

T.C
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
İZZET BAYSAL TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL SAFRA KANAL LİGASYONUNA BAĞLI OLUŞAN
KARACİĞER FİBROZİSİNE; N-ASETİL SİSTEİN, ASKORBİK
ASİT VE SİROLİMUSUN ETKİLERİNİN IŞIK, ELEKTRON
MİKROSKOPİK, İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE
BİYOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ

DR. ELÇİN HAKAN TERZİ

BOLU

2008

T.C
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
İZZET BAYSAL TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL SAFRA KANAL LİGASYONUNA BAĞLI OLUŞAN
KARACİĞER FİBROZİSİNE; N-ASETİL SİSTEİN, ASKORBİK
ASİT VE SİROLİMUSUN ETKİLERİNİN IŞIK, ELEKTRON
MİKROSKOPİK, İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE
BİYOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Elçin Hakan TERZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Aysel KÜKNER

BOLU

2008

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden sınırsız şekilde faydalandığım, sonsuz sabır ve anlayış sahibi, her türlü desteği esirgemeyen tez danışmanım, çok değerli hocam Prof. Dr. Aysel Kükner'e ve cerrahi girişimi bana öğretirken deneyi gerçekleştirmemde katkısı olan Doç. Dr. Hayrettin Öztürk'e;

Dokuların hazırlanması ve kesitlerin fotoğraflanmasında teknik altyapılarını kullanmam için yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Fahri Yılmaz ve Doç. Dr. Çetin Boran'a ve tüm patoloji bölümü teknisyen arkadaşlara;

Elektron mikroskopik değerlendirmede her türlü desteği veren Prof. Dr Candan Özoğul'a;

Tez öncesi ve tez yazım sürecince tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen Doç Dr. Fatma Töre'ye;

Oldukça yoğun olmasına rağmen istatistiksel değerlendirme yaparken desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Aysu Kıyan'a;

Biyokimyasal çalışmaları yürüten asistan arkadaşlarıma ve sonuçları değerlendiren Yrd. Doç. Dr. Erdinç Serin'e;

Asistanlık süresince birlikte çalıştığım ve tez çalışmam süresince yardımcı olan arkadaşım Dr. Tülin Fırat'a

Deney hayvanlarının bakımı ve ilaç verilmesinde yardımcı olan görevlimiz Remzi Ulusoy'a

Tıp eğitimi almamda büyük fedakarlıklar gösteren, benim yetişmemde büyük katkıları olan aileme,

Tez çalışmam süresince büyük anlayış gösteren çok değerli eşim Dr. Reyhan Buçan Terzi'ye ve biricik oğlumuz Naci Berk Terzi'ye

Teşekkür etmeyi borç bilirim

Dr. Elçin Hakan TERZİ

2008

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v-vi
ŞEKİLLER	vii-viii
TABLOLAR	ix
ÖZET	x-xi
ABSTRACT	xii-xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Anatomi	2
2.2 Fizyoloji	5
2.3 Histoloji	7
2.4 Embriyoloji	9
2.5 Tıkanma Sarılığı ve Karaciğer Fibrozisi	11
2.5.1 Etiyolojisi	11
2.5.2 Serbest Radikaller ve Savunma Sistemlerimiz	11
2.5.3 Fizyopatoloji	14
2.6 Tedavi, Antioksidanlar, Antifibrotikler	17
2.6.1 N-Asetil Sistein	17
2.6.2 Askorbik Asid	18
2.6.3 Sirolimus (Rapamisin)	18
3. MATERYAL VE METOD	20
4. BULGULAR	31
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	82
7. KAYNAKLAR	83

SİMGELER VE KISALTMALAR

A: Arter

AA: Arteriol

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ALT: Alanin amino transferaz

α -SMA: Alpha-smooth muscle actin

ALP: Alkalen fosfataz

AST: Aspartat amino transferaz

ATP: Adenozin trifosfat

BDMA: Benzil dimetil amin

CAT: Katalaz

CCL₄: Karbon tetraklorür

CTGF: Connective tissue growth factor, Bağ doku büyüme faktörü

CuZn. SOD: Bakır-Çinko süperoksid dismutaz

ÇDYA: Çoklu doymamış yağ asitleri

DAB: Diaminobenzidin

DDSA: 2-Dodecenyl succinic anhidrit

DNA: Deoksiribo nükleik asid

ECM: Ekstra sellüler matriks

Etz: Elektron transfer zinciri

EM: Elektron mikroskop

FDA: Food and Drug Administration, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FGF: Fibroblast growth factor, Fibroblast büyüme faktörü

FITC: Fluoresan izotiyosiyanat..

GER: Granüler endoplazmik retikulum

GPx: Glutasyon peroksidaz

GSH: Glutasyon

GGT: Gama glutamil transpeptidaz

GSSG: Okside glutasyon

HCO₃⁻: Bikarbonat

H₂O₂: Hidrojen peroksid

HRP: Horse Radish Peroxidase

HSC: Hepatik stellate hücre
 IFN- γ : İnterferon-gama
 İL-1 β : İnterlökin-1 beta
 MDA: Malondialdehid
 M: Muskulus
 MnSOD: Manganez süperoksid dismutaz
 MMP-1: Matriks metallo proteinaz
 mTOR: Mammalian target of rapamisin
 NO: Nitrik oksit
 NOS: Nitrik oksit sentaz
 NAC: N-asetil sistein
 NF- κ B: Nuclear factor-kappa B, Transkripsiyon nükleer faktör kappa B
 O₂⁻: Süperoksid
 O₂: Oksijen
 OsO₄: Osmiyum tetroksit
 ·OH: Hidroksil
 PAS: Periyodik asid schiff
 PDGF: Trombosit kökenli büyüme faktörü
 PBS: Fosfat tampon solüsyonu
 PMN: Polimorfonükleer lökosit
 PPAR- γ : Peroksizom proliferatör aktivatör reseptör gamma
 RAPA : Rapamisin, Sirolimus
 SOD: Süperoksid dismutaz
 SOR: Serbest oksijen radikalleri
 TdT: Terminal deoksinukleotidil transferaz
 TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü beta
 TNF- α : Tümör Nekroze edici Faktör-alpha
 TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling
 UDCA: Ursodeoxycholic acid
 V: Ven
 VV: Venül
 VCI: Vena kava inferior

ŞEKİLLER	Sayfa
Şekil 4.1: Distal ve proksimal olarak bağlanmış koledok kanalı	32
Şekil 4.2: Ligasyon yapılan sıçanda genişlemiş koledok kanalı	32
Şekil 4.3: Kontrol ve deney gruplarındaki karaciğer ağırlık yüzdeleri	33
Şekil 4.4: ALT ve AST değerleri	36
Şekil 4.5: GGT değerleri	36
Şekil 4.6: Direkt bilirubin değerleri	37
Şekil 4.7: Glukoz değerleri	37
Şekil 4.8: Ligasyon grubuna ait HE boyaması	44
Şekil 4.9: Ligasyon grubuna ait HE boyaması	44
Şekil 4.10: NAC grubuna ait HE boyaması	45
Şekil 4.11: NAC+C Vitamini grubuna ait HE boyaması	45
Şekil 4.12: Rapamisin grubuna ait HE boyaması	46
Şekil 4.13: Rapamisin grubuna ait HE boyaması	46
Şekil 4.14: Ligasyon grubunda Masson Trikrom boyaması	47
Şekil 4.15: Ligasyon grubunda. Masson Trikrom boyaması	47
Şekil 4.16: Rapamisin grubunda Masson Trikrom boyaması	48
Şeki 4.17: Ligasyon grubunda PAS boyaması	48
Şekil 4.18: C vitamini grubunda PAS boyaması	49
Şekil 4.19: Rapamisin grubunda PAS boyaması	49
Şekil 4.20: Kontrol grubunda α - SMA boyaması immünboyaması	50
Şekil 4.21: Ligasyon grubunda α - SMA immünboyaması	50
Şekil 4.22: Ligasyon uygulanan α - SMA immünboyaması	51
Şekil 4.23: NAC uygulanan grupta α - SMA immünboyaması	51
Şekil 4.24: NAC+C Vitamini grubunda α - SMA immünboyaması	52
Şekil 4.25: NAC+C Vitamini grubunda α - SMA immünboyaması	52
Şekil 4.26: C vitamini grubunda α -SMA immünboyaması	53
Şekil 4.27: Rapamisin grubunda α -SMA immünboyaması	53
Şekil 4.28: Kontrol grubunda demsin immünboyaması	54
Şekil 4.29: Ligasyon grubunda desmin immünboyaması	54
Şekil 4.30: Ligasyon grubunda desmin immünboyaması	55
Şekil 4.31: Ligasyon grubunda desmin immünboyaması	55

Şekil 4.32: C vitamini grubunda desmin immünboyaması	56
Şekil 4.33: Rapamisin grubunda desmin immünboyaması	56
Şekil 4.34: Kontrol grubunda β - Katenin immünboyaması	57
Şekil 4.35: Ligasyon grubunda β - Katenin immünboyaması	57
Şekil 4.36: NAC grubunda β - Katenin immünboyaması	58
Şekil 4.37: NAC+C Vitamini grubunda β - Katenin immünboyaması	58
Şekil 4.38: C vitamini grubunda β - Katenin immünboyaması	59
Şekil 4.39: Rapamisin grubunda β - Katenin immünboyaması	59
Şekil 4.40: Kontrol grubunda Ki- 67 immünboyaması	60
Şekil 4.41: Ligasyon grubunda Ki- 67 immünboyaması	60
Şekil 4.42: ligasyon grubunda Ki- 67 immünboyaması	61
Şekil 4.43: NAC grubunda Ki- 67 immünboyaması	61
Şekil 4.45: C grubunda Ki- 67 immünboyaması	62
Şekil 4.44: NAC+C grubunda Ki- 67 immünboyaması	62
Şekil 4.46: Rapamisin uygulanan grupta Ki- 67 immünboyaması	63
Şekil 4.47: Ortalama Ki- 67(+) hücre karşılaştırılması	42
Şekil 4.48: Kontrol grubunda apoptoz	63
Şekil 4.49: Ligasyon grubunda apoptoz	64
Şekil 4.50: Ligasyon grubunda apoptoz	64
Şekil 4.51: NAC+C vit grubunda apoptoz	65
Şekil 4.52: NAC grubunda apoptoz	65
Şekil 4.53: Rapamisin grubunda apoptoz	66
Şekil 4.54: Rapamisin grubunda apoptoz	66
Şekil 4.55: Ligasyon grubunun yarı ince kesiti	67
Şekil 4.56: NAC+C vitamini grubunun yarı ince kesiti	67
Şekil 4.57: Ligasyon grubuna ait elektron mikroskopik görüntü	68
Şekil 4.58: Ligasyon grubuna ait elektron mikroskopik görüntü	69
Şekil 4.59: Ligasyon grubuna ait elektron mikroskopik görüntü	70
Şekil 4.60: NAC+C grubuna ait elektron mikroskopik görüntü	71
Şekil 4.61: Lig+ C vit grubuna ait elektron mikroskopik görüntü	72
Şekil 4.62: Lig+NAC grubuna ait elektron mikroskopik görüntü	73
Şekil 4.63: RAPA grubuna ait elektron mikroskopik görüntü	74

TABLÖLAR**Sayfa**

Tablo 4.1 Denek ve karaciğer ağırlıkları	33
Tablo 4.2 Kontrol ve deney gruplarının kan biyokimya değerleri	35
Tablo 4.3 Ki- 67 (+) hücre sayısı	42

ÖZET

E. Hakan Terzi, Deneysel safra kanal ligasyonuna bağlı oluşan karaciğer fibrozisine; n-asetil sistein, askorbik asit ve sirolimus un etkilerinin ışık, elektronmikroskopik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak incelenmesi. Uzmanlık Tezi, BOLU, 2008. Deneysel safra kanalı ligasyonu karaciğer fibrozisi oluşturmak için kullanılmaktadır. Pek çok çalışmada uzamış safra kanal tıkanıklıklarının karaciğer dokusunda fibrotik ve sirotik değişikliklere neden olduğu gösterilmektedir. Bu çalışmadaki amacımız, safra kanal ligasyonuna bağlı oluşan karaciğer fibrozisine; n-asetil sistein (NAC), askorbik asit (C vitamini) ve sirolimus (rapamisin) un etkilerinin incelenmesidir. Çalışmada toplam 36 adet Wistar-Albino cinsi erişkin erkek sıçan kullanıldı. Kontrol grubu, safra kanalı ligasyonu ve dört tedavi grubu (NAC, C vitamini, NAC + C vitamini, rapamisin) olmak üzere toplam 6 grup oluşturuldu. Ligasyon sonrası 21 gün sonunda sakrifiye edilen sıçan karaciğer dokuları ve kan örnekleri alındı. Işık mikroskopik incelemeler için hematoksil-eozin, Masson-trikrom, PAS boyamaları, β katenin, Ki-67, α -SMA, desmin immün boyaları yapıldı. Apoptozis TUNEL yöntemi ile değerlendirildi. Tüm grupların karaciğer dokuları ince yapı düzeyinde incelendi. Kontrol grubu hariç tüm gruplarda karaciğer enzimleri ve bilirubin değerleri artmış olarak tespit edildi. Ligasyon grubunda; portal alanlarda safra kanalı proliferasyonu, inflamatuvar hücre artışı, bağ dokusu artışı, lobüllerin sınırlarında bozulma, hepatositlerde mitotik figürler görüldü. NAC tedavisinin, proliferasyonu ligasyon grubuna göre arttırdığı saptandı. Rapamisin grubunda safra kanalı proliferasyonu, fibrozis ve nekroz alanları daha az tespit edildi. Diğer tedavi grupları ligasyon grubuna benzemektedir. α -SMA immün boyaması, ligasyon grubunda fibrotik alanlardaki hücrelerde artmış olarak izlendi. Rapamisin grubunda, α -SMA boyanmasının şiddeti ve yaygınlığı azalmış olarak gözlenirken, diğer tedavi grupları ligasyon grubuna benzemektedir. Desmin immün boyanması, ligasyon ve tedavi gruplarında benzemektedir. Boyanma genellikle nekroz alanlarının çevresindeki hücrelerde ve proliferatif olmuş safra kanalları çevresinde tespit edildi. β katenin boyanması açısından gruplar arasında belirgin bir fark tespit edilememiştir. Mitotik aktivasyonu gösteren Ki-67 immün boyanması, ligasyon grubunda safra kanalları epitelinde ve hepatositlerde artmış olarak gözlenirken; rapamisin ve NAC +

C vitamini uygulanan gruplarda azalmış olduğu tespit edildi. TUNEL (+) hücreler; ligasyon ve tedavi gruplarında hepatositlerin bulunduğu karaciğer parankiminde yoğun olarak görülmekle beraber, safra kanalı proliferasyonu olan alanlarda gözlenmemiştir. Safra kanalındaki TUNEL (+) hücreler sadece rapamisin ile tedavi edilen grupta izlenmiştir.

Sonuç olarak, ligasyon oluşturulup tedavi uygulanan gruplardan rapamisin verilen sıçan karaciğer dokularında; safra kanal proliferasyonu, fibrotik ve nekrotik değişikliklerin azaldığı görülmüştür. Doku düzeyindeki bu iyileşmeler biyokimyasal değerlerle paralellik göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Safra kanal ligasyon, Karaciğer fibrozisi, NAC, C vitamini, rapamisin, apoptozis

SUMMARY

E. Hakan Terzi. To examine the effects of n-acetyl cystein, ascorbic acid and sirolimus on liver fibrosis due to experimental bile ducts ligation in rats by immunohistochemical, biochemical methods, light and electron microscopies. Medical Speciality Thesis, Bolu, 2008. Experimental bile duct ligation is used for to develop liver fibrosis. In several studies, prolonged bile duct obstructions caused liver fibrosis and cirrhosis was documented. The aim of the present study to examine the effects of n-acetyl cystein (NAC), ascorbic acid (vitamine C) and sirolimus (rapamycin) on liver fibrosis in bile duct ligated rats. 36 male Wistar-Albino rats were used and divided six groups; Controls, bile duct ligation (BDL) and four treatment groups; NAC, vitamine C, group, NAC + vitamine C, and rapamycin. Twenty-one days after ligation, rats were sacrificed and liver and blood samples were taken. For light microscopy, liver tissues were stained hematoxylin and eosin, masson trichrome, periodic acid-Schiff (PAS) and immune labelling for β catenin, Ki-67, α -SMA, and desmin. Apoptosis was evaluated by TUNEL method. Ultrastructure of liver was examined in all groups. It was found that liver enzymes and blood bilirubine levels were increased in all groups except controls. In ligation group, bile duct proliferation, inflammatory cells, increased connective tissue, locking integrity in lobular borders and mitotic figures in hepatocytes were seen.

NAC treatment increased proliferation when compared to ligation group. In rapamycin group, fibrosis, necrosis and proliferation, were diminished. Other treatment groups were similar to ligation group. α -SMA immune labelled cells were increased in fibrotic regions of bile duct ligated rats. While rapamycin decreased intensity of α -SMA immune labelling the other treatmens did not. Desmin immun reactivitive cells were found around necrosis areas and proliferated bile ducts. Their staining intensity was similar between ligation and treatment groups.

There is no differenc β -catenin labelling among the groups. Ki-67 immun labelling which show mitotic activity was increased epithelium of bile ducts and hepatocytes in ligation group. Treatment with rapamycin and NAC+ Vit C decreased Ki-67 labelling intensity.

TUNEL (+) cells were seen in the liver parenchyma high density, but not in the proliferated bile ducts. Only rapamycin treatment caused TUNEL (+) cells in the proliferated bile ducts.

In conclusion, rapamycin treatment reduced bile duct proliferation, fibrosis and necrosis in liver tissues of bile ducts ligated rats. Biochemical parameters were also correlated with histologic data.

Key words: Bile duct ligation, liver fibrosis, NAC, vitamine C, rapamisin, apoptosis

1. GİRİŞ

Safra kanalı ligasyonu, sıçanlarda deneysel fibrozis tablosu oluşturmak için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (1,2). Tıkanan safra yollarından, safranin geriye doğru birikmesi ile safra ve safra ile atılan toksik maddeler; başta karaciğer olmak üzere diğer organlarda da hasar verici etkilere neden olur. Safra yollarındaki staz ve basınç artışı, safra kanallarının proliferasyonuna yol açar. Uzamış safra kanalı tıkanması hepatositlerde köpüksü dejenerasyonun yanı sıra parankimde lokal bozukluklara yol açar (3). Kronik kolestatik bozukluklar sonucunda, fibrotik doku portal kanallar etrafında artış gösterir (4). Sirozun başlangıç şekli olan hepatik fibrozis, kronik karaciğer hastalarında oluşan ciddi karaciğer zedelenmesinin bir sonucudur ve özellikle Disse aralığında kollajen ve ekstra sellüler matriks (ECM) proteinlerinin birikimi ile karakterizedir (5, 6). Safra kanalı tıkanmalarının etiyolojisinde en sık karşılaşılan patolojiler safra yolları taşları, daralmalar ve tümörlerdir. Tıkanma sarılıklı hastalarda safra yollarının cerrahi, endoskopik veya perkutan yollar ile tıkanıklığın açılması ve basıncın azaltılması hayat kurtarıcıdır. Buna rağmen enfeksiyon, septik şok, hepatik parenkimal hasar veya multiple organ yetmezliği gibi hayati öneme sahip komplikasyonların önlenmesinde çoğu zaman yeterli olamamaktadır (7).

Karaciğer fibrozisinin gelişimini engellemek, durdurmak ve geri çevirmek için çok sayıda deneysel çalışma yapılmaktadır. Fibrozisin tedavisinde kabul edilmiş standart yöntem bulunmamaktadır. Çeşitli ilaçlar, antioksidan maddeler, antimitojenik faktörler, bitki ekstratları fibrozisi önlemek veya tedavi etmek için kullanılmıştır (8).

