxin shock and acute liver failure in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 271, 438–445, 1994.

66. JAESCHKE, H., FISHER, M. A., LAWSON, J. A., SIMMONS, C. A., FARHOOD, A., and JONES, D. A. Activation of caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF- α -induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model. *J. Immunol.*, 160: 3480–3486, 1998.
67. ZIOL, M., TEPPER, M., LOHEZ, M., ARCANGELI, G., GANNE, N., CHRISTIDIS, C., TRINCHET, J. C., BEAUGRAND, M., GUILLET, J. G., and GUETTIER, C. Clinical and biological relevance of hepatocyte apoptosis in alcoholic hepatitis. *J. Hepatol.* 34: 254–260, 2001.
68. JAESCHKE, H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 15: 718–724, 2000.
69. JAESCHKE, H., HO, Y.-S., FISHER, M. A., LAWSON, J. A., and FARHOOD, A. Glutathione peroxidase-deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: Importance of an intracellular oxidant stress. *Hepatology*, 29: 443–450, 1999.
70. NIEMINEN, A. L., SAYLOR, A. K., TESFAI, S. A., HERMAN, B., and LEMASTERS, J. J. Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to *t*-butylhydroperoxide. *Biochem. J.* 307: 99–106, 1995.
71. GUENGERICH, F. P., KIM, D. H., and IWASAKI, M. Role of human cytochrome P450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem. Res. Toxicol.*, 14: 168–179, 1990.
72. BONDY, S. C. Ethanol toxicity and oxidative stress. *Toxicol. Lett.*, 63: 231–24, 1992.
73. FROMENTY, B., and PESSAYRE, D. Inhibition of mitochondrial β -oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 67: 101–154, 1995.
74. MANSOURI, A., FROMENTY, B., BERSON, A., ROBIN, M. A., GRIMBERT, S., BEAUGRAND, M., ERLINGER, S., and PESSAYRE, D. Multiple hepatic mitochondrial DNA deletions suggest premature oxidative aging in alcoholic patients. *J. Hepatol.* 27: 96–102, 1997.
75. BERSON, A., DE BECO, V., LETTE'RON, P., ROBIN, M. A., MOREAU, C., EL KAHWAJI, J., VERTHIER, N., FELDMANN, G., FROMENTY, B., and PESSAYRE, D. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 114: 764–774, 1998.

76. PESSAYRE, D., BERSON, A., FROMENTY, B., and MANSOURI, A. Mitochondria in steatohepatitis. *Semin. Liver Dis.* 21: 57–69, 2001.
77. BERSON, A., RENAULT, S., LETTE'RON, P., ROBIN, M. A., FROMENTY, B., FAU, D., LE BOT, M. A., RICHE', C., DURAND-SCHNEIDER, A. M., FELDMANN, G., and PESSAYRE, D. Uncoupling of rat and human mitochondria: A possible explanation for tacrine-induced liver dysfunction. *Gastroenterology*, 110: 1878–1890, 1996.
78. PESSAYRE, D., HAOUZI, D., FAU, D., ROBIN, M. A., MANSOURI, A., and BERSON, A. Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing and euthanasia by lymphocytes: Different forms of drug-induced hepatic apoptosis. *J. Hepatol.* 31: 760–770, 1999.
79. BRADHAM, C. A., QIAN, T., STREETZ, K., TRAUTWEIN, C., BRENNER, D. A., and LEMASTERS, J. J. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor α -mediated apoptosis and cytochrome *c* release. *Molec. Cell. Biol.* 18: 6353–6364, 1998.
80. MULLER-RIEBAU, F. J., BERGER, B. M., and YEGEN, O. Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 43: 2262-2266, 1995.
81. MUSTAFA Z. OZEL, FAHRETTIN GOGUS, ALISTAIR C. LEWIS. Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. *Food Chemistry*, 82: 381-386, 2003.
82. BAYDAR, H., SAĞDIÇ, O., ÖZKAN, G., KARADOĞAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control* 15: 169-172, 2004.
83. SERAP (SONSUZER) HANCI, SERPIL SAHİN and LEVENT YILMAZ. Isolation of volatile oil from thyme (*Thymbra spicata*) by steam distillation. *Nahrung/Food*, 47: 252-255, 2003.
84. BERK, Z., *The Biochemistry of Foods*, and Ed., Elsevier Science Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands pp. 195–208, 1976.
85. M. DE VINCENZI, A. STAMMATI, A. DE VINCENZI, M. SILANO. Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*, 75: 801-804, 2004.
86. FRANK J. MULLER-RIEBAU, BERNHARD M. BERGER, OKTAY YEGEN and C. ÇAKIR. Seasonal Variations in the Chemical Compositions of Essential

Oils of Selected Aromatic Plants Growing Wild in Turkey. J. Agric. Food Chem., 45(12): 4821-4825, 1997.