Bu çalışmanın amacı; sıçanlarda deneysel safra kanal ligasyonu sonucundaki tıkanıklığın karaciğerde yaptığı hasarı ortaya çıkararak, karaciğer fibrozisi oluşturmak ve etiyolojiye göre kesin tedavi uygulanana kadar geçen sürede hastalığın ilerlemesini durdurmak veya geri döndürmek amacıyla; n-asetil sistein, askorbik asid ve rapamisinin koruyucu etkilerinin olup olmadığını biyokimyasal, ışık mikroskopik, elektron mikroskopik ve immünohistokimyasal yöntemler ile incelemek ve bu konuda yapılan çalışmalar ile karşılaştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Anatomi

Karaciğer, vücudun en büyük karın içi organı ve bezidir. Kollajen ve elastik lif içeren Glisson kapsülü ile sarılı olarak sağ 7.-11. kaburgaların arkasına yerleşen karaciğer, hipokondrium ve epigastrium bölgesinde yer alarak sol hipokondrium bölgesine doğru uzanır (9,10,11). Normal uzunluğu 20-25 cm, yüksekliği 14-17 cm, önden arkaya doğru genişliği 10-14 cm'dir (12). Kızıl kahve renkte olan karaciğerin gevrek ve jöle kıvamında, dokununca bükülebilen bir yapısı vardır (13). Dalaktan sonra en sık yırtılan organdır (14). Karaciğerin anterior, superior, posterior yönlerdeki konveks üst yüzüne diyafragmatik yüz; inferior yönünde ise iç organlar ile komşu konkav alt yüzüne visseral yüz denir (11,13). İki yüz arasında ön-aşağıda margo inferior denilen derin inspiriyum da palpe edilebilen keskin bir kenar bulunur (15). Karaciğer intraperitoneal bir organ olup diafragma komşu olan area nuda kısmı hariç neredeyse tamamı periton ile kaplıdır (14). Diyafragma aracılığı ile akciğer, plevra, fibröz perikardiyum ve kalbin ventriküler bölümünden ayrılır (10,11). Karaciğer içinde safra kesesi ve vena cava inferiorun olduğu çukurlar ile sağ ve sol loblara ayrılır. Sağ lob büyük ve tek parça olup, sol lob lobus quadratus ile lobus caudatus'un büyük kısmını kapsar (11,15). Sağ ve sol loblar kanlanma ve safra drenajı yönünden bağımsızdır, buna göre karaciğer sekiz segmente ayrılmıştır; ayrıca lobus caudatus %80 olguda her iki loblada bağlantılıdır (14,15). Segmentasyon, sağ ve sol a. hepatica propria dextra ve sinistra, v. portae hepatis ve duktus hepaticus'un ana dalları göz önüne alınarak yapılır (15).

Karaciğere akan kan, kalp debisinin yaklaşık %25'i kadardır. Ayrıca karaciğer vücudun toplam kanının %15'ini içerir. Kanamalarda hepatik kan akımının yaklaşık yarısı kapasitans damarların kasılması ile hızlıca dışarı verilir (16). Karaciğer, a. hepatica propria (%20 - %30) ve v. portae hepatis (%70 - %80) olmak üzere iki kaynaktan beslenir. Venöz drenajı hepatica venüller ile sağlanır. Santral venüllerin birleşmesi ile oluşan hepatica venüller genelde üç tane olup diafragmanın hemen aşağısında vena cava inferior (VCI)'a açılırlar. Hepatik venler intrahepatiktir. Karaciğeri VCI'ye asan bu venler karaciğerin pozisyonunda kalmasına yardımcı olur

(10,14,15). Karaciğer, ductus thoracicus'a gelen lenf sıvısının %25-%50'sini üretir. Karaciğerin lenf damarları yüzeysel ve derin olmak üzere iki grupta toplanır. Yüzeysel olanları Glisson kapsülünde, derin olanları ise karaciğer damarları etrafındaki bağ dokusu içerisinde bulunur (15). Yüzeysel lenf damarları; VCI'nin terminal kısmında bulunan lenf nodüllerinden, nodi hepatici ve nodi coeliaci'ya açılır. Derin grup lenf damarları ise, VCI'nin terminal kısmında bulunan lenf nodüllerine ve nodi hepatici'ye açılır (13). Karaciğerin lenfatik drenajı esas olarak nodi hepatici → nodi coeliaci → cisterna cheli → ductus thoracicus şeklindedir (14).

Karaciğerin innervasyonu plexus hepaticus ile sağlanır. Plexus hepaticus, plexus coeliacus dan köken alan en büyük sekonder otonom plexustur. Sempatik lifler vazokonstriktördür. Diğer liflerin karaciğerdeki fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir (10,14,15). Hepatik arterin vazokonstriktör sinirleri, karaciğerin sempatik plexusundan geldiği bilinmekte ise de karaciğere vazodilatatör liflerin geldiğine dair bir bilgi yoktur (17).

Safra kesesi (vesica biliaris); karaciğerin visseral yüzündeki fossa vesicae biliarise yerleşmiş, 7-10 cm uzunluğunda, armut şekline benzeyen ve safranin konsantre hale getirilip depolandığı bir organdır. Fundus, collum ve corpus olmak üzere üç kısma ayrılır (15). Fundus, kesenin genişlemiş alt bölümüdür ve karaciğerin alt kenarını aşar. Corpus, karaciğerin visseral yüzüne temas eder. Collum ise içyana ve aşağıya dönerek porta hepatis'e doğru ductus cysticus ile uzanır. Safra kesesi ve salgı kanallarının duyusunu sağ nervus phrenicus alır. Bu sinir lifleri plexus coeliacus vasıtasıyla organa ulaşır. Buna bağlı olarak kese patolojilerinde yansıyan ağrı sağ omuzda hissedilir. Parasempatik uyarı, safra kesesinde kasılma, oddi sfinkterinde gevşemeye yol açar. Sempatik lifler ise sfinkterlerin kasılmasını sağlar. Safra kesesinin boşalma mekanizması sinirsel kontrolden çok hormonalıdır. Ağıza yiyecek alındığında ve yağ içeren besinlerin duodenuma teması ile salgılanan kolesistokinin; safra kesesinde biriken safranin basıncı 100 mmH₂O'yu aştığı zaman safra kesesindeki düz kasların kasılmasına neden olur, oddi sfinkteri gevşer ve safra duodenuma akar (14,17,18,19). Safra kesesi duvarındaki düz kas lifleri kasıldıkları zaman keseyi tamamen boşaltacak güçte değildir. Musculus sphincter ductus choledochi'nin ritmik kasılmaları sonucu oluşan vakum ve kesenin konumu sayesinde kese boşalması kolaylaşır (18).

Hepatositler tarafından üretilen safra; hepatositlerin aralarında yerleşik, duvar yapıları olmayan, dar aralıklı, hücrelerarası boşluklar olan safra kanalcıklarına (canaliculus biliferi) geçerler. Bu kanalcıklar lobüllerin periferinde birleşerek intralobüler kanalcıkları (Hering kanalları) oluşturur. Bunlarda birleşerek fonksiyonel olarak karaciğerin sağ ve sol loblarını drene eden sağ ve sol hepatik kanalları oluşturur. Bu iki kanal, porta hepatis'te birleşerek yaklaşık 3 cm uzunluğundaki ductus hepaticus communis'i yapar. Sistik kanal safra kesesini boşaltır. Hepatik kanal sistik kanalla birleşerek ortak safra kanalını (ductus choledochus, ductus biliaris) oluştururlar ve bu kanal duodenuma, duodanal papilladan girer. Bu giriş etrafında oddi sfinkteri ile çevrili olup genellikle ortak safra kanalı duodenuma girmeden ana pankreatik kanalla birleşir. Ductus choledochus yaklaşık 8 cm uzunluğunda ve 6 mm çapında olup ligamentum hepatoduodenale içindedir. Ductus choledochus'un distal ucundaki kaslar kalınlaşarak musculus (m). sphincter ductus choledochi'yi oluşturur. Bu sfinkter kasıldığında safra ampulla ve duodenuma geçemeyeceği için safra seviye yaparak safra kesesinde depolanır. Safra kesesinin maksimum hacmi 30-60 ml'dir. Ductus choledochus ve pankreatik kanal (Wirsung kanalı) birleşerek m. sphincter ampulla'yı (ampulla hepatopancreatica, oddi sfinkteri) oluşturur ve duodenum'un ikinci parçasındaki papilla duodeni major (Vater tuberkülü)'un tepesine açılır. Ampullanın distal ucu, safra kanallarının en dar yeri olup, safra taşı tıkanıklarının en sık olduğu bölgedir. Bununla beraber ductus cysticus veya ductus hepaticus'ada yerleşebilir ve epigastrik bölgede safra koliğine neden olur. Safra keseden boşalamazsa kana karışarak tıkanma sarılığına neden olur (9,10, 13,14,15,17,20).

Portal venin dallarından gelen kan sinüzoidler aracılığı ile hepatositlerin arasından geçerek lobülün santral venine akar. Sinüzoid endoteli geniş açıklıklara sahiptir ve plazma karaciğer hücreleri ile sıkı ilişki içindedir. Sinüzoidler arasında tek hepatosit tabakası bulunduğu için karaciğer hücreleri ve plazma arasındaki toplam alan çok geniştir (17). Karaciğerde çok sayıdaki sinüzoid içinden geçen kan son olarak hepatik venler yolu ile karaciğeri tek ederek vena kava yolu ile genel dolaşıma katılırlar. Karaciğerden geçen kan içindeki bakteriler ve genel dolaşıma girebilecek yabancı maddeler karaciğer sinüzoidlerinde bulunan Kupffer hücreleri tarafından uzaklaştırılır (20). Karaciğer böylece barsaklardan gelen ve organizmaya

zararlı olabilecek çeşitli kimyasal maddeler (ksenobiyotikler) ve mikroorganizmalar için kompleks bir filtre görevi yapmaktadır (21).

Sıçan karaciğeri insandakine benzer olarak sol, orta, sağ ve kaudal olmak üzere dört ana loba ayrılır. Karaciğer $4,5 \times 2,5 \times 0,8$ cm boyutlarında olup en büyük lob 350 gr'lık bir hayvanda yaklaşık 4,3 gr ağırlığındaki sol lob olup ikinci en büyük lob olan 3,4 gr ağırlığındaki orta lobla birlikte tüm karaciğer in yaklaşık %70'ni oluşturur. Orta lobda ligamentum teres hepaticus'un oluşturduğu derin bir yarık bulunur. Sağ lob 2,6 gr ağırlığında olup birleşik inferior ve süperior kısımları vardır, inferior kısmı vena cava inferior'u sarar ve burası diseksiyonla kolayca ayrılamaz. Sağ lob portal venin arkasında 1,2 gr ağırlığındaki kaudal lobla birleşir. Kaudal lob özefagusu at nalı şeklinde saran tek bir yapı olmasına rağmen ön ve arka segmentler şeklinde tanımlanır. Sıçanlarda da karaciğere kan hepatik arter ve portal ven olmak üzere iki kaynaktan gelir. Dönen kan ise karaciğerin içinden geçen vena cava inferior yolu ile boşalır. Vena cava inferior'un karaciğerin aşağısında kalan ve alt taraf kanını toplayan kısım infrahepatik, karaciğerin yukarısında kalıp diyaframı delerek toraksa giren kısmı ise suprahepatik olarak tanımlanır. Sıçanlarda farelerin aksine safra kesesi yoktur. Hepatik kanal karaciğer hilusundan çıktıktan sonra portal veni çaprazlayıp pankreas kanalları ile birleşip duodenuma bağlanır. Sıçanlarda hepatik kanalın bağlanması takiben 3-6 gün arası serum ve idrar bilirubinlerinde geçici bir yükselme olmasına karşın, bilirubinler 10-15 gün sonra normal değerlere yaklaşırlar (22).

2.2 Fizyoloji

Karaciğer, yaşamsal birçok işlev yapar. Karaciğer metabolizmanın düzenlenmesi, plazma proteinlerin, büyüme faktörü, hormon ve vitamin üretimi, A, D, B₁₂ gibi vitaminlerin ve demirin depolanması; hormonların, ilaçların ve toksik maddelerin parçalanarak inaktif metabolitlere dönüştürülmesinde görev alır. Karaciğer ayrıca protein metabolizmasında, esansiyel olmayan aminoasit yapımında görev alır (16). Bir diğer görevi de metabolizmaya katılan safranin yapımıdır. Karaciğer hepatositlerinde üretilen safranin iki önemli işlevi vardır. Birincisi, yağların sindirimi ve emilimi, diğeri ise kandan bilirubin ve kolesterol gibi çeşitli önemli yıkım ürünlerinin atılmasıdır (20). Safra kolesterolün dışarı

atılmasının tek yoludur. Bu şekilde karaciğer hücreleri serum kolesterol düzeyinin düzenlenmesinde önemli görev alır. Her gün duodenuma, 250 – 1500 ml arasında safra girer (16). Safra üretimi sürekli olurken safra sekresyonu gıda alınımı ile uyarılan barsaklardan salınan kolesistokinin hormonunun safra kesesini kasma ve oddi sfinkterini gevşetmesi ile gerçekleşir. Fizyolojik koşullarda yiyecek alımı olmazken, Oddi sfinkteri kapalıdır. Safra, safra kesesinde depolanır, burada suyun emilimi ile safra yoğunlaştırılır. Karaciğer safrasının su oranı %97 iken safra kesesinde bu oran %89'a düşer. Safra yapımı, vagus sinirinin uyarılması ve safranin su ve bikarbonat (HCO_3^-) içeriğini artıran sekretin hormonu aracılığı ile de artırılır. Koleretikler safra salgısını arttırırlar, safra tuzları en önemli fizyolojik koleretiktir (17). Portal kandaki safra asitleri, karaciğer hücreleri tarafından safra asitlerinin alınmasını ve yeniden salınmasını uyarır, fakat yeni safra asidi yapımını engeller. Her gün tüm safra asitinin yaklaşık %15 - %35'i dışkı ile atılır. Tek bir öğünde tüm safra asit havuzu (1,5 – 31,5 gr) diyetdeki yağ miktarına bağlı olarak 2-6 kez genel dolaşıma verilir. Sekretin bikarbonatça zengin sıvı üretmek için safra kanallarını uyarır (16). Sinüzoidlerle birleşen hepatik arter dallarındaki ortalama basınç 90mmHg dir. Sinüzoidlerdeki basınç, portal venöz basınçtan düşük olduğundan, hepatik arteriyoller boyunca basınç belirgin olarak azalır. Bu basınç düşüşü, hepatik arteriyel kan akımı ile portal venöz kan akımı arasında ters bir ilişki olacak şekilde ayarlanır. Bunu sağlayan ise metabolizmada sabit hızda üretilen adenozinin portal akımın azalmasına bağlı olarak uzaklaştırılamaz ve bölgesel olarak biriken adenzin uç arteriyollerin gevşemesine neden olur. İnsanda portal venöz basınç 10mmHg ve hepatik venöz basınç yaklaşık olarak 5mmHg'dır (17).

Günde yaklaşık olarak 500ml salgılanan safra enterohepatik dolaşım ile bağırsaklardan geri emilerek karaciğer tarafından tekrar salgılanır. Safra tuzları, safra pigmentleri ve pankreatik sıvıya benzeyen alkali elektrolit çözeltisinden oluşmuştur. Büyük çoğunluğu su olan safranin altın rengi görünümünden, hemoglobin'in yıkım ürünleri olan bilirubin ve biliverdin sorumludur (17).

Safra kanallarının tıkanmasında, bilirubin oluşumu normaldir ancak oluşan bilirubin kandan bağırsaklara geçemez. Serbest bilirubin karaciğer hücrelerine geçerek konjuge (bağlı) hale çevrilir. Konjuge bilirubin ya dolgun safra kanalcıklarının yırtılması ile kana geçer ya da doğrudan lenf damarları ile

karaciğerden ayrılır. Plazmada bulunan bilirubin çoğunlukla konjuge tiptedir. Safra akımının tam tıkanmasında safra bağırsaklara hiç akmadığından, bakteriler tarafından ürobilinojene çevrilemez ve idrarda gözlenmez. Dışkı, safra pigmenti içermediği için beyazdır. İdrarda önemli miktarda konjuge bilirubin gözlenir (20). Barsak içeriğinde safra bulunmadığı zaman yemeklerle alınan yağın %50'si emilemez ve bu durum yağda eriyen A, D, E, K gibi vitaminlerin ciddi eksikliğine yol açar (16,17).

2.3 Histoloji

Vücudun en büyük organı olan karaciğer yaklaşık olarak 1500gr ağırlığındadır. Karaciğerin fonksiyonel ünitesi birkaç mm uzunluğunda 0,8-2mm çapında ve silindirik yapıda olan 50.000-100.000 adet bulunan karaciğer lobülüdür (20). Karaciğer lobül yapısının üç adet kavramsal değerlendirilmesi bulunur. Bunlar yapısal parametrelere dayalı karaciğer lobülünün klasik kavramı, diğeri portal lobül kavramı ve sonuncusu karaciğer asinusu kavramıdır. Karaciğer lobülü birbirleriyle anastomoz yapan ve sinüzoid boşlukları ile çevrili hepatosit plaklarından oluşmaktadır. Karaciğer lobülünün ortasında; hepatik arterin ve portal venin dallarından gelen ve sinüzoidlerde birbirine karışan kanı toplayan merkezi bir ven - venül yer alır. Hepatik arterin ve portal venin dalları, safra kanalı ile birlikte altıgen karaciğer lobülünü çevreleyen portal alanda yer alan klasik portal triadı oluşturur (9). Portal lobülde portal triad merkezi eksende yer alıp hepatosit parenkimasından safrayı toplamaktadır. Tüm bu kavramlardan karaciğer asinusu kavramı; karaciğerin yenilenme koşullarını, metabolik aktiviteyi ve siroz gelişimini anlamak açısından daha uygundur (9). Her bir asinüs; iki santral ven arasında yer alan oval bölge olarak tanımlanır (23). Kan, asinüs merkezinden hepatik venlere doğru akar. Arteriyel kanın venöz sinüzoidler boyunca akışı üç bölgeye ayrılır. Portal triad yakınındaki damarlara en yakın olan, asinüs merkezi olarak adlandırılan perisinüsoidal alan birinci bölge olarak tanımlanır. Birinci bölge, oksijen ve besin maddesi yönünden en zengin kısımdır (17). Üçüncü bölge, v. sentralise en yakın olan bölgedir, ikinci bölge ise bu iki bölge arasında yer alır. Toksik madde alımında en çok hasarı birinci bölgedeki hepatositler görürken, hipoksi durumunda ise üçüncü bölgedeki hepatositler en çok etkilenir (9).

Sinüsoid duvarlarını çevreleyen endotel hücreleri arasında, hepatositlere komşu Disse aralığına açılan fenestra denilen geniş boşluklar bulunmaktadır. Bunlar barsaklardan gelen makromoleküllerin hepatosite girişine izin verir. Endotel hücreleri oksidatif hasardan ciddi şekilde etkilenmektedirler (21).

Karaciğerde beş türde hücre bulunmaktadır. Bu hücreler hepatositler, endotel hücreleri, Kupffer hücreleri, stellat hücreler ve safra kanalı epitel hücreleridir. Tüm hücrelerin %80'ini hepatositler oluşturur ve bu hücrelerin hepsi oksidatif stresle ilişkili hücrelerdir (21).

Karaciğerin, endokrin ve ekzokrin görev yapan fonksiyonel hücresi hepatositlerdir. Hepatositler, sinüzoid boşluklar ile çevrili, birbirleriyle anastomoz yapan hücre dizileri oluştururlar. Işık mikroskopik olarak hepatositler; çok köşeli olup çekirdekleri yuvarlak ve merkezde yer alır. Hepatositlerin yaklaşık %25 kadarı çift çekirdek içerir. Çekirdek, heterokromatin ve belirgin bir veya iki tane çekirdekçik içerir. Sitoplazması asidofiliktir. Hepatositlerde, granüler endoplazmik retikulum (GER) yoğun alanlar bazofilik olarak gözlenir. GER albümin ve pıhtılaşma faktörleri ile bazı plazma proteinlerin üretiminden sorumludur. Hepatositlerde, çok iyi gelişmiş düz ER ise glikojenin parçalanmasından, lipid ve safra tuzlarının sentezinden, bilirubinlerin bağlanmasından ve kimyasal maddelerin detoksifikasyondan sorumludur. Hepatositlerin herbiri 2000 kadar mitokondri içerir ve yüksek enerji gerektiren metabolik faaliyetler için önemli enerji kaynağıdır. Peroksizom ve lizozomlar, hepatositlerin perifer bölgesinde yer alan vezikül yapılı yoğun cisimcikler olarak gözlenir. Lizozomlar, hücre içi organallerin yıkımı ve dönüşümü için gereklidir. Peroksizomlar, membranla sarılmış olup hidrojen peroksit açığa çıkartan yüksek miktarda oksidaz içermektedir. Golgi kompleksi çekirdek çevresinde ve safra kanalcıklarının yakınında yer alırlar, lizozomların oluşumundan ve proteinlerin salgılanmasında görevlidir (9,23,24,25).

Bir hepatositin bazolateral ve apikal bölgesi vardır. Bazolateral bölge çok sayıda mikrovillüs içerip Disse aralığına ve sinüzoid boşluğuna bakar. Bu bölge kan kaynaklı madde emilimi ve plazma proteinlerinin salgılanmasına katkıda bulunur. Disse aralığındaki fazla sıvı, lobül dış kısmında yer alan Mall aralığı tarafından toplanır. Apikal bölge ise; safranin geri kaçışını önlemek için kenarları tıkayıcı bağlantılarla kapatılmış olan safra kanalikülünün kenarlarını saran, mikrovillüslerle

kaplı bir girinti şeklindedir. Safra kanalikülü bu bölgeyi tanımlar. Karaciğer sinüzoidleri, lobül kenarından v. sentralise doğru kan akımına sahiptir ve çapları kapillerden geniştir. Duvarı kesintisiz olmayıp başlıca, endotel ve Kupffer hücresi içerir. Endotel hücreleri sıkı bir yapıya sahip olmayıp sitoplazmalarındaki delikler sayesinde kandan madde geçişine izin verirler. Kupffer hücreleri, kan monositlerinden köken alan, endotel hücreleri arasında bulunan, sitoplazmik uzantıları olan fagositoz yeteneğine sahip hücreleridir. Hepatositleri sinüzoidteki kandan Disse aralığı (perisinüzoidal aralık) ayırır. Bu aralıkta, yoğun madde geçişi gerçekleşir, kollajen ve retiküler lifler yer alır. Disse aralığında, A vitamini metabolizması ve depolanmasında görev alan yıldızlı hücreler (stellat) olarak da adlandırılan ito hücreleri bulunur. Patolojik durumlarda bu hücreler kollajen üreten miyofibroblast benzeri hücrelere dönüşürler. Tip I kollajen dışında; laminin, proteoglikan ve büyüme faktörlerini de salgılar. Disse aralığında hayvan türlerinde görülen ve immün sisteme ait olduğu bildirilen pit hücreleri yer alır (9,23,24).

Safra kanalikülleri, karaciğerin ekzokrin salgısı olan safranin hücreler arası iletildiği kanalcıklardır. Bu kanalcıklar, karaciğer lobülünün plakları boyunca anastomoz yapan kompleks bir ağ oluşturur ve portal alanda sonlanır. Bu nedenle safra, kan akışının tersi yönünde, yani klasik lobul merkezinden periferine doğru akar. Kanalcıkların duvarlarını oluşturan karaciğer hücreleri arasında safra salgısının sızıntısını önleyen zonula adherens (sıkı tipte bağlantı) bağlantı yapıları bulunur. Safra, safra kanaliküllerinden lob içi safra kanalcıklarına oradanda lobül dışındaki Hering kanalını geçerek portal alandaki safra kanallarına veya kanalcıklarına boşalır. Safra kanalcıkları karaciğer içi safra kanallarında birleşirler. Hering kanalı tek katlı yassı epitelden tek katlı kübik epitele değişen bir epitel ile döşelidir. Safra kanalı ise tek katlı kübik epitel ile döşelidir ve belirgin bağ dokusu kılıfına sahiptir. Bu kanallar giderek genişleyip, birleşerek sağ ve sol hepatik kanalları oluşturarak karaciğeri terk eder ve duodenum lümenine açılır (9,23,24).

2.4 Embriyoloji

Karaciğer tomurcuğu üçüncü haftanın ortasında önbarsağın distal ucunda endodermal epitel çıkıntısı olarak belirir. Bu çıkıntı; perikard boşluğu ve yolk sapı

arasında kalan septum transversum (mezodermal plak) içine doğru ilerleyerek çoğalma gösteren hücrelerden meydana gelir. Karaciğer hücreleri mezodermal plak içine girerken karaciğer tomurcuğu ile duodenum arasındaki bağlantı daralır ve safra kanalı meydana gelir. Bu kanalın ön yüzünden meydana gelen küçük bir çıkıntıdan ise safra kesesi ve sistik kanal meydana gelir. Çoğalan endodermal hücreler, hepatik hücre kordonlarını oluşturur. Karaciğer sinüzoidleri ise epitelyal karaciğer kordonlarının vitellin ve umbilikal venlerle karışması ve endotel döşeli boşlukların etrafını ağ şeklinde sarması ile meydana gelir. Hematopoetik hücreler, Kupffer hücreleri ve bağ dokusu hücreleri septum transversum mezoderminden köken alır. Karaciğer çok hızlı büyüdüğünden septum transversuma sığamaz ve kaudale doğru büyüme devam eder. Bu esnada karaciğer ile karın ön duvarı arasındaki septum transversum geriler ve falsiform ligamenti oluşturur. Karaciğerle ön barsak arasındaki septum geriler ve küçük omentumu meydana getirir. Küçük omentum ve falsiform ligament; ön barsakla karın ön duvarı arasındaki bağlantıyı sağlayan ventral mezogastrium olarak tanımlanır. Karaciğer yüzeyindeki mezoderm farklılaşarak üst kısımda küçük bir alan dışında visseral peritonu oluşturur. Üst kısımdaki septum parçası yoğun mezankimal doku halindedir ve diyafragmanın tendinöz parçasını oluşturur. Bu bölgeyle temas eden karaciğer yüzeyi peritonla hiçbir zaman örtülmez ve karaciğerin çıplak yüzeyi olarak bilinir. Başlangıçta ekstrahepatik safra yolları epitel hücreleri ile kapalı iken dejenerasyon ve vakualizasyon sonucunda bu kanallar açılır. İntrauterin yaşamın 10. haftasında karaciğer ağırlığı oranı %10 iken doğumda bu oran %5'e geriler. Karaciğerin parlak kırmızı rengini veren hematopoesis 6. haftada başlar ve 7. ve 9. haftalar arasındaki karaciğer büyüklüğünün sebebidir. Karaciğer hücreleri 12. haftadan itibaren safra üretimine başlar ve üretilen safra koledok kanalı ile barsaklara akarak mekonyuma yeşil rengini verir. Safra kesesini, 3. ayda karaciğer dokusu sarar, sonra bırakır. Bazen karaciğer dokusu keseyi tamamen sarabilir bu durum karaciğer cerrahisi bakımından önemlidir. Önbarsak endodermi karaciğere özgü genleri eksprese edebilme ve karaciğer dokusuna dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Ancak bu ekspresyon; çevre ektodermi, kardiyak dışı mezoderm ve notokord gibi dokulardan salınan bazı faktörler ile bloke edilir. İnhibe edici faktörlerde gelecekteki karaciğer bölgesinde kardiyak mezodermden salgılanan fibroblast büyüme faktörü (FGF)

tarafından bloke edilir. Karaciğerin en sık anomalileri aksesuar hepatik kanallar ve safra kesesi duplikasyonları olmasına rağmen semptom vermezler(26, 27). Dünya genelindeki canlı doğumlarda 5/100.000-32/100.000 oranında ve Asya ile Pasifik bölgesinde en yüksek oranda görülen; safra kanallarının rekanalizasyonu gerçekleşmemesi sonucunda ortaya çıkan ekstrahepatik biliyer atrezi önemli bir anomalidir. 8.000-12.000 canlı doğumda bir görüldüğünü bildiren yayınlar da bulunmaktadır (28,29). Kanallar en sık %85 oranında porta hepatit veya yukarısında tıkanarak sarılığa neden olur. Bu atrezinin %15-20 kadarı erken evrede cerrahi olarak düzeltilebilse de geri kalanı karaciğer nakli olmadan yaşayamaz (26, 27).

2.5 Tıkanma Sarılığı ve Karaciğer Fibrozisi

2.5.1 Etiyolojisi

Tıkanma sarılığında direkt hiperbilirubinemi ön plandadır. Biliyer obstrüksiyonların etiyolojisinde en sık karşılaşılan patolojiler safra yolları taşları, benign yapışıklıklar ve tümörlerdir (7). Biliyer atrezi, primer sklerozan kolanjit ve primer biliyer siroz gibi kolestatik karaciğer hastalıkları, erişkin ve çocuk hastalarda genellikle karaciğer naklini gerektirir (30). Tıkanma sarılığı olan hastalarda safra yollarının cerrahi, endoskopik veya perkutan yollar ile acil olarak basıncın azaltılması hayat kurtarıcıdır. Tıkanma sarılığının morbidite ve mortalitesi yüksektir. Literatürde safra yollarında iltihap bulunan hastaların mortalitesinin taşıdıkları risk faktörlerine göre, %0 ile %28 arasında değiştiği bildirilmiştir (7).

2.5.2 Serbest Radikaller ve Savunma Sistemleri

Safra kanalı tıkanıklığı sonucunda artan safra asidi konsantrasyonunun lipid peroksidasyonu uyarması ve inflamatuvar hücrelerin ve polimorfonükleer lenfositlerin fagositik aktiviteleri uyarılması ilişkili olabilir (31). Serbest oksijen radikal (SOR) bileşikleri bazal membran yapısında bulunan doymamış yağ asitleri olmak üzere diğer hücre bileşenlerinin oksidasyonuna neden olurlar. Okside olan yapılar hücrenin parçalanmasına kadar giden süreci başlatabilir. Oksidan etkiye karşı antioksidan

savunma sisteminde meydana gelen değişikliklerin, kolestaza bağlı hepatik kan akımının azalması ve buna bağlı karaciğer perfüzyon bozukluğunun etkili olduğu ileri sürülmektedir (32).

Serbest radikaller reaktif kimyasal bir türdür. Elektronlar yörünge denen bölgede döner. Serbest radikallerin reaktifliği yörüngelerinde bağlı olmayan paylaşılmamış elektron içermelerinden kaynaklanır. Bu da en sık olarak elektron transfer zincirinde oluşan elektronların transferi ile veya oksidazlar tarafından tek elektron transferi ile oluşur. Bu özelliklerinden dolayı diğer kimyasal bileşiklerden ayrılır (33, 34). Serbest radikaller hücrel bileşenlere zarar vermekte oldukça yeteneklidirler (34). Oksijen (O_2), iki elektronu serbest şekilde elektron dağılımına sahiptir. Oksijen molekülünün reaktif bir özelliği olmamasına rağmen diğer radikallerle reaksiyona girebilir (33). Serbest radikal olan süperoksit (O_2^-), tek bir elektronun O_2 'e eklenmesiyle oluşmaktadır ve O_2^- doğrudan fazla zarar vermez, asıl önemi hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağı olmasındandır. Süperoksit, nötrofillerin bakterisidal aktivitesi, apoptozis, inflamasyon ve vasküler fonksiyonların düzenlenmesi gibi yararlı etkilere sahiptir. Artmış süperoksit düzeyleri ise süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştürülerek azaltılır. Böylece hücrel süperoksit düzeyleri sıkı kontrol altındadır. Hidrojen peroksit (H_2O_2) süperoksit'in tersine membranlardan geçer, sitozole yayılabilir ve uzun ömürlüdür. Aslında radikal olmayan H_2O_2 membranlardan geçtikten sonra süperoksit (O_2^-) ile reaksiyona girerek bilinen en zararlı ve reaktif radikal olan hidroksil (OH) radikaline dönüşebilir (33). Özellikle çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA), SOR'in zararlı etkisinden daha kolay etkilenir ve zincirleme olarak devam eden, lipid yapısında bozukluk ve parçalanmaya yol açan lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Membranlar ÇDYA'dan zengin oldukları için SOR etkisine açıktır ve membranda yapı ve fonksiyon bozuklukları oluşmaktadır (32,35). Lipid peroksidasyonu serbest oksijen radikalleri tarafından başlatılan zar yapısındaki doymamış yağ asitlerindeki metilen gruplarındaki hidrojen atomunun uzaklaştırılması sonucunda zar yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olaydır. Membranda bulunan yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girip peroksidasyona neden olabilir. Lipid peroksidler daha sonra malondialdehid (MDA) gibi yıkım ürünlerine dönüşür.

Bu yıkım ürünleri DNA veya proteinlerle reaksiyona girebilir ve mutasyona neden olur. Spesifik olmamasına rağmen MDA lipid peroksidasyonunun şiddetiyle orantılı olarak artar (33,36). Safra kanalı ligasyonu sonucunda oluşan karaciğer zedelenmesinde prooksidan ve antioksidan dengedeki bozuklukların önemli bir rol oynadığı ileri sürülmektedir (32,37). Oksidatif strese, normalde dengede olan serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki denge bozulmuştur ve serbest radikaller artar (33). Hepatosit mitokondrisi ROS'un tek kaynağı değildir. Sitozolde bulunan P450E1 (CYP2E1) mikrozomal oksidasyon sistemi de özellikle aşırı alkol alımında ve ilaç metabolizmasındaki uyarılar ile ROS üretebilmektedir. Hepatositin alkol, ilaç, hipoksi, viral enfeksiyon, staz gibi çeşitli nedenlerle strese maruz kalmasıyla serbetleşen oksijen radikalleri, antioksidan defansın koruma kapasitesini aştığında hücre hasarı ve ölümüne yol açabilmektedirler (21).

Normalde alınan O_2 'nin yaklaşık %5'i SOR'a dönüşür (38). Serbest radikallerin bu zararlı etkileri, bazı maddeler tarafından azaltılabilir veya tamamen ortadan kaldırılabilir. Dokularda, oksidatif hasara karşı enzimatik ve nonenzimatik antioksidan mekanizmalar vardır. Antioksidan enzim sistemleri, bakır-çinko süperoksit dismutaz (CuZnSOD), manganez süperoksit dismutaz (MnSOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleridir. Enzimatik olmayan endojen antioksidanların en önemlilerinden biri glutatyon (GSH)'dur (39). Radikallerin oluşum hızı, bunları etkisiz hale getiren savunma sistemlerinin hızı ile dengede olduğu sürece, organizma etkilenmez. Ancak bu denge bozulduğunda serbest radikaller zararlı etkilerini gösterir (38). Aşırı SOR'in oluşumu artmış nekroz ve inflamasyondan sorumludur. SOR, başta tümör nekroze edici faktör- α (TNF- α) olmak üzere çeşitli sitokinlerin yapımına neden olmaktadır. TNF- α hem apoptozise hem de nekroza neden olur. SOR ayrıca, transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β)'yı artıran lipid peroksidasyonuna da neden olur. TGF- β da hücre iskelet proteinlerine çapraz bağlanacak doku transglutaminazını aktifler. Bu etki muhtemel olarak karaciğer yağlanmasıdaki Mallory cisimciklerin oluşumunda rol oynar (40).

2.5.3 Fizyopatoloji

Klinik ve deneysel çalışmaların sonuçları uzamış safra kanal tıkanıklıklarının karaciğer dokusunda fibrotik ve sirotik değişikliklerin nedeni olduğunu göstermektedir (31). Akut hasar sonucunda parankimal hücrelerdeki rejenerasyon yeterli olurken, kronik hasarda rejenerasyon yeterli olmaz (41). Sonuçta kollajen fibriller içeren bol miktarda ekstra sellüler matriks (ECM) parankim dokunun yerini alır (4). Safra kanalı ve sistik kanal bağlandığında, safra yolları içi basınç 30 dakikada yaklaşık 320 mmH₂O'ya yükselir ve safra salgılanması durur. Buna karşın, safra kanalı bağlanıp sistik kanal açık bırakıldığında, su kesede geri emilir ve safra yolları içi basıncı birkaç saat içinde sadece 100 mmH₂O'ya yükselir (17). Obstruktif tipteki safra yolu tıkanıklığında; safra akışının azalmasına bağlı olarak kanal basıncı artar ve bu süreç safranin karaciğerde birikimi ile karakterize kolestazis ile sonuçlanır (42,43). Artmış safra basıncının hasar verici etkisiyle birlikte safra tuzlarının birikiminin toksik etkileri karaciğerde dejenerasyona yol açar (44). Burada bilirubin oluşumu normal olmasına karşın oluşan bilirubin kandan bağırsaklara geçemez (20). Kolanjiokarsinoma, safra kesesi karsinomu, safra taşı ve primer sklerozan kolanjit kaynaklı biliyer obstruksiyon ile sonuçlanan kolestazis; böbrek yetmezliği, karaciğer yetmezliği ve multiorgan disfonksiyonu sendromu gibi sonuçlar ortaya çıkarılabileceğinden cerrahi ve enfeksiyon açısından yüksek risk faktörüdür. Bundan başka, tıkanma sarılığindeki organ disfonksiyonunda; nötrofillerin kemotaktik aktivitesi, süperoksit üretimi, adezyon moleküllerinin ekspresyonu, sinüzoidal endotel hücre hasarı ve apoptozis esas rolü oynamaktadır (45). Ekstrahepatik tıkanmalı hastalardan alınan biyopsi örneklerinde portal alanların %82'sinde safra kanallarının etrafında bazal membrana komşu nötrofil infiltrasyonu bulunmaktadır (44).

Etiyolojik faktör ne olursa olsun karaciğer fibrozisinde; hyaluronik asit, fibronektinler, proteoglikanlar gibi matriks glukokonjugantları ile özellikle Tip I kollajenlere bağlı ortaya çıkan karaciğer skar organizasyonu ECM bileşenlerinin üretiminin artması ile karakterizedir (6).

Safra kanalı ligasyonu yapılan deneysel çalışmalarda portal bölgedeki bağ dokunun önemli derecede arttığı, safra yollarındaki basınç artışı sonucunda safra

kanalı epiteli ile hepatositlerde proliferasyonunun arttığı, inflamatuvar hücrelerin arttığı, dejenerasyon ve nekrosis ile karakterize sirotik değişikliklerin meydana geldiği gözlenmiştir (43). Staza bağlı olarak ortaya çıkan en erken değişiklikler, portal bölgede ödem ve inflamasyonu takiben perivenuler bilirubin birikimidir. Portal alandaki ödem, kollajen liflerin kanal çevresinde ortak merkezli lameller şeklinde yerleşimine neden olur (45). Tıkanıklık sonucu; safra kanallarında oluşan dilatasyon, hücrelerdeki mitokondri yapılarının dağılmasına ve vakuolizasyonun artmasına neden olmaktadır (46). Dokuda açığa çıkan sitokinler, fibrozis ve nekrozis gibi değişik patolojik durumların gelişimini uyarır (47). Uzamış tıkanma kolestazı, hepatositlerde köpüksü dejenerasyonun yanı sıra parankimde odaksal hasara neden olarak safra birikintisine yol açar (3). Kronik kolestatik bozukluklar sonucunda ise fibrotik doku portal kanallar etrafında artış gösterir (4). Kolestaziste, hepatositler şişkin ve yuvarlak biçimde olup sınırları belirgindir ve sitoplazmaları açık olup perinükleer ve membranöz ağ benzeri yapılar içerebilirler (44).

Karaciğer fibrozisinin oluşmasında normal karaciğerde sakın olan hepatik stellate hücrelerinin (HSC, ito, yıldızlı hücre) aktivasyonu birincil olarak sorumlu tutulmaktadır (9). Fibrotik karaciğer dokusunda açığa çıkan trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) , HSC için en güçlü mitojendir (6,48). Kupffer hücreleri tarafından üretilen serbest radikaller, lipid peroksidasyonu harekete geçirir ve hücre membran yapısında geri dönüşümsüz değişiklikler yaparak doku hasarına neden olur. Serbest radikaller, doku hasarının bir göstergesi olmakla birlikte, stellat hücrelerin uyarımı ile de kollajen sentezini arttırarak patolojik sürece aracılık ederler (5).