87. DIDRY, N. DUBREVIL, L. and PINKAS, M. Activity of anthraquinonic and naphthoquinonic compounds on oral bacteria. Die Pharmazie, 49(9):681-683, 1994.

88. AYDIN, S., OZTURK, Y., BEIS, R., BASER, K.H.C. Investigation of Origanum onites, Sideritis congesta and Satureja cuneifolia essential oils for analgesic activity. Phytotherapy Research 10 (4): 342 – 344, 1996.

89. A. ULTEE, E. P. W. KETS, and E. J. SMID. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4606-4610, 1999.

90. ZEYTINOGLU, H., INCESU, Z., and BASER, K. H. C., The Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a Human N-Ras oncogene. Phytomedicine, 10(4):292-9, 2003.

91. STAMMATI, A., BONSI, P., ZUCCO, F., MOEZELAAR, R., ALAKOMI, H.- L., AND A. VON WRIGHT. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. Food and Chemical Toxicology. 37: 813-823, 1999.

92. AUSTGULEN LT, SOLHEIN E, SCHELINE RR. Metabolism in rats of p-cymene derivatives: carvacrol and thymol. Pharmacol Toxicol, 61(2): 98-102, 1987.

93. JOSEPH GEORGE. Ascorbic acid concentrations in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. Clinica Chimica Acta, 335: 39-47, 2003.

94. KNOELL RG, ISHAK KG, BLACK WC, CHEN TS, CRAIG R, KAPLOW ITZ N, KIERNAN TW, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. Hepatology;1:431-435, 1981.

95. HONKOOP P, de MAN RA, ZONDERVAN PE, SCHALM SW. Histological improvement in patients with chronic hepatitis B virus infection treated with lamivudine. Liver, 17(2): 103-6, 1997.

96. C THIRUNAVUK KARASU, Y YANG, V M SUBBOTIN, SAK HARVEY, J FUNG and C R GANDHI. Endothelin receptor antagonist TAK-044 arrests and reverses the development of carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats. Gut, 53: 1010-1019, 2004.

97. ROLANDO HERNANDEZ-MUNOZ , MAURICIO DIAZ-MUNOZ , JUAN A. SUAREZ-CUENCA , CRISTINA TREJO-SOLIS , VERONICA LOPEZ , LOURDES SANCHEZ-SEVILLA , LUCIA YANEZ , VICTORIA CHAGOYA DE SANCHEZ,

PH.D. Adenosine reverses a preestablished CCl₄-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology*, 4: 677-687, 2003.

98. RILEY TR 3RD, BHATTI AM. Preventive strategies in chronic liver disease: part II. Cirrhosis. *Am Fam Physician*, 64: 1735-1740, 2001.

99. YEGEN, O.; BERGER, B.; HEITEFUSS, R. Untersuchungen zur fungitoxischen Wirkung der Extrakte sechs ausgewählter Pflanzen aus der Türkei auf phytopathogene Pilze (Investigations on the Fungitoxicity of Extracts of Six Selected Plants from Turkey against Phytopathogenic Fungi). *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz*, 99, 349-359, 1992.

100. QING-WEI HU, GENG-TAO LIU . Effects of bicyclol on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in mice and its mechanism of action. *Life Sciences*, 79:606–612, 2006.

101. CARL A. BURTIS, EDWARD R. ASHWOOD. *Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler*. Palme Yayıncılık, Ankara, 2005.

102. ELLI S G, GOLDBERG DM, SPOONER RJ et al: Serum enzyme tests in diseases of the liver and biliary tree. *Am J Clin Pathol* 70: 248-258, 1978.

103. HAUTEKEETE, M.L., GEERTS, A. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *Virchows Archiv—An International Journal of Pathology* 430 (3), 195–207, 1997.

104. KMIEC, Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology* 161 (III–XIII), 1–151, 2001.

105. MAHER, J.J., BISSELL, D.M. Cell-matrix interactions in liver. *Seminars in Cell Biology* 4 (3), 189–201, 1993.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşe Karaduman 1983 yılında Sivas, Kangal’ da doğdu. Orta öğrenimini Gaziantep’ te tamamlayan Ayşe Karaduman, 2004 yılında Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’ nden mezun oldu. Aynı yıl Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı’ nda yüksek lisans programına başladı. Orta düzeyde ingilizce bilen Ayşe Karaduman 2007 yılında yüksek lisans öğrenimini başarı ile tamamladı.