Lipid peroksidasyon ve nötrofillerden üretilen SOR ürünleri stellat hücrelerini uyarak kollajen sentezini arttırabilmektedir (49). Karaciğer hasarını başlatan TNF- α hem diğer sitokinlerin üretimini tetikler hem de interlökin 1 ile birlikte HSC proliferasyonunu uyarak HSC'den Tip I kollejen üretimine neden olur (6,9). Fibrozisin şiddetlenmesinde TNF- α 'nın karaciğer ve plazma değerlerinin birlikte artışı gözlenmiştir. Bir başka profibrotik sitokin olan İnterlökin-1 beta (IL-1 β) miktarı da karaciğerde artmıştır. Sonuç olarak karaciğer sirozu sürecindeki fibroziste açığa çıkan TNF- α , İL-1 β ve İFN- γ gibi sitokinler kollajen sentezi için HSC'lerin aktivasyonunu uyarır ve hızlandırır (47). Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β 1) ve PDGF sitokinlerini salgılayan Kupffer hücreleri ile mononükleer

hücreler gibi inflamatuvar hücreler ve endotel hücreleride fibrozis oluşumuna katılırlar (5,50,51). TGF- β_1 , HSC'nin miyofibroblast benzeri hücelere dönüşümünü destekler, ECM protein sentezini stimüle eder, yıkımını inhibe eder (3,6,47,52). Tip 4 kollajen, fibrinojen, urokinaz tip plazminojen aktivatörleri TGF- β_1 gibi latent sitokinleri aktive ederek bölgesel HSC'leri uyarır (53). Aktive HSC'ler; α -SMA ve prokollagen I ile bilinen kollajenlerin ve fibroziste biriken matriks proteinlerinin ana kaynağıdır (54). Bunun yanısıra hepatosit tarafından salgılanan metalloproteinaz I ve III düzeylerindeki azalmayla kollajen liflerin yıkımını azaltmaktadır (55). Makrofajlarda bulunan peroksizom proliferatör aktivatör reseptör gamma (PPAR- γ); HSC'lerden kollajen ve α -SMA sentezinin aktivasyonunu engeller. Antidiyabetik olan Tiazolidion'un toksik ve kolestatik modellerde PPAR- γ uyarısı ile karaciğer fibrozisini düzelttiği gösterilmiştir (56,57).

Kupffer hücrelerinde bulunan sağkalım faktörü de denilen NF- κ B (transkripsiyon nükleer faktör kappa B) sisteminin protein kinaz C ile uyarılması sonucu ortaya çıkan sitokinler ile uyarılan hepatositler, çeşitli zararlı etkenlere karşı immün sistemi ve antiinflamatuvar cevabı harekete geçirirler. TNF- α gibi sitokinlerin aşırı ve sürekli salgılanması, paradoks olarak hepatositlerdeki hasar nedeni olabilir. Hepatositte (mitokondri veya CYP2E1'de) oluşan SOR, Kupffer hücrelerini uyararak TNF- α ve diğer inflamatuvar sitokinlerin salınımına ve fagositik aktivitelerinin artmasına yol açmaktadır. TNF- α ile mitokondrial ATP tüketilerek, caspase sistemi aktive olmakta ve hepatosit apoptoza uğramaktadır. Ancak SOR düzeyi yükseldiğinde caspase sistemi devre dışı kalır ve nekroz tarzında, daha zararlı geri dönüşümsüz hücre ölümü meydana gelir. Oksidatif strese yanıt olarak Kupffer hücresi fazla miktarda nitrik oksit (NO) üretir (21,45,58). SOR bileşiklerinden biri olan NO, nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesi ile arjinininden üretilir (35). NO serbest oksijen radikallerini bağlayarak oksidatif stresin zararını sınırlandırmasına katkıda bulunurken, bu bağlanma esnasında oluşan daha güçlü radikal olan peroksinitratın lipid peroksidasyona yol açabileceği vurgulanmaktadır. Kupffer hücreleri bunun yanında antijen sunan hücre olarak da görev yapar ve hücrel immunitiyi aktive eder (21). Yapılan çalışmalarda NO'nun glikojen sentezini inhibe edebildiği gösterilmiştir (46,59).

2. 6 TEDAVİ, ANTİOKSİDANLAR, ANTİFİBROTİKLER

Fibrozisin tedavisinde, primer hasarın ortadan kaldırılması en iyi antifibrotik tedavidir. Primer hastalığın ortadan kaldırılamadığı durumlarda fibroziste belirleyici olan HSC aktivasyon basamaklarından herhangi birinin durdurulması hedeflenebilir (52). Fizyopatolojik olarak fibrozis oluşumunda katkısı olan diğer basamaklar inhibe edilerek, patolojik süreç durdurulabilir, hatta geri döndürülebilir.

2.6.1 N-Asetil Sistein

Thiol bileşiği ve glutatyonun prekürsörü olan NAC, intrasellüler karaciğerde glutatyon S-transferaz aktivitesini arttırarak ve doğrudan hareket etkileriyle serbest oksijen radikallerini, hidroksil radikallerini ve hipoklorik asidi esas indirgeyicisi olarak temizleyerek hepatositlerin reaktif oksijen molekülleri üretimini baskılar ve karaciğeri oksidatif strese karşı korur. Bu aktiviteler ajanın; antioksidan, antienflamatuvar, antikarsinojenik ve antimutajenik etkilerinin temelidir. Antioksidan etkisinin glutatyon sentezini stimüle etme özelliğinden kaynaklandığına inanılmaktadır. Bu da hepatositlerin reaktif oksijen molekülleri üretimini baskılayarak, karaciğeri oksidatif strese karşı koruyarak değişik seviyelerdeki oksidatif stresi toksik bir etki yapmadan azaltır (39,60-65). Nitrik Oksit'i stabilize ederek serbest radikaller tarafından oluşturulan doku hasarına karşı koruyucu etki de gösterir (66,67). NAC'ın faydalı etkilerinin diğer sebepleri de, sitokin üretimini düzenlemesi ve karaciğer kan akımını arttırması olabilir (68). NAC'ın antiinflamatuvar özelliklerinin; sitokinlerin salınımını baskılayarak, adezyon moleküllerinin serbestlenmesini ve nükleer faktör kappa B'yi inhibe etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (69). NAC; parasatamol, mantar, CCL₄, karbonmonoksit ve kloroform zehirlenmelerinde antidot olarak da kullanılır (8,68,70,71,72). N-asetil sistein tedavi edici olarak; endotel disfonksiyonunun, inflamasyonun, fibrozisin, kıkırdak erezyonunun azaltılması, transplantasyon sürelerinin uzaltılması amacıyla da kullanıldığı bildirilmiştir (73).

2.6.2 Askorbik Asid

Bir başka antioksidan madde ise askorbik asid (C vitamini) olup, hidrofilik ve ekstrasellüler sıvıdaki en önemli oksijen radikali toplayıcısıdır. Radikalleri sıvı fazında yakalar ve biomembranları peroksidatif hasardan korur. Hücre içinde antioksidan etki gösterir (74,75). Vitaminler içinde en labil olan vitamindir, asidik ortam dayanıklılığını arttırır. Hidrojen peroksid (H_2O_2), süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($\cdot OH$), alkoksil radikalleri ($RO\cdot$), Singlet oksijen (O_2), peroksil radikallerini güçlü bir şekilde bağlayarak inaktive eder. İndirgeyici bir özellik gösterir. Plazma lipidleri ile yapılan incelemeler, peroksil radikali oluşmasını indükleyen maddelerin yapıldığı lipid peroksidasyonu inhibe eden en önemli plazma komponentinin askorbik asit olduğunu göstermiştir. Bu şekilde zar yapılarını ve DNA'yı peroksidatif hasardan koruyabilir. C vitamini ayrıca kollajen sentezinde, prolin ve lizinin hidroksiprolin ve hidroksilizine dönüşümünde rol alır. Yara nedbeleşmesini hızlandırır (76).

2.6.3 Rapamisin

Kimyasal formülü $C_{51}H_{79}NO_{13}$ olan Rapamisin (Sirolimus) 1999 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayı almış olup günümüzde kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Kemoterapik ajan olarak, organ transplant reddine karşı, kardiolojide uygulanan stentlerin açık tutulmasında, kornea yanıkları tedavisinde tedavi amacıyla kullanılmış, pek çoğunda da olumlu sonuçlar alınmıştır. Düşük dozlarda ($0,25mg/kg/gün$) yalnızca immunsupresif etki gösterirken, daha yüksek dozlarda ($0,5mg/kg/gün$) bu etkilere antifibroblastik, antiproliferatif ve neovaskülarizasyonu önleyici etkileri tespit edilmiştir. Son yıllarda saptanan kompleksin diğer bir hedefi de TGF- β reseptörü olup, burada inhibisyon etkisi gösterdiği düşünülmektedir (40,77). *Streptomyces hygroscopicus* tarafından üretilen makrosiklik bir antibiyotik olan rapamisin klinik pratikte ilk olarak immünsüpresif olarak kullanılmıştır. Rapamisin safra kanal ligasyon'lu sıçanlarda karaciğer fibrozisini inhibe eder ve portal hipertansiyonu iyileştirir, buna paralel olarak TGF- β , bağ doku büyüme faktörü (CTGF) ve PDGF düzeylerini düşürürerek etki gösterdiği

düşünülmektedir (78). Mammalian Target of Rapamisin (mTOR), protein kinaz yolu ile hücre büyümesi ve çoğalmasını düzenleyen bir komplekstir. Rapamisin mTOR inhibitörüdür. Bu etkisini, immunofilin FK bağlayıcı protein 12 (FKBP-12)'e bağlanarak oluşturduğu kompleksin mTOR ile bağlanması ile gösterir (79, 80). Bir serin-treonin kinaz inhibitörü olan rapamisin, hücre siklusunun G1 fazında duraklamaya ve apoptoza yol açar. Rapamisin, programlı hücre ölümünü ve T hücrelerde apoptozu tetikleyerek immün sistemi bloke eder (81).

NAC, C vitamini ve rapamisinin karaciğer fibrozisi üzerindeki etkileri ile ilgili deneysel çalışmaların sayısı sınırlıdır. Bu nedenle bu tez çalışmasında sıçanlarda deneysel olarak safra kanal ligasyonu yapılarak karaciğer fibrozisi oluşturmak ve NAC, C vitamini ve rapamisinin antiinflamatuvar, antioksidan ve antifibrotik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilebilecek olumlu sonuçlar, safra kanalında akut bir tıkanma sonrasında kesin tedavi başlanana kadar geçecek sürede oluşacak karaciğer hasarını azaltmak veya önlemek için kullanılabilir.

3.MATERYAL VE METOD

Bu deneysel çalışma deney hayvanları etik kurulunun 2007/300-7 sayılı onayı alınarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda, Düzce Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinden temin edilen toplam 36 adet Wistar-Albino cinsi (220-320gr) erişkin erkek sıçan kullanıldı. Tüm denekler 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda normal oda sıcaklığında (22°C) tutuldular. Tüm denekler standart palet sıçan yemi (210kcal/100gr/gün) ile ad libitum beslendiler, musluk suyu içtiler. Düzenli olarak kafes bakımları yapıldı. Deneyde toplam 6 grup oluşturuldu.

Grup 1 (Sham-kontrol) (n=6): Karın boşluğu açılarak koledok kanalı serbestlendikten sonra sadece elle manüple edilerek batın kapatıldı.

Grup 2 (Ligasyon) (n=6): Karın boşluğu açılarak koledok kanalı serbestlendikten sonra, koledok kanalı duodenuma yakın bölgede üst ve alt kısımdan bağlanarak kesildi.

Grup 3 (Ligasyon ve ascorbik asid) (n=6): Ligasyon işlemi yapılan deneklere 100mg/kg/gün dozunda C vitamini (Redoxon®; 500mg/5ml Roche, İsviçre) deney süresince intraperitoneal (ip) verildi.

Grup 4 (Ligasyon ve N-asetil sistein) (n=6): Ligasyon işlemi yapılan deneklere 200mg/kg/gün dozunda NAC (Asist®; Hüsnü Arsan ilaç, %10, 300mg/3ml, Türkiye) deney süresince ip olarak verildi.

Grup 5 (Ligasyon ile ascorbik asid ve N-asetil sistein) (n=6):Ligasyon işlemi yapılan deneklere 100mg/kg/gün dozunda C vitamini ve NAC (200mg/kg/gün) deney süresince ip olarak verildi.

Grup 6 (Ligasyon ve sirolimus) (n=6): Ligasyon işlemi yapılan deneklere 0,5 mg/kg/gün dozunda sirolimus (Rapamune®, 1 mg, Wyeth, Amerika Birleşik Devletleri, ABD) deney süresince oral olarak verildi.

Deney süresi başında ve sonunda tüm deneklerin vücut ağırlıkları tartıldı. Ayrıca deney süresi sonunda karaciğer ağırlıkları tartıldı.

Safra kanal ligasyon işlemi

Sıçanlara operasyon öncesi ketamin (Ketalar®, 10ml, 50mg/ml, Pfizer, ABD) (25mg/kg, im) 50mg/kg/ip, xylazine (Rompun® 50ml, 23.32 mg/ml, Bayer, Almanya) 4mg/kg/ip ile genel anestezi uygulandı. Karın bölgesi tıraşlandı ve povidon-iyot (İsosol®, %10 povidon-iyot, 1 litre, Merkez Laboratuvarı, Türkiye) ile bölge aseptisi sağlandıktan sonra orta hat kesisi yapılarak karın açıldı. Safra ligasyonu işlemi Criado (82) ve arkadaşlarının uyguladığı tekniğe uygun olarak karaciğer lobları ile duodenum arasında yerleşik koledok kanalı açığa çıkarıldı çevre dokulardan temizlenerek tıkanma oluşturmak amacı ile iki yerden 4,0 ipek iplikle bağlandı. Birinci düğüm hepatik kanal kavşağının hemen altından, ikinci düğüm ise pankreatik kanalın giriş yerinin hemen üstünden yapıldı. Sonra bu iki bağlantı arasından kesi yapılarak işlem gerçekleştirildi. Cilt ve cilt altı birbirinden bağımsız olarak devamlı sütürle kapatıldı, yara yerleri enfeksiyon riskine karşı günlük olarak kontrol edilip pansumanları yapıldı. Cerrahi işlem sonrası deneklere enfeksiyona karşı oral olarak 7 gün antibiyotik Sultibac® (Sultamisilin 375mg, Biofarma, Türkiye) verildi. Cerrahi girişim yeri 6-7. günlerde sorunsuz olarak kapandı.

Üçüncü haftanın sonunda deneklere ketamin 50mg/kg/i.p ile anestezi sağlanarak karın orta hattın tekrar açıldı ve VCI'den alınan kan tüpe konularak sıçanlar kurban edildi. Sıçanların karaciğerleri tümüyle çıkarılarak tartıldı. Doku örnekleri, ışık mikroskop ve immünohistokimyasal inceleme için %10'luk formaldehid ve alkol-formole, elektron mikroskopik inceleme için %2,5'lik glutaraldehid solüsyonlarına konularak tespit edildi.

Biyokimyasal İnceleme

Deney sonunda VCI'den alınan kan örnekleri 4000 devir/dakika'da 15 dakika santrafüje edilerek serum elde edildi ve inceleme zamanına kadar -70°C derin dondurucuda saklandı.. Alanin Amino Transferaz (ALT), Aspartat Amino Transferaz (AST), Gama Glutamil Transpeptidaz (GGT), Alkalen fosfataz (ALP), bilirubin, glukoz, albümin ve total protein düzeyleri orjinal kit kullanılarak (Abbott-C8000 Chicago, ABD) otoanalizörde çalışılarak elde edilen veriler istatistiksel olarak çalışıldı.

Işık Mikroskopik İnceleme

Parafin blok hazırlama tekniği

1. Alınan doku örnekleri düzgün şekilde trimlenerek %10'luk formaldehit ve alkol-formaldehit solüsyonlarında, solüsyonlar değiştirilerek 48 saat süre ile tespit edildi.
2. %10'luk formaldehit ile tespit edilen doku örnekleri akan musluk altında 3-4 saat süre ile yıkandı. Alkol- formaldehit tespiti yapılan dokulara yıkama işlemi yapılmadı.
3. % 70'lik alkolde iki saat bekletildi.
4. % 80'lik alkolde iki saat bekletildi.
5. % 96'lık alkolde bir saat bekletildi. Bu aşamadan itibaren alkol- formaldehit tespiti yapılan doku örnekleri takibe alındı.
6. % 96'lık alkolde bir saat bekletildi.
7. % 100'lük alkolde bir saat bekletildi.
8. % 100'lük alkolde bir saat bekletildi.
9. Ksilol I'de bir saat bekletildi.
10. Ksilol II'de bir saat bekletildi.
11. Eşit miktarlarda hazırlanmış Ksilol - parafin karışımında 64°C'de etüvde 30 dakika bekletildi.
12. Parafin I'de 64°C de etüvde üç saat bekletildi.
13. Parafin II'de 64°C de etüvde üç saat bekletildi.
14. Takip edilen dokular kauçuk bloklama kaplarına gömülerek etiketlendi ve sertleşmesi için buzdolabına konularak parafin bloklar hazırlanmış oldu.

Buzlukta yeterince sertleşen parafin bloklardan Leica® RM 2125 RT mikrotom cihazı ve Leica® marka mikrotom bıçakları kullanılarak 4-5 µm kalınlığındaki parafin kesitler alındı. Bu kesitlere genel doku ve fibrozisi değerlendirme için hematoksilin-eozin, bağ dokusu bileşenlerini göstermek için Masson'un trikrom boyası, ve alkol-formolde tespit edilip takibi yapılan bloklardan alınan kesitlerde ise hepatositlerdeki glikojen değerlendirmesi için, Periodik asid schiff (PAS) boyası uygulandı.

Hematoksilen-Eozin Boyama

4-5 µm kalınlığındaki parafin kesitler bir saat 60°C de etüvde bekletildi.

1. Ksilol I'de 2 dakika bekletildi.
2. Ksilol II'de 2 dakika bekletildi.

4. İki kere %100'lük alkolde 1'er dakika bekletildi
5. İki kere %96'lık alkolde 1'er dakika bekletildi.
6. Akan suda yıkandı.
7. Hematoksilen de 3 dakika bekletildi.
8. Akan suda yıkandı.
9. Asit alkole iki kez daldırıldı.
10. Akan suda yıkandı.
11. Amonyaklı suda 10-15 saniye bekletildi.
12. Akan suda yıkandı.
13. %80'lık alkolde 1 dakika bekletildi.
14. Eozin'de 1 dakika bekletildi.
15. İki kere %96'lık alkolde 2'şer dakika bekletildi.
16. İki kere %100'lük alkolde 2'şer dakika bekletildi.
17. Ksilolde 10 dakika bekletildi ve lamel ile kapatıldı.

Masson trikrom boyama

1. 4-5 µm kalınlığındaki parafin kesitler bir saat 60°C'de etüvde bekletildi.
2. İki kere 15'er dakika xylende bekletildi.
3. 10 dakika %100'lük alkolde bekletildi.
4. 10 dakika %96'lık alkolde bekletildi.
5. Distile su'da 3 dakika bekletildi.
6. Kesitler Bouin'in fiksatifinde bir saat 56°C'de etüvde bekletildi.

Bouin Fiksatifinin Hazırlanışı

Pikrik asit	75 ml
% 37'lik formaldehit	25 ml
Glasial asetik asit	5 ml

7. Kesitler 10 dakika soğumaya bırakıldı.
8. Kesitler temizlenene kadar akan suda yıkandıktan sonra distile suya kondu.
9. Kesitler Weigert'in demirli hematoksilen solüsyonunda 10 dakika boyandı.

Weigert'in asit demirli hematoksilen solüsyonunun hazırlanışı:

Stok A solüsyonu	1 gr hematoksilen
	100 ml % 96'lık etil alkol

Stok B solüsyonu 4 ml %29'luk Ferric chlorid
 95 ml distile su
 1 ml konsantre HCl

Stok A ve B eşit miktarlarda karıştırılarak solüsyon hazırlanır.

10. Kesitler temizlenene kadar akan suda yıkandıktan sonra distile suya konuldu.

11. Biebrich- Scarlet Asit Fuksin solüsyonunda 20 dakika bekletildi.

Biebrich- Scarlet Asit Fuksin solüsyonunun hazırlanışı

Önce %1'lik Biebrich- Scarlet solüsyonu hazırlanır.

1 gr Biebrich- Scarlet

100 ml distile su

Sonra %1'lik asid fuksin solüsyonu hazırlanır.

1 gr asid fuksin

100 ml distile su

Bu solüsyonlar aşağıdaki gibi karıştırılarak istenen boya hazırlanmış olur.

%1'lik Biebrich- Scarlet solüsyonu 90 ml

%1'lik asid fuksin solüsyonu 10 ml

Glasial asetik asit 1 ml

12. Distile su ile yıkandı.

13. Fosfomolibdik-fosfotungistik asit karışımı damlatılarak 15 dak. bekletildi.

Fosfomolibdik-fosfotungistik asit karışımı hazırlanışı.

Fosfomolibdik asit 5 gr

Fosfotungistik asit 5 gr

Distile su 200ml

14. Analin mavisi damlatılarak 7 dakika bekletildi.

Analın mavisi hazırlanışı:

Analın mavisi 2.5gr

Distile su 100ml

Glasial asetik asit 2 ml

15. Distile su ile yıkandı.

16. %1'lik asetik asit damlatılarak 2-3 dakika beklendi.

%1'lik asetik asit hazırlanışı:

Glasial asetik asit	1 ml
Distile su	99ml

17. %95'lik alkol'de iki dakika bekletildi.
18. %100'lük alkol'de iki dakika bekletildi.
19. Ksilol I'de 10 dakika bekletildi.
20. Ksilol II'de dakika bekletildi.
21. Lamel ile kapatıldı.

Periyodik Asid Schiff (PAS) boyama

1. 4-5 µm kalınlığındaki parafin kesitler bir saat 60°C de etüvde bekletildi.
2. Ksilol I'de 15 dakika bekletildi.
3. Ksilol II'de 15 dakika bekletildi.
4. 2 dakika %100'lük alkolde bekletildi.
5. 2 dakika %96'lık alkolde bekletildi.
6. 2 dakika %70'lik alkolde bekletildi.
7. Distile su ile yıkandı.
8. %0,5 lik periyodik asid solüsyonunda 7 dakika bekletildi.

%0,5 lik periyodik asid solüsyonu

Periyodik asid	0,5 ml
Distile su	100 ml.

9. Distile su ile yıkandı.
10. Coleman'ın Schiff solüsyonunda 20 dakika bekletildi.

Coleman'ın Schiff solüsyonu

Bir gr bazik fuksin, 60°C'de 200 ml distile su ile karıştırıldı ve kaynama noktasına kadar ısıtılıp soğutuldu. Sonra 2 gr potasyum metabisülfid ve 1 Normalite hidroklorik asit (1N HCl) ilave edilerek 24 saat bekletildi ve 0,5 gr aktif karbon ilave edilerek çalkalandı ve filtre edilerek buzdolabında 4°C'de saklandı.

1 N HCl

Hidroklorik asit % 37'lik(HCl)	83.5 ml
Distile su	916.5 ml

9. 15 dakika akan suda yıkandı.
10. Mayer' in hematoksileni damlatıldı ve 1 dakika bekletildi.

11. 15 dakika akan suda yıkandı.
12. %95'lik alkolde iki dakika bekletildi.
13. %100'lük alkolde iki dakika bekletildi.
14. Ksilol I'de 10 dakika bekletildi.
15. Ksilol II'de 10 dakika bekletildi.
16. Lamel ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal İnceleme

Isık mikroskopisi için hazırlanan parafin bloklardan 5-6µm kalınlığındaki kesitler polizlinli lamlara alınarak karaciğer doku örneklerindeki apoptozisi göstermek için TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) tekniğinden yararlanılarak APOTAG® kiti (Takara, Japonya) kullanıldı. Karaciğer yıldızsı hücrelerini tanımlamak için desmin Ab-1 (Lab Vision, ABD) ve Mouse anti-Actin (Smoot muscle) (α -SMA) (Zymed Laboratories, Lab Vision, ABD) primer antikoları kullanıldı. Hücrelerdeki proliferasyonu belirlemek için Ki-67 (Lab Vision, ABD) primer antikoru ve kanser hücresine dönüşme olasılığı fazla olan hücrelerin proliferasyonunu gösteren β -katenin (Lab Vision, Neo Markers, ABD) primer antikoları kullanılmıştır.

Ki-67 İmmünboyaması

Tümörlerin prognozunu göstermede kullanılan proliferasyon belirleyicisi olan Ki-67 çoğalan hücrelerde eksprese edilir. Bu antikor, özellikle siklusun G1, S, G2 ve M fazlarındaki hücrelerin çekirdeğinde yer alan bir antijen olan Ki-67 epitopuna karşı gelişir (83,84). Ki-67 (+) boyanan hücrelerin sayımı x40 büyütme ile her denek karaciğerinden 10 adet alan sayılarak yapılmıştır.

β -katenin İmmünboyaması

β -katenin; src ve wnt-1 protoonkogenleri tarafından aracılık edilen sinyal iletim yollarının ortak hedefidir. Wnt/ β -katenin yolağı; karaciğer fizyoloji ve patolojilerinde değişik temel hücresel olayların düzenlenmesinde, embriyojik karaciğer gelişiminde, morfogeneziste, organagenezis ile karaciğer yenilenmesinde ve bazı karaciğer kanserlerinde rol alır. Erken postnatal karaciğer gelişiminde β -katenin aktivasyonu rapor edilmiştir (85). Normal yetişkin karaciğerinde

immünreaktivitesi homojen ve boyanma şiddeti safra kanal hücreleri ve hepatositlerin membranlarında lokalizedir.

İmmünohistokimyasal boyama

Polizinli lamalar üzerine 3-4 µm kalınlığında alınan dokular 1 gece boyunca 37°C de ve 1 saat 54°C’de etüvde bekletildi.

1. Üç defa beşer dakika xylende bekletildi.
2. Pappen ile etüvden çıkınca çizildi.
3. On dakika %100’lük alkolde bekletildi.
4. On dakika %96’lık alkolde bekletildi.
5. Üç dakika distile suya alındı.
6. Fosfat tampon solüsyonu (PBS)’te yıkandı.
10. İstenmeyen zemin boyamalarını engellemek amacıyla Peroxide Block damlatılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
11. Beş dakika PBS te yıkandı.
12. Nonspesifik boyamaları engellemek amacıyla Super Block (UV block) damlatılarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
13. Yıkama işlemi yapıldıktan sonra primer antikorun epitopuna bağlanması amacıyla, primer antikorlar dokunun tamamını örtecek şekilde damlatıldı. İnkübasyon süresi α -SMA için 45 dakika desmin için 30 dakika olarak uygulandı.
14. Beş dakika PBS te yıkandı.
15. Primer antikordan sonra oluşan bağlanmayı reaksiyonu devam ettirmek, HRP aşamasından önce uygun bağlanma ortamını hazırlama amacıyla, Sekonder antikor olarak Biotinylated Goat Antipolyvalent Antibody dokular üzerine damlatılarak 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
16. Beş dakika PBS te yıkandı.
17. Epitop bağlanmalarının tamamlanması, kromojen için uygun ortam oluşturmaları amacıyla Horse Radish Peroksidaz (HRP) enzimi ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
18. Beş dakika PBS te yıkandı.
19. Antikor- epitop bağlanması renklendirilerek görünür hale getirmek amacıyla diaminobenzidin (DAB) kromojen dokularının üzerine damlatılarak 15 dakika inkübe edildi.

20. Üç dakika distile suya kondu.
21. Mayer hematoksilen ile 1 dakika zıt boyama yapıldı.
22. İki dakika distile su ile yıkandı.
23. 15-20 saniye amonyaklı su da tutuldu.
24. Beş dakika çeşme suyu ile yıkandı.
25. Su kurulandı.
26. %95 alkolde 15 dakika bekletildi.
27. Etüvde 15-20 dakika bekletildi.
28. Ksilol I'de 10 dakika bekletildi.
29. Ksilol II'de 10 dakika bekletildi.
30. Lamel ile kapatıldı.

TUNEL

Polilizinli lamalar üzerine 3-4 mikron kalınlığında alınan dokular bir gece boyunca 37°C de sonra 1 saat 54°C'de etüvde bekletildi.

1. Üç defa beşer dakika ksilolde bekletilir kuruduktan sonra pappen ile çizildi.
2. 10 dakika %100 alkolde bekletildi.
3. 10 dakika %96 alkolde bekletildi.
5. Üç dakika distile suya kondu.
6. PBS' te yıkandı.
7. 10-20 Mg/ml Proteinase K'de 15 dakika oda ısısında bekletildi.
8. PBS ile yıkandı.
9. Peroxide Plock (H₂O₂)da 10 dakika Oda sıcaklığında bekletildi. (Amaç istenmeyen zemin boyamalarını engellemek)
10. PBS ile yıkandı.
11. Her lam için 5 µl terminal deoksinukleotidil transferaz (TdT) ve 45 µl labeling safe buffer boyama reaksiyon karışımını buz üzerinde hazırlanarak damlatıldı ve 60-90 dakika bekletildi.
12. Üç defa beşer dakika PBS ile yıkandı.
13. 70 µl Anti Fluoresan izotiyosiyanat (Anti FITC) HRP konjugatta 37°C de 30 dakika bekletildi.
14. Üç defa beşer dakika PBS ile yıkandı.

15. Antikor- epitop bağlanması renklendirilerek görünür hale getirmek amacıyla DAB kromojen dokularının üzerine damlatılarak 20 dakika inkübe edildi
16. Distile suyla yıkandı.
17. %3'lük Metil green ile 5-10 dakika boyandı.
18. Distile suyla yıkandı.
19. İki defa absolut asetona daldırıldı.
20. Ksilenlerde 5,10 ve 15'er dakika bekletildi.
21. Lamel ile kapatıldı

Elektron Mikroskopik blok hazırlanması

1. Karaciğer doku örneği 1mm^3 büyüklüğünde parçalara ayrıldı.
2. %2.5 fosfat tamponlu pH $\approx 7,2-7,4$ lik gluteraldehit içinde 24-48 saat tespit edildi.
3. Tespit sonrası doku örnekleri A+B solüsyonu ile 3 kez yıkandı.

Sodyum Fosfat Tamponu'nun hazırlanması

A-Solüsyonu

Sodyum fosfat monobazik (NaH_2PO_4)	6,95 gr
Distile su	250 ml

B- Solüsyonu

Sodyum fosfat dibazik ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	35,85 gr
Distile su	500ml.

A solüsyonundan 5 ml, B solüsyonundan 20 ml alınır. Elde edilen bu solüsyonun 2 ml'si atılarak yerine 2 ml gluteraldehit koyulur. Bu yeni karışımın pH değeri 7,2 ile 7,4 arasında ise tespit için uygundur.

4. İkinci kez tespit etmek, aynı zamanda boyamak için A+B solüsyonundan bir birim ve %1'lik osmiyum tetroksit'ten bir birim alınarak hazırlanan solusyon içinde ışık almayacak şekilde buzdolabında 1 saat bekletildi.

Osmiyum tetroksit hazırlanışı

100 mg osmiyum tetroksit (OsO_4) içeren ampul kırılarak 5ml distile su içinde çözülür. Karışım bir gece önceden, koyu renkli cam şişe içerisinde hava ve ışık almayacak şekilde hazırlanır ve buzdolabında saklanır. Çok toksik bir kimyasal özellik taşıdığı için uygun şartlarda muhafaza edilip imha edilmesi gerekmektedir.

5. Doku örnekleri A+B solüsyonu ile 2 kez yıkandı.
6. Etil alkol serilerinde tutuldu.

%50'lik etil alkolde 15 dakika.

%60'lık etil alkolde 15 dakika.

%70'lık etil alkolde 15 dakika.

%80'lik etil alkolde 15 dakika.

%90'lık etil alkolde 15 dakika.

%96'lık etil alkolde iki kere 15'er dakika.

%100'lük etil alkolde iki kere 30'ar dakika bekletildi.

7. Dokular propilen oksit içinde bir saat bekletildi.

8. Eşit oranlarda hazırlanan propilen oksit ve araldit karışımında bir gece oda ısısında bekletildi.

9. Ertesi gün taze olarak hazırlanmış araldit karışımında dokular iki saat rotatorda döndürülerek bekletildi.

10. Jelatin kapsüllere gömülerek bloklama yapıldı ve polimerizasyonun gerçekleşmesi için 48 saat etüvde bekletildi etüv kapağı etüv soğumadan açılmadı.

Gömme materyalinin hazırlanışı

Araldit CY212 (Araldit M), Epoksi Resin	5ml
2-Dodecenyl succinic anhidrit (DDSA), sertleştirici	5ml
Benzil dimetil amin (BDMA), hızlandırıcı	0.2ml
Dibutyl fitalat, plastikleştirici	0.2ml

Hazırlanan araldit bloklardan 1µm kalınlığında yarı ince kesitler ultratomda alınarak Toluidin mavisi ile boyandı. Işık mikroskopta inceleme yapılarak uygun alanlar seçilerek 300-700 Å kalınlığında ince kesitler gritler üzerine alındı. İnce kesitler kurşun sitrat-uranil asetat ile boyandı. Kesitler 9 Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Elektron mikroskop ünitesinde Zeiss Libra 120 transmisyon elektron mikroskobunda incelendi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 13.0 bilgisayar paket programında yapıldı. Değerlendirmede ortalama, standart sapma, Mann-Whitney U, Kruskal Wallis varyans analizi, Dunn testi kullanıldı ve $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1 Karaciğer Makroskopisi

Deney süresi sonunda sakrafiye edilen deneklerin karaciğer doku örnekleri ilk olarak makroskopik olarak incelendi. Bu inceleme sonucunda kontrol grubundaki sıçan karaciğerlerinin parlak kahverengi-kırmızı renkte, yumuşak ve esnek kıvamda olduğu görüldü. Karaciğer yüzeyi ise düzgün olup pürüzsüzdü. Şekil 1’de görüldüğü gibi koledok tespit edilerek distal ve proksimal kısımlarından bağlanmış, sonra ortadan kesilerek ligasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde tıkanma sarılığı oluşturuldu. Ligasyon grubundaki sıçan karaciğer dokuları ise kıvamları sertleşmiş olup renkleri mat ve kahverengi olarak gözlendi. Karaciğer yüzeyi düzgün olmayıp zımpara kağıdına benzer şekilde mikronodüller içermesi dikkati çekmiştir (Şekil 2). Karaciğer yüzeyinde bazı alanlarda nokta şeklinde koyu yeşil renkte olan safra birikimleri görüldü. Rapamisin ile tedavi edilen gruptaki karaciğer dokuları ise kontrol grubuna benzer olarak, parlak renkte ve yumuşak kıvamda olup safra birikimi ile mikronodül yapılarına rastlanmadı. Diğer tedavi gruplarındaki örnekler ise genel olarak ligasyon grubuna benzemektedir. Sadece C vitamini uygulanan deneklerden bir tanesinde karaciğer yapısı kontrol grubuna benzemektedir. Ayrıca tüm deneklerde koledok kanalının karaciğere komşu olan kısmı safra birikimine bağlı olarak dilate olduğu izlenmiş olup bu bulgu bize tekniği doğru olarak uyguladığımızı göstermektedir.



Şekil 1: Distal ve proksimal olarak bağlanmış koledok kanalı (⇨) görülmekte.



Şekil 2: Ligasyon yapılan denekte genişlemiş koledok kanalı (⇨) ve nodül yapıları (☆) görülmekte (Canon S2 IS , Makro çekim).

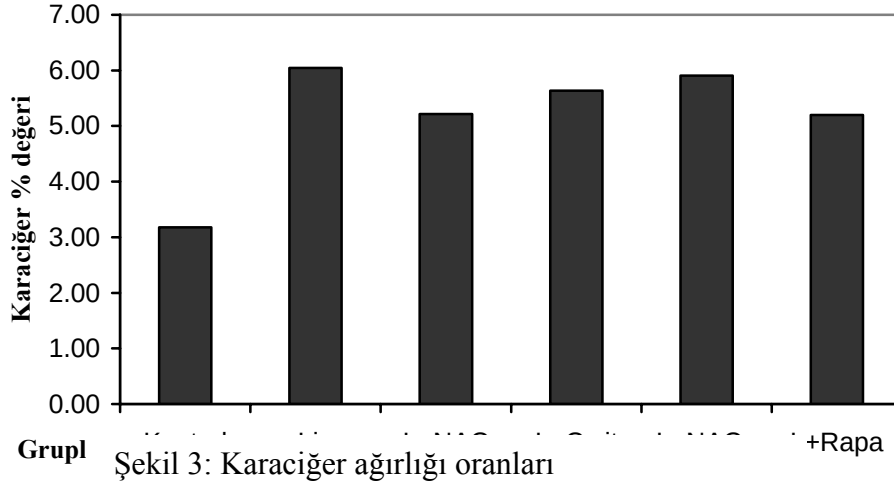
4.2 Denek ağırlıkları ve karaciğer ağırlıkları:

Ligasyon öncesi ve sonrası denek ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Kontrol ve deney gruplarının ilk ve son ağırlıkları, karaciğer ağırlığı ve karaciğer ağırlık yüzdeleri Tablo 4.1’de görülmektedir. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur

Tablo 4.1: Kontrol ve deney gruplarındaki denek ve karaciğer ağırlıkları

	Grup 1 Kontrol	Grup 2 Ligasyon	Grup 3 NAC	Grup 4 C Vit	Grup 5 NAC+C	Grup 6 Rapamisin
İlk ağırlık (gr)	278,25 $\pm 15,78$	281,67 $\pm 17,22$	266,00 $\pm 27,16$	269,17 $\pm 22,23$	266,50 $\pm 26,54$	336,67 $\pm 5,77$
Son ağırlık (gr)	285,50 $\pm 18,19$	277,33 $\pm 21,92$	276,00 $\pm 38,47$	264,17 $\pm 45,49$	250,83 $\pm 36,66$	322,67 $\pm 9,29$
Kc ağırlığı (gr)	9,10 $\pm 1,29$	16,77 $\pm 2,89$	14,34 $\pm 2,46$	14,72 $\pm 2,98$	14,75 $\pm 2,71$	16,80 $\pm 1,74$
Kc ağırlık yüzdesi %	3,18 $\pm 0,34$	6,04 $\pm 0,92$	5,22 $\pm 0,75$	5,63 $\pm 1,15$	5,91 $\pm 0,93$	5,20 $\pm 0,41$

Kontrol ve deney gruplarının karaciğer ağırlık yüzdeleri Şekil 3’de grafik olarak gösterilmiştir.



Kontrol grubu karaciğer ağırlık yüzdesi ile diğer grupların karaciğer ağırlık yüzdeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Buna göre p değeri: kontrol ve ligasyon grupları arasında $p<0.011$, kontrol ve NAC uygulanan grup arasında $p<0.014$, kontrol ve C vitamini uygulanan grup arasında $p<0.011$, kontrol ve NAC+C vitamini uygulanan grup arasında $p<0.011$, kontrol ve rapamisin uygulanan grup arasında $p<0.034$ olarak hesaplanmıştır.

4.3 Biyokimyasal değerlendirme:

Tablo 4.2’de kontrol ve deney gruplarının kan biyokimya değerleri görülmektedir. Denekler bireysel olarak ele alındığında biyokimyasal parametreler ile mikroskopik inceleme bulgularının genel olarak birbirleri ile uyum sağladığı görülmüştür.

ALT ve AST değerleri karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre deney gruplarında enzim değerlerinde artış gözlenmesine rağmen ligasyon grubu ile tedavi uygulanan gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmadı. Şekil 4’te deney gruplarındaki ALT ve AST değerleri grafik olarak görülmektedir.

GGT değeri açısından tüm gruplar, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yükselmişti. 1. grup GGT değeri ile 2. grup, 3. grup, 4. grup ve 5. gruplar karşılaştırıldığında p değerleri sırasıyla: $p<0.008$, $p<0.011$, $p<0.008$, $p<0.008$ olarak

bulunmuştur. 6. grup GGT değeri ile 2. grup, 3. grup ve 5. gruplar karşılaştırıldığında ise p değerleri $p<0.02$, $p<0.036$ ve $p<0.02$ olup istatistiksel anlamlı olarak artmış olarak bulunmuştur. Şekil 5’de deney gruplarının GGT değerleri grafik olarak görülmektedir.

Total bilirubin değeri kontrol grubuna göre diğer tüm deney gruplarında artmıştı. Birinci grup total bilirubin değeri ile 2. grup, 3. grup, 4. grup, 5. grup ve 6. gruplar karşılaştırıldığında p değerleri: $p<0.008$, $p<0.011$, $p<0.008$, $p<0.008$ ve $p<0.019$; 2. grup total bilirubin değeri ile 5. ve 6. gruplar karşılaştırıldığında p değerleri: $p<0.016$, $p<0.02$ olup istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Üçüncü grup total bilirubin değeri ile 5. ve 6. gruplar karşılaştırıldığında p değerleri: $p<0.018$, $p<0.025$ olup istatistiksel olarak anlamlıydı.

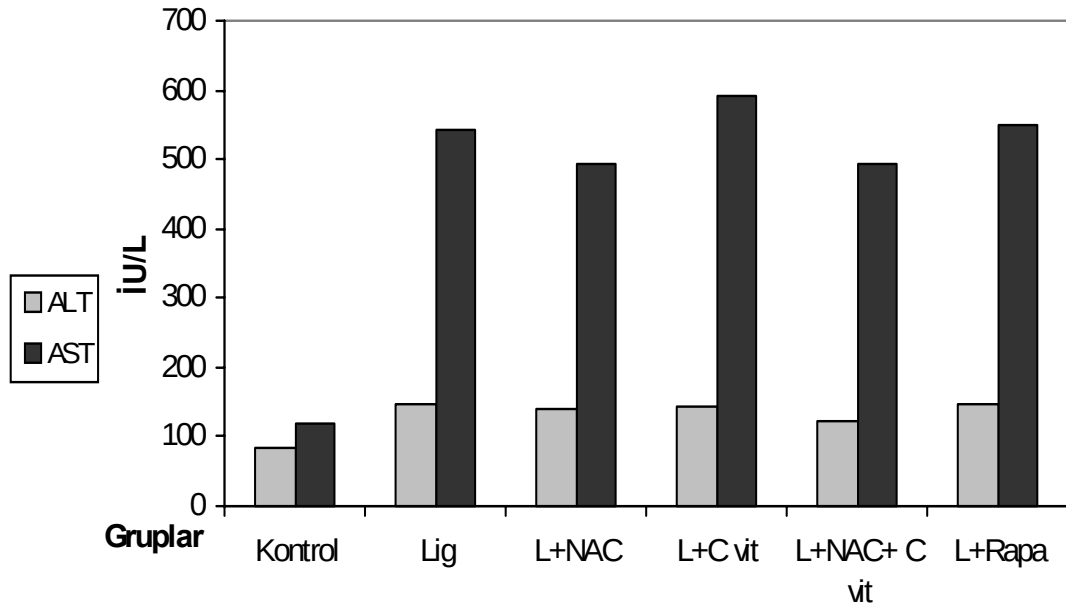
Birinci grup serbest bilirubin değerleri ile 2. grup, 3. grup, 5. grup ve 6. gruplar karşılaştırıldığında p değerleri: $p<0.008$, $p<0.011$, $p<0.008$, $p<0.019$; 2. grup serbest bilirubin değerleri ile 5.ve 6. gruplar karşılaştırıldığında p değerleri: $p<0.016$, $p<0.02$; 3. grup serbest bilirubin değerleri ile 5.ve 6. gruplar karşılaştırıldığında p değerleri: $p<0.028$ ve $p<0.025$ olup istatistiksel olarak anlamlıydı.

Birinci grup bağlı bilirubin değeri ile 2. grup, 3. grup, 4. grup, 5. grup ve 6. gruplar karşılaştırıldığında p değerleri: $p<0.008$, $p<0.011$, $p<0.008$, $p<0.008$ ve $p<0.019$ olup istatistiksel olarak anlamlı bulundu; 2. grup bağlı bilirubin değeri ile 5. ve 6. gruplar karşılaştırıldığında p değerleri: $p<0.016$, $p<0.02$; 3. grup bağlı bilirubin değeri ile 5. ve 6. gruplar karşılaştırıldığında p değerleri: $p<0.018$, $p<0.025$ olup istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Şekil 6’da deney gruplarının direkt bilirubin değerleri grafik olarak görülmektedir.

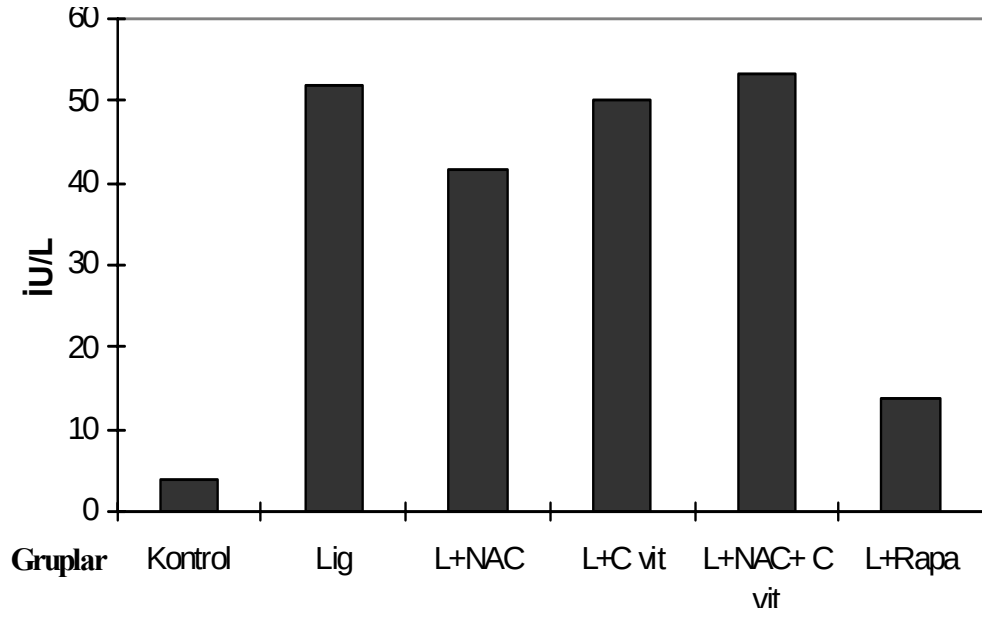
Kan glukoz değerleride kolestaza bağlı olarak; kontrol grubuna göre diğer deney gruplarında azalmıştı. Birinci grup glukoz değerleri ile 2. grup, 3. grup, 4. grup, 5. grup ve 6. gruplar karşılaştırıldığında p değerleri: $p<0.011$, $p<0.014$, $p<0.011$, $p<0.011$ ve $p<0.034$ olup istatistiksel olarak anlamlıydı. Altıncı grubun kan glukoz değeri ile 2. grup, 3. grup, 4. grup ve 5. gruplar karşılaştırıldığında p değerleri: $p<0.02$, $p<0.024$, $p<0.02$, $p<0.02$ olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Şekil 7’de deney gruplarının glukoz değerleri grafik olarak görülmektedir.

Tablo 4. 2: Kontrol ve deney gruplarının kan biyokimya değerleri

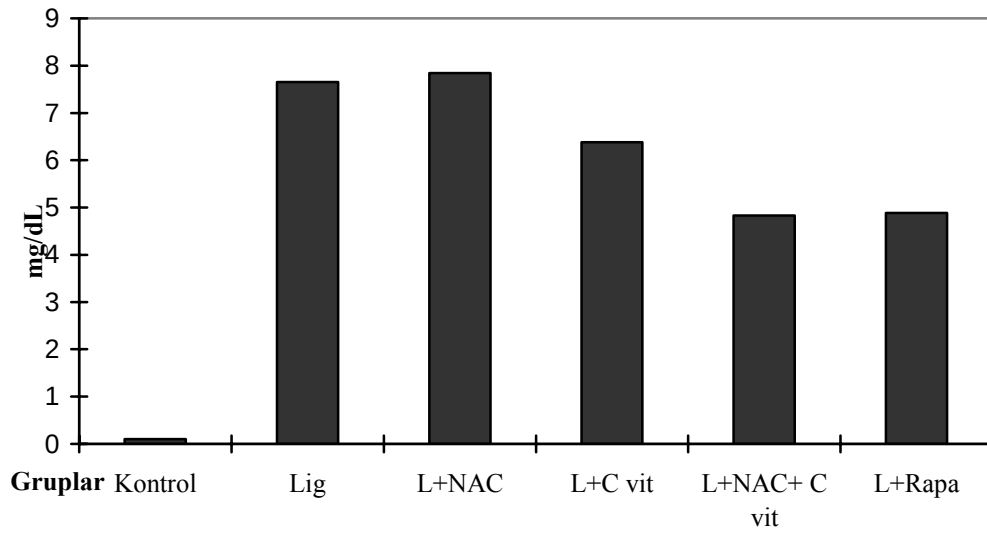
	Grup 1 Kontrol (Ortalama±SS)	Grup 2 Ligasyon (Ortalama±SS)	Grup 3 NAC (Ortalama±SS)	Grup 4 C Vit (Ortalama±SS)	Grup 5 NAC+C (Ortalama±SS)	Grup 6 Rapamisin (Ortalama±S)
ALT (IU/L)	83,75±18,50	147,33±57,14	141,60±27,30	144,33±58,20	121,67±28,45	146±101,73
AST(IU/L)	119,25±14,45	542,67±159,26	493±60,91	593,17±397,19	493±134,40	548±595,60
GGT (IU/L)	4,00±0,00	51,67±23,56	41,60±13,76	50±36,11	53,33±18,34	13,67±5,51
Total bilirubin (mg/dl)	0,1±0,00	9,62±1,20	9,82±1,29	8,05±4,13	5,84±2,96	5,85±1,48
Serbest bilirubin (mg/dl)	0,01±0,00	1,97±0,38	1,97±0,46	1,67±0,98	1,07±0,68	0,96±0,26
Bağlı bilirubin (mg/dl)	0,10±0,00	7,66±0,83	7,85±0,85	6,38±3,17	4,83±2,30	4,89±1,22
Glukoz (mg/dL)	192,25±18,50	108,33±15,76	107,60±10,57	115,50±18,02	110,67±15,51	156,67±14,01



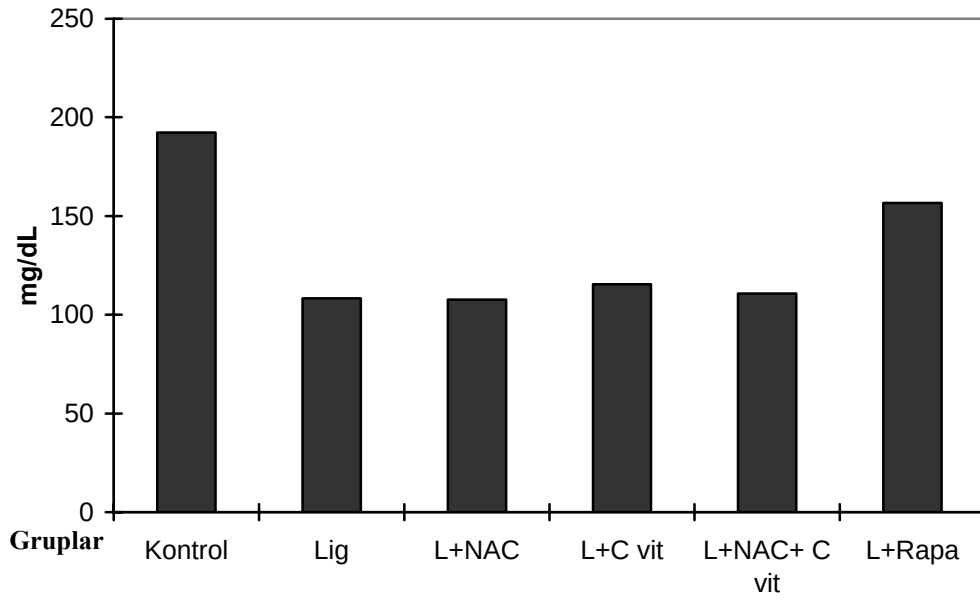
Şekil 4: ALT ve AST değerleri



Şekil 5: GGT değerleri



Şekil 6: Direkt bilirubin değerleri



Şekil 7: Deney gruplarının glukoz değerleri

4.4. Işık Mikroskopik Sonuçlar

4.4.1 H-E Boyama

Kontrol grubuna ait karaciğer doku örneklerinde lobüller ve hepatositler normal histolojik yapıya sahipti.

Ligasyon uygulanan gruptaki karaciğer kesitlerinde; portal alanlarda ileri derecede safra kanalı artışı, sıklıkla fibrotik ve nekrotik alanların varlığı görüldü. Hepatositler arasındaki sinüzoidlerde genişleme oldukça belirgindi (Şekil 8). Safra kanalı proliferasyonuna bağlı olarak portal alanlar arasında köprüleşmelerin oluşturduğu band yapıları ve yoğun inflamatuvar hücre artışı görüldü (Şekil 9). Hepatositlerin bir kısmında çekirdeklerin irileştiği, nekrotik alanlarda piknotik çekirdekli ve bozulmuş hepatositler izlendi.

Ligasyon yapıp NAC uygulanan grupta, safra kanalı proliferasyonu ile portal bölgeler arasındaki band şeklindeki köprüleşmelerin, ligasyon grubuna göre daha belirgin olduğu saptandı. Bu alanlarda inflamatuvar hücre yoğunluğu fazla olarak

görüldü (Şekil 10). C vitamini verilen grupta, karaciğer yapısı genel olarak ligasyon grubuna benzemektedir. NAC ve C vitamininin birlikte verildiği grupta ise safra kanalı proliferasyonu ve nekroze alanlar daha az belirgindi. Sinüzoidler daha az genişlemiş olarak görülüp, inflamatuvar hücre yoğunluğu ligasyon grubuna göre azalmış olarak görüldü. Yine bu grupta karaciğer lobül yapıları daha düzenli izlendi (Şekil 11). Rapamisin uygulanan grupta ise ligasyon grubunda ki proliferasyon, nekroz ve fibrotik alanlar belirgin olarak azalmıştı. Özellikle köprüleşme tarzında portal alanların birleşmesi gözlenmedi. Karaciğer lobül yapıları daha düzenli olup sinüzoidler daha az genişlemiş olarak görüldü (Şekil 12,13). Genel yapı olarak hepatositler daha düzenli olup iri çekirdekli hepatositlere daha az rastlandı. Bu bulgular makroskopik inceleme sonuçları ile uygunluk göstermekteydi.

4.4.2 Masson Trikrom Boyaması

Portal alanlardaki kollajeni değerlendirmek için Masson trikrom boyası uygulandı. Kontrol grubundaki örneklerde analin mavisi tutulumu beklendiği gibi portal alanda ve santral ven çevresinde hafif derecede görüldü. Bunun dışındaki alanlarda boyanma izlenmedi. Ligasyon uygulanan grupta ise safra kanalı proliferasyonu gözlenen alanlardaki köprüleşme bölgesindeki bağ dokuda belirgin kollajen artışı olduğu gözlemlendi (Şekil 14). Ligasyon grubundaki proliferasyon alanları yakınında yer alan hepatositlerde mitotik figürler gözlemlendi (Şekil 15). Bu alandaki hepatosit çekirdeklerinin büyük, çekirdekçiklerinin daha belirgin olduğu görüldü. Rapamisin uygulanan grupta ise proliferasyon alanı çevresinde ve proliferasyon alanları arasındaki bölgede kollajen artışının ligasyon grubundaki kadar yoğun olmadığı dikkati çekmekteydi (Şekil 16). Diğer gruplar ise genel olarak ligasyon grubuna benzemektedir.

4.4.3 PAS Boyaması

Hepatositlerdeki glikojeni değerlendirmek amacıyla PAS boyası uygulandı. Ligasyon uygulanan grupta safra kanalı proliferasyonunun görüldüğü alanların çevresindeki hepatositlerde PAS(+) boyanma şiddetinin kontrol grubuna göre daha

zayıf olduğu izlenmiştir (Şekil 17). NAC ile tedavi edilen grupta PAS(+) boyanma daha çok prolifer olmuştur safra kanalları arasındaki bölgede gözlemlendi. C vitamini uygulanan grupta safra proliferasyonu görülen alanların yakınındaki hepatositlerin bir kısmında PAS(+) alanlar belirgin olarak izlenmiştir (Şekil 18). NAC ve C vitamininin birlikte uygulandığı gruptaki bulgular sadece C vitamini uygulanan gruba benzemektedir. Rapamisin uygulanan grupta, özellikle santral ven yakınındaki hepatositlerde PAS(+) boyanmanın şiddetinin belirgin olduğu tespit edildi (Şekil 19).

4.4.4 İmmünohistokimyasal Boyamalar

Elde edilen kesitlere α -SMA, desmin ve β -katenin boyaları uygulandı. Kontrol grubunda, α - SMA immün(+) reaksiyonunun portal alandaki damarların çevresinde belirgin olduğu izlendi (Şekil 20). Ligasyon grubunda, α - SMA immün boyanmasının santral ven çevresinde ve prolifer safra kanallarının çevresinde belirgin olduğu görüldü. Nekroz alanları ve fibrotik bölgelerin çevresinde bulunan yassı hücrelerde α - SMA immünboyanmasının olduğu görülmüştür (Şekil 21,22). NAC ve NAC+C vitamini uygulanan gruplarda portal alandaki damar duvarlarında ve safra kanalları sınırlarında kuvvetli α -SMA immün(+) boyanma ligasyon grubuna benzemektedir (Şekil 23,24). NAC+C vitamini ve C vitamini uygulanan tedavi gruplarında ligasyon grubuna benzer olarak nekroz bölgelerinde kuvvetli α -SMA(+) immün boyanması ve nekroz alanı merkezinde piknotik çekirdekli hepatosit dejenerasyonu izlendi (Şekil 25,26). Rapamisin uygulanan grupta ise safra proliferasyonu olan bazı alanlarda belirgin α -SMA immün(+) boyanma dikkati çekmekteydi (Şekil 27).

Kontrol grubunda desmin immün(+) reaksiyonunun portal alanlarda zayıf olduğu saptandı (Şekil 28). Ligasyon uygulanan grupta desmin(+) immün boyanmanın kontrol grubuna benzer olarak portal alanda arter çevresinde olduğu görüldü (Şekil 29). Ligasyon grubunda, nekroz ve fibrotik alanlarda desmin(+) boyanmış α - SMA boyanmasındakine benzer şekilde uzamış, yassı hücreler görüldü (Şekil 30,31). C vitamini, NAC, NAC+C vitamini uygulanan gruplardaki desmin immün boyanmasının ligasyon grubuna benzediği, fibrotik alanlarda desmin (+) boyanmış yassı hücrelerin olduğu tespit edildi (Şekil 32). Rapamisin ile tedavi edilen

grupta, desmin immün boyanmasının portal alanlardaki damar çevrelerinde olduğu, diğer deney gruplarına benzer olarak nekrotik ve fibrotik alanların çevresinde (+) boyalı hücrelerin olduğu gözlemlendi. Rapamisin grubunda bu alanların azalmış olmasına bağlı olarak, desmin(+) boyanmış hücreler daha az gözlemlendi (Şekil 33).

Kontrol grubunda β -katenin immün boyanmasının portal alandaki safra kanallarında belirgin olduğu, hepatosit sınırlarında ise daha zayıf bir tutulumun bulunduğu gözlemlendi (Şekil 34). Ligasyon grubu ve NAC ile tedavi edilen grupta β -katenin immün boyanmasının safra kanal epitel hücrelerinin sitoplazmalarında ve hepatosit sınırlarında benzer şekilde olduğu izlendi (Şekil 35,36). NAC+C Vitamini uygulanan grupta β -katenin immün boyanmasının hepatosit sınırlarında daha belirgin olduğu ve reaksiyonun safra kanalı epitel hücre sitoplazmasından daha çok hücre sınırlarında olduğu görülmüştür (Şekil 37). C vitamini ve rapamisin uygulanan gruplarda β -katenin immün boyanmasının ligasyon grubuna benzediği, hepatosit sınırlarında ve safra kanal hücrelerinin sitoplazmalarında belirgin olduğu gözlemlendi (Şekil 38,39). Kontrol ve deney gruplarında β -katenin immün boyanmasının aynı alanlarda ve genel olarak benzer şiddette olduğu tespit edildi.

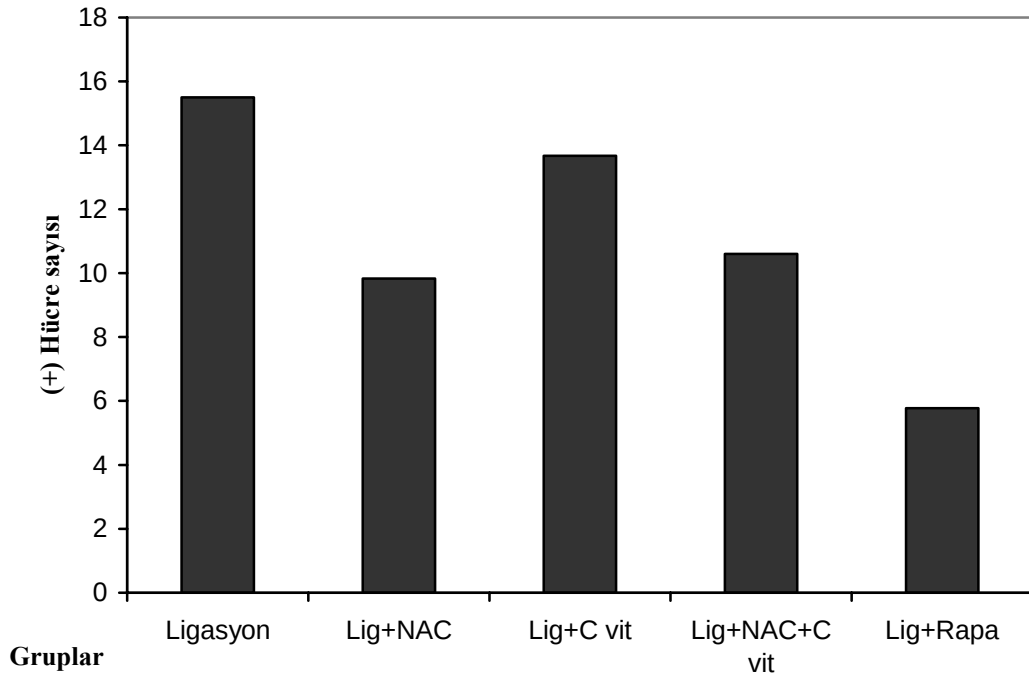
4.4.5 Ki-67 ve TUNEL

Hücre proliferasyonunu göstermek için yaptığımız Ki- 67 immün boyaması ve apoptozisi göstermek için Apotag immün boyamaları yapıldı. Her gruptaki deneklerin karaciğer doku kesitlerinde, x40 objektif büyütmesi ile 10 ayrı alandaki safra kanal epitel hücrelerinde pozitif boyanan hücreler sayıldı. Ayrıca kesitlerde immün(+) boyanan hepatositler değerlendirilerek, fotoğraflandırıldı. Kontrol grubundaki doku kesitlerinin tüm alanları incelendiğinde Ki- 67 immün boyanan hepatositlerin toplam 4-5 adet olduğu görüldü (Şekil 40). Ligasyon uygulanan grupta özellikle proliferatif olmuş safra epitel hücrelerinde ve bu bölgelerin çevresindeki hepatositlerde Ki- 67 immün boyanmasının belirgin olduğu saptandı. Bu bölgedeki hepatositlerde mitotik figürlere kontrol grubuna göre daha sık rastlandı (Şekil 41,42). NAC, NAC+C vitamini uygulanan gruplarda Ki- 67 immün boyamanın safra kanalı epitel hücrelerinde, ligasyon grubuna göre daha az olduğu görüldü (Şekil 43,44). C vitamini verilen grupta ise safra epitel hücrelerindeki Ki- 67 immün boyanmasının

NAC+C vitamini verilen gruba göre artmış olduğu dikkati çekti (Şekil 45). Rapamisin ile tedavi edilen grupta ise yine safra epitel hücrelerinde Ki- 67 immün boyanması tespit edildi, ancak boyanan hücre sayısı ligasyon ve diğer tedavi gruplarına göre daha az olarak izlendi (Şekil 46). Ki- 67 immün boyanan safra epitel hücrelerinin gruplardaki dağılımı Tablo 4.5.3 ve Şekil 47'deki grafikte gösterilmiştir. İstatistiksel olarak kontrol grubunda tüm alanda 4-5 adet immün (+) boyanan hücre değerlendirmeye alınmadı. Değerlendirme ligasyon ve tedavi grupları arasında yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme Kruskal Wallis varyans analizi ve post test olarak Dunn testi kullanılarak yapılmıştır. Rapamisin uygulanan grupta Ki- 67 immün boyanan safra epitel hücre sayısı; ligasyon, NAC, NAC+C vitamini ve ligasyon + C vitamini verilen gruplara göre anlamlı olarak azalmıştı. (p değerleri sırası ile; $p<0.001$, $p<0.01$, $p<0.001$, $p<0.001$). NAC uygulanan gruptaki Ki-67 (+) boyanan hücre sayısı, ligasyon ve ligasyon + C vitamini verilen gruba göre anlamlı olarak azalmıştı ($p<0.01$ ve $p<0.05$). Tablo 4.5.3'de Ki-67(+) hücre sayısı görülmektedir.

Tablo 4.5.3: Gruplar arasındaki Ki- 67 (+) hücre sayısı verilmiştir.

	Grup 2 Ligasyon (Ortalama±SS)	Grup 3 NAC (Ortalama±SS)	Grup 4 C Vit (Ortalama±SS)	Grup 5 NAC+C (Ortalama±SS)	Grup 6 Rapamisin (Ortalama±S)
Ortalama	15,5±6,66	9,83±3,65	13,67±4,63	10,6±2,90	5,77±2,61



Şekil 47: Gruplar arası ortalama Ki- 67 (+) hücre sayısı

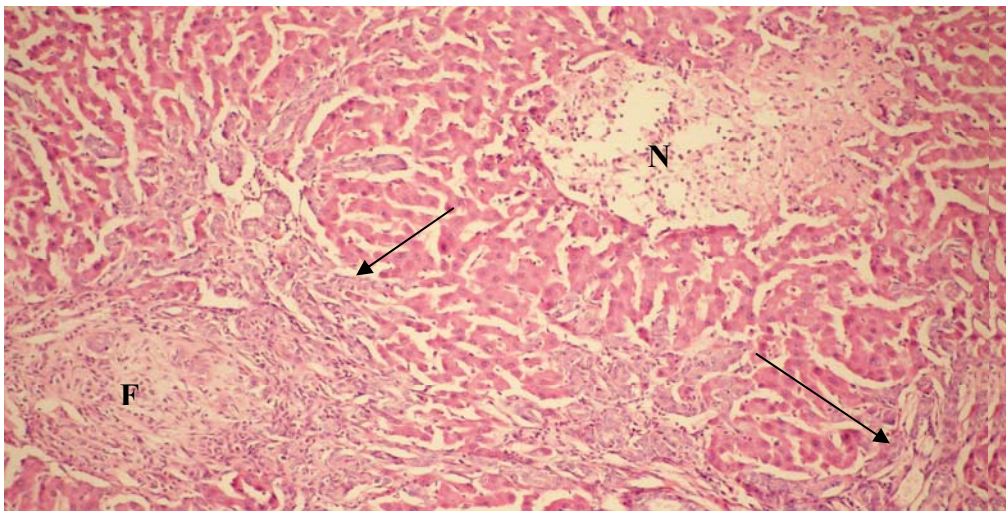
Apoptozis açısından değerlendirildiğinde, kontrol grubunda (+) boyanan hepatositler ve aralarda yıldız şeklindeki hücreler olduğu görüldü (Şekil 48). Ligasyon grubunda proliferatif safra epitel hücrelerinde (+) boyanan hücreler gözlenmedi, genellikle hepatositlerde boyanma görüldü (Şekil 49,50). Tedavi gruplarından NAC+C Vitamini uygulanan gruptaki karaciğer doku örneklerinde, proliferatif safra kanal bölgesinde az sayıda TUNEL(+) hücreler izlendi (Şekil 51). C vitamini ve NAC verilen gruplarda boyanma sadece hepatositlerde idi (Şekil 52). Rapamisin verilen grupta hepatositlerdeki (+) boyanma yanında, safra epitel hücrelerindeki (+) boyanan hücrelerin sayısı, ligasyon ve diğer tedavi gruplarına göre artmış olarak tespit edildi (Şekil 53,54).

4.5 Elektron Mikroskopik Değerlendirme

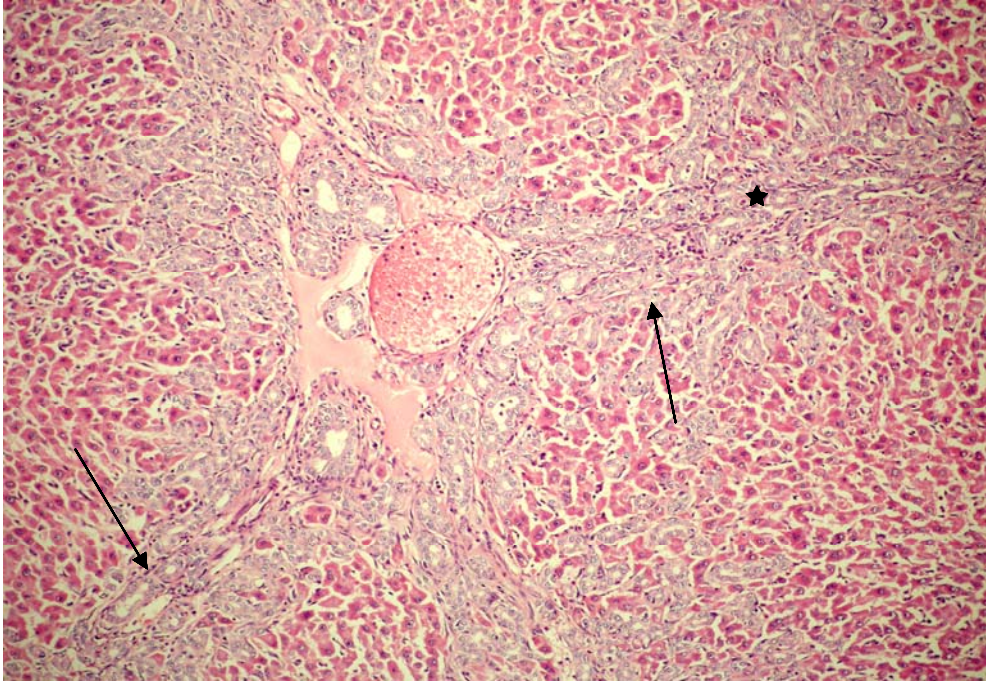
Ligasyon uygulanan gruba ait yarı ince kesitlerde portal alanlarda proliferatif olmuş safra kanalları, çok sayıda lipid damlacığı içeren hepatositler ile genişlemiş sinüzoidler gözlemlendi. Safra kanal epitel hücreleri arasında koyu boyanmış yassı çekirdekli hücreler ayırt edildi (Şekil 55). Tedavi gruplarında yarı ince görüntüler

benzer olarak değerlendirildi. NAC+C vitamini verilen grupta hepatositlerdeki yağ damlacıkları diğer gruplara göre azalmış olarak saptandı (Şekil 56).

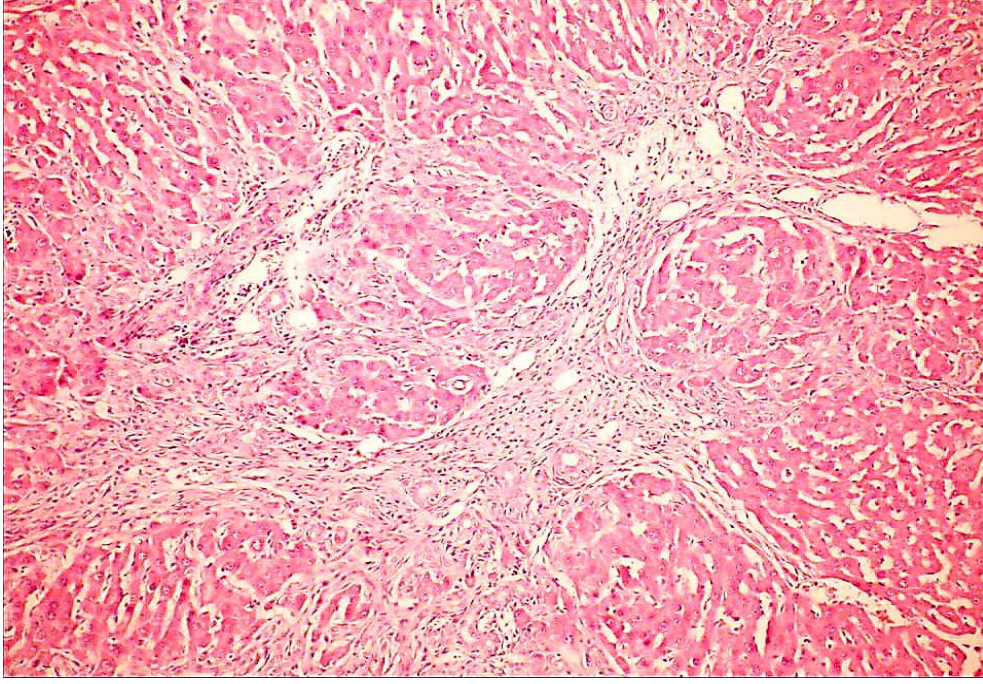
İnce kesitlerde ligasyon grubunda; safra kanalında, ökromatik yuvarlak çekirdekli mikrovilluslu epitel hücreleri ve bazalde, oval çekirdekli hücre görüldü (Şekil 57). Açık ve koyu boyanan hepatositlerden heterokromatik çekirdeğe sahip koyu hücrelerde organeller net olarak ayırt edilemedi. Açık boyanan hücrelerin sitoplazmalarında genişlemiş endoplazmik retikulum yapıları, krista yapıları bozulmamış çok sayıda mitokondriyolar ve lizozomlar izlendi (Şekil 58). Koyu boyanmış hepatositlerin arasında genişlemiş safra kanalikülleri, hücrelerde vakuolize yapılar, lipid damlacıkları, genişlemiş sinüzoidler içinde aktif Kupffer hücreleri saptandı. Hepatositler arasında lipid damlaları içermeyen yıldızsı hücreler tanımlandı (Şekil 59). Tedavi gruplarında ince kesitlerde benzer görüntüler elde edildi. Proliferasyon alanlarında safra kanalları çevresinde artmış fibroblast benzeri yassı hücreler görüldü. Hepatositlerde lipid damlacıkları, geniş sinüzoidler belirgindi (Şekil 60, 61, 62, 63).



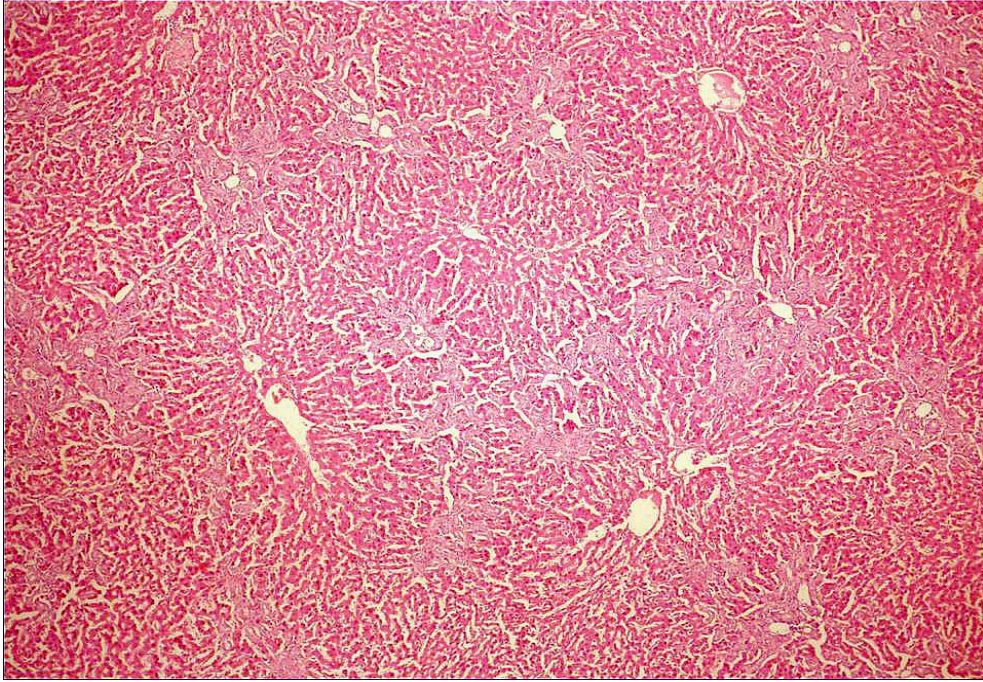
Şekil 8: Ligasyon yapılmış grupta safra kanalı proliferasyon alanları (→), yanında nekroz (N) ve fibrozis alanları (F), genişlemiş sinüzoidler görülmekte. HE x10.



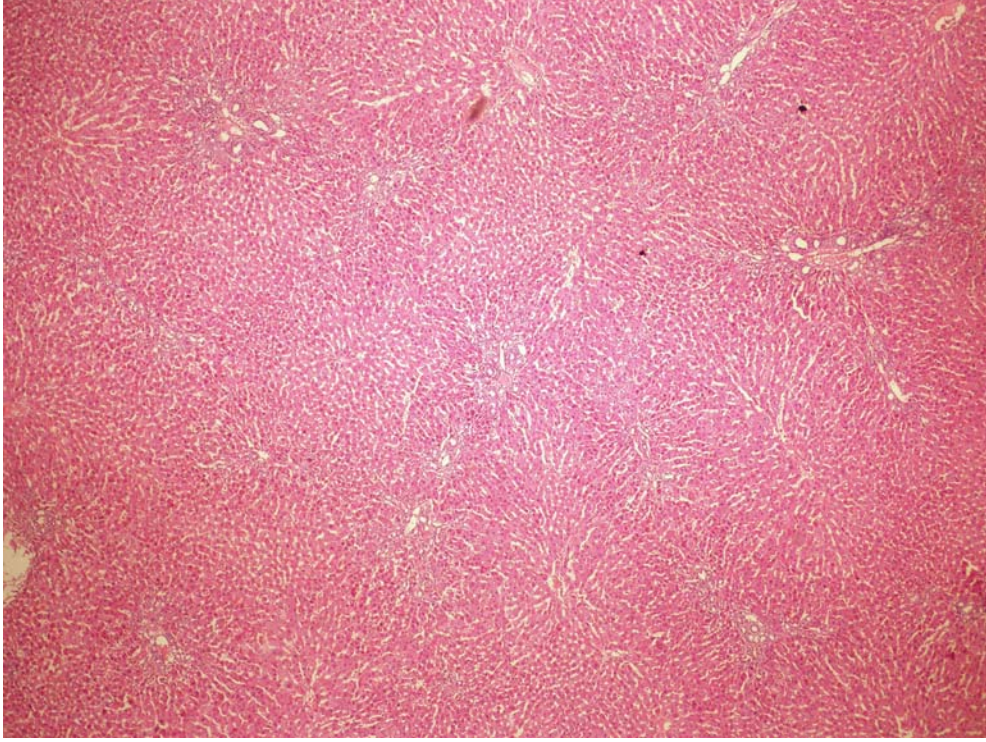
Şekil 9: Ligasyon yapılmış grupta artmış safra kanallarına bağlı olarak portal alanlar arasında köprüleşmelerin olduğu (→), bu alanlarda inflamasyon hücrelerinin (★) arttığı görülmekte. HE x20.



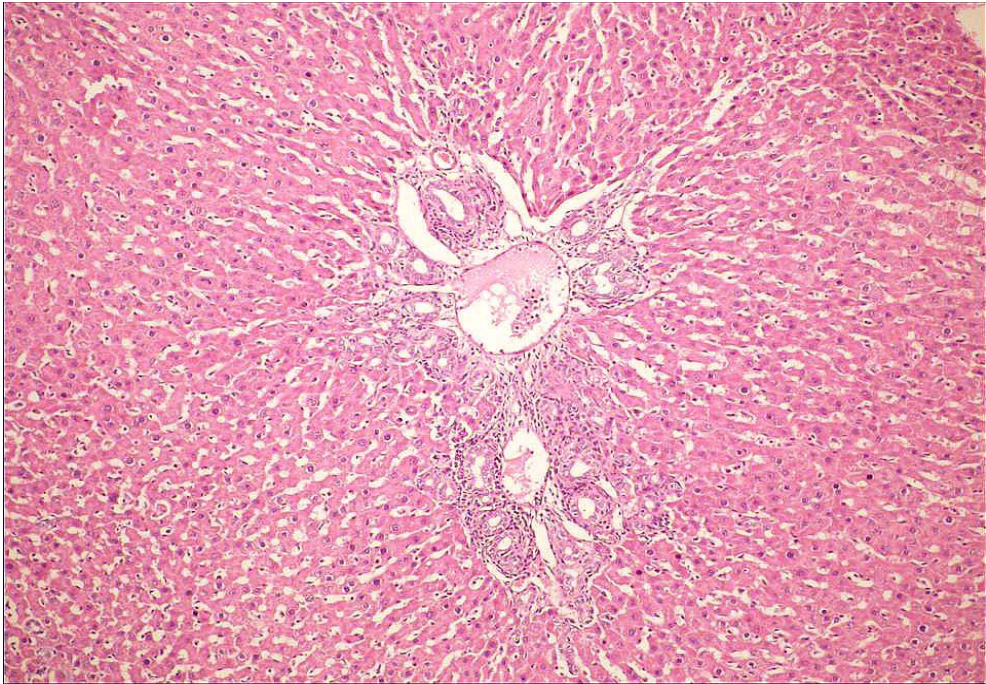
Şekil 10: NAC uygulanan grupta ligasyon grubuna göre safra kanalı proliferasyonunun ve köprüleşmelerin daha belirgin olduğu görülmekte. HE x10.



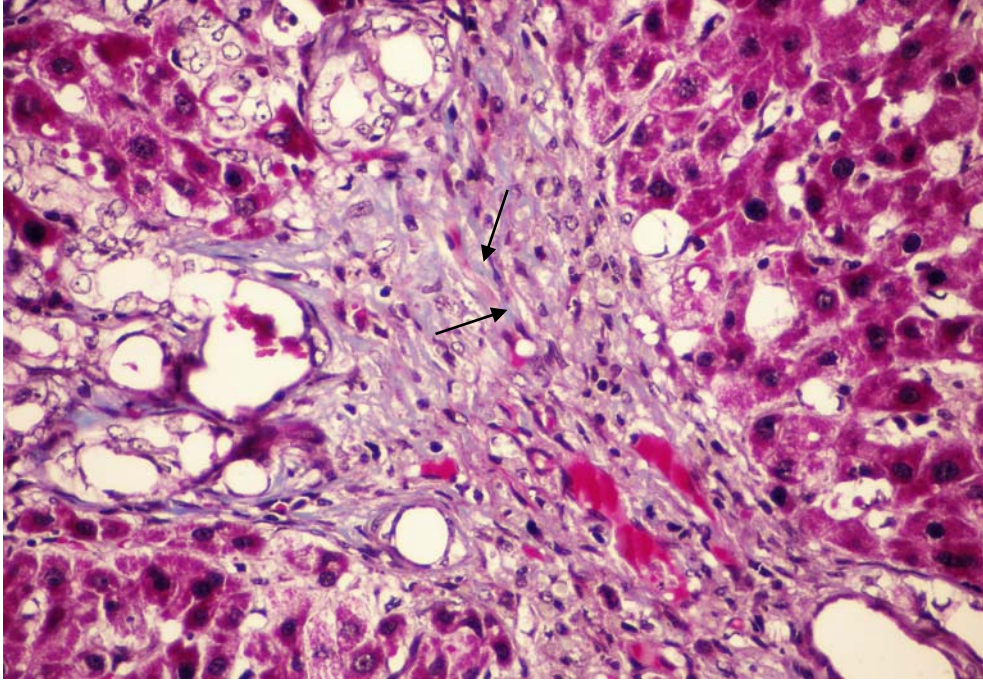
Şekil 11: NAC+C Vitamini uygulanan grupta safra kanalı proliferasyonu ve nekroze alanlar daha az belirgin olarak görülmekte. HEx4.



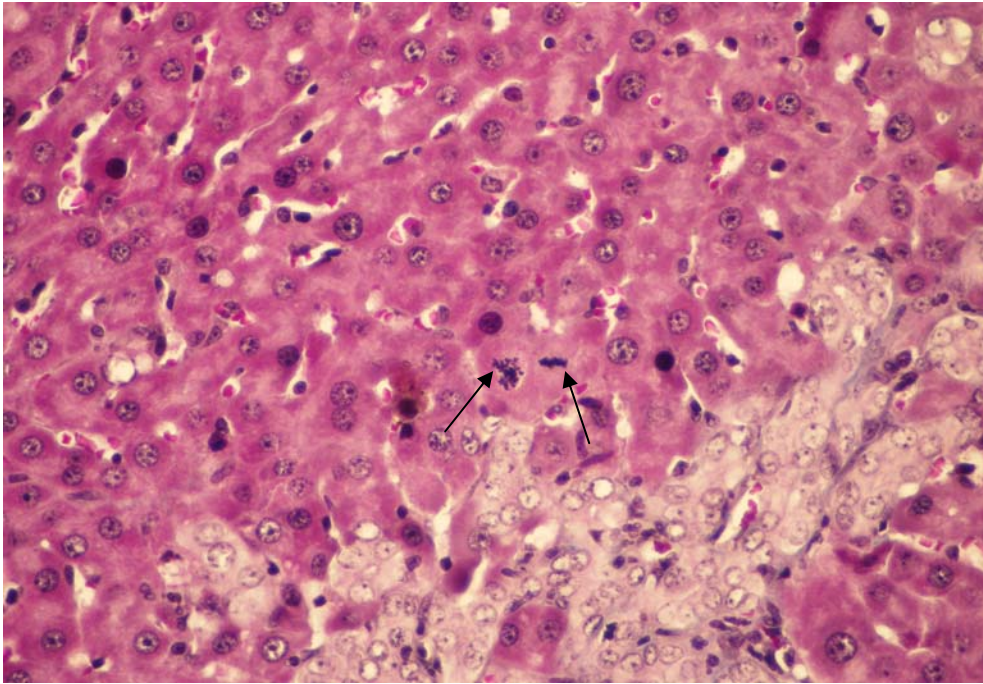
Şekil 12: Rapamisin uygulanan grupta safra kanalı proliferasyonunun ve fibrotik değişikliklerin, ligasyon ve diğer ilaç uygulanan gruplara göre azalmış olduğu görülmekte HE x4.



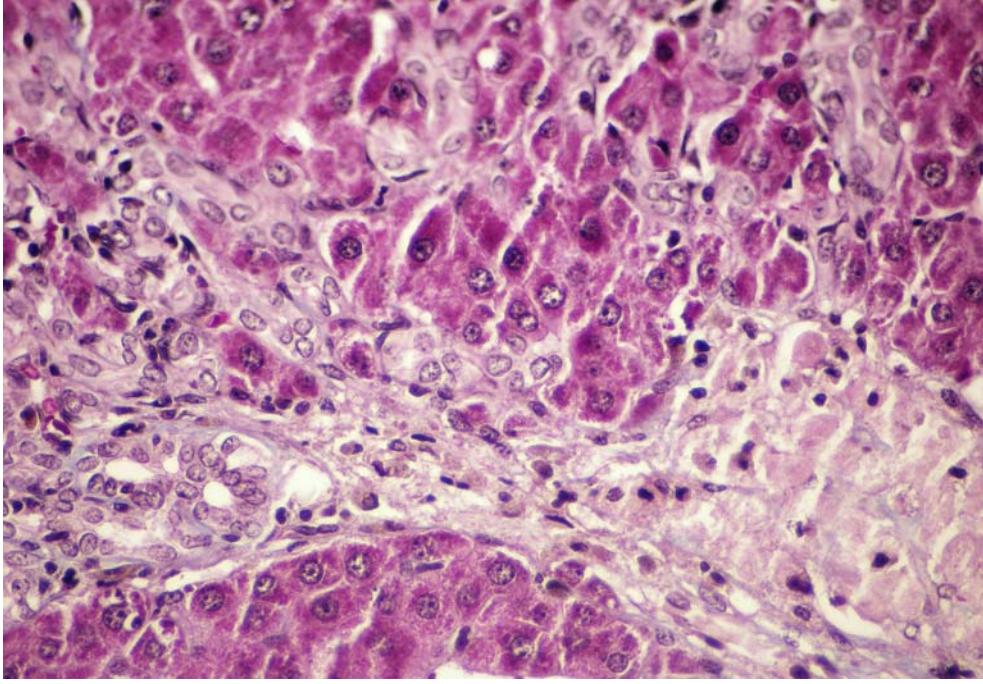
Şekil 13: Rapamisin uygulanan grupta proliferasyonun ve fibrotik alanın belirgin olarak azaldığı görülmekte HE X 10



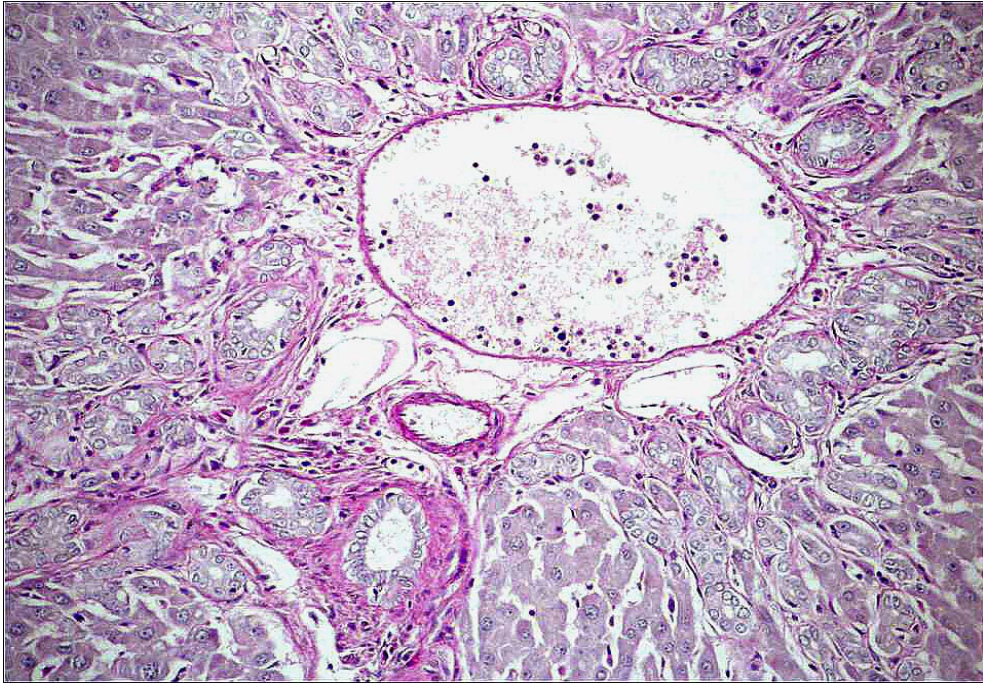
Şekil 14: Ligasyon yapılmış grupta safra kanal proliferasyonu olan alanlarda belirgin kollajen artışı(→) görülmekte. Masson Trikrom x40.



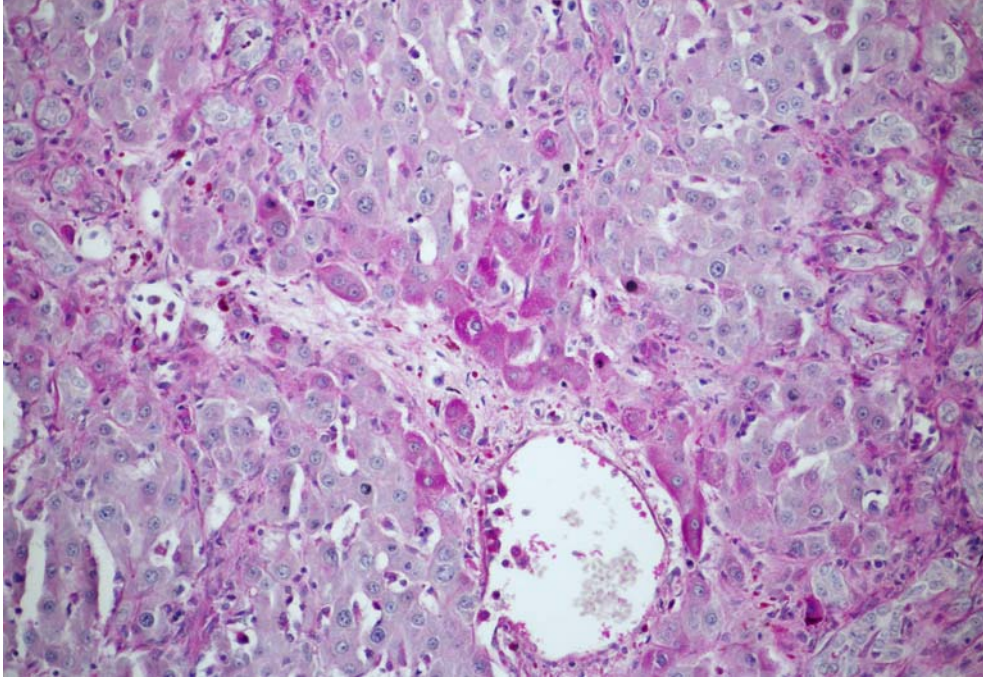
Şekil 15: Ligasyon uygulanan grupta prolifer alanların çevresindeki hepatositlerde mitotik figürler (→) görülmekte. Masson Trikrom x 40.



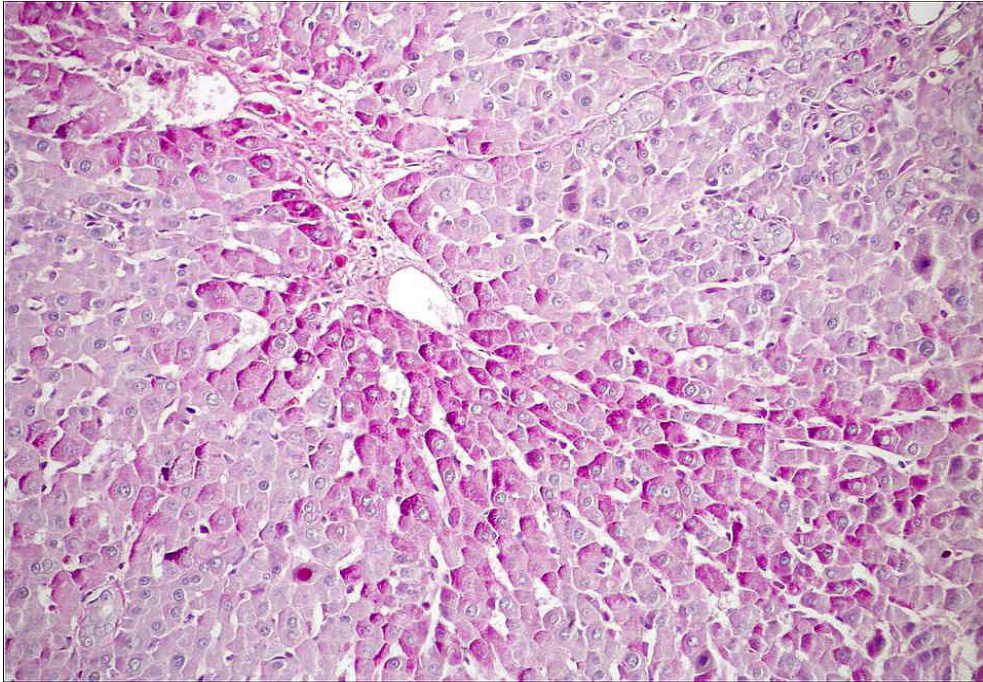
Şekil 16: Rapamisin ile tedavi uygulanan grupta fibrotik alanda azalmış kollajen tutulumu izlenmekte Masson Trikrom x 40.



Şeki 17: Ligasyon uygulanan grupta hepatositlerde PAS(+) boyanmanın azaldığı görülmektedir PAS x20.



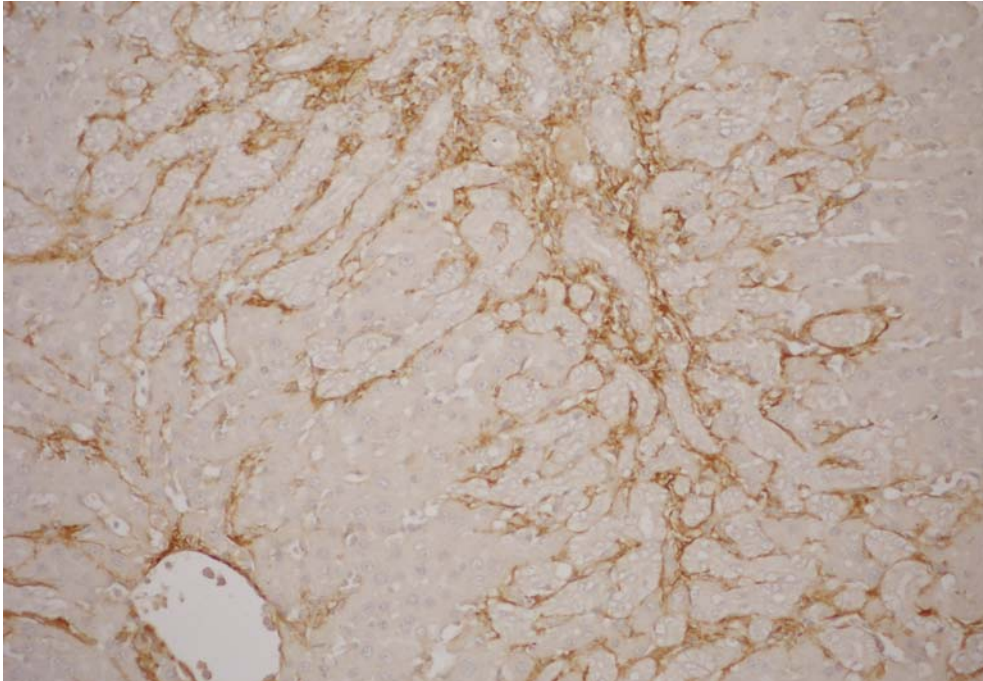
Şekil 18: C vitamini uygulanan grupta proliferasyon alanlarına komşu olan hepatositlerin bir bölümünde PAS (+) boyanma görülmekte. PAS x20.



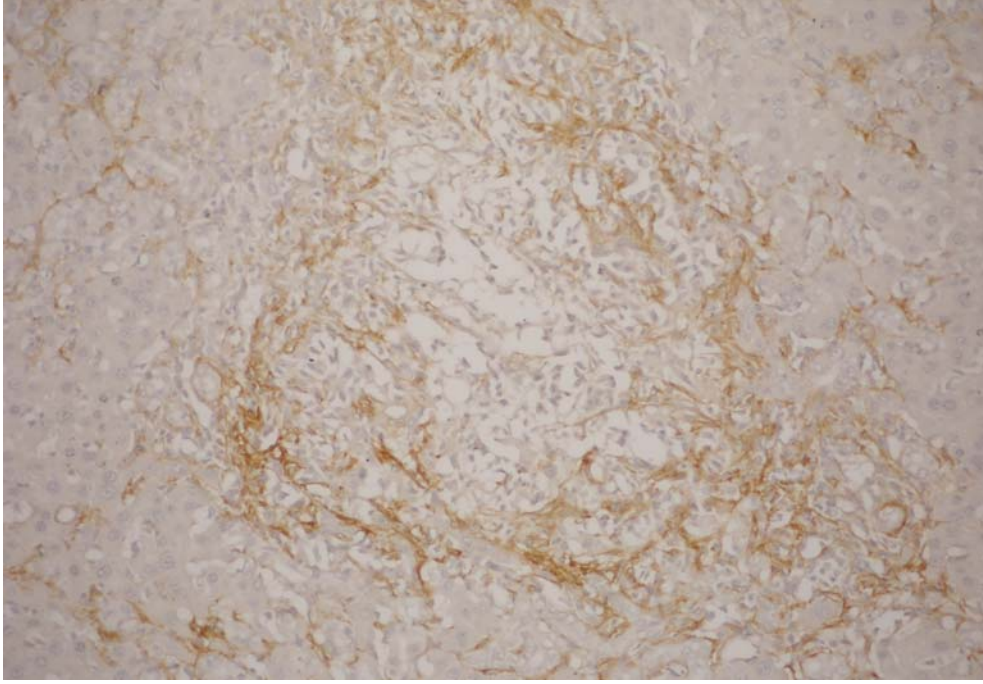
Şekil 19: Rapamisin uygulanan grupta PAS (+) boyanmış hepatositlerin diğer gruplara göre belirgin olarak artmış olduğu görülmektedir. PAS X10.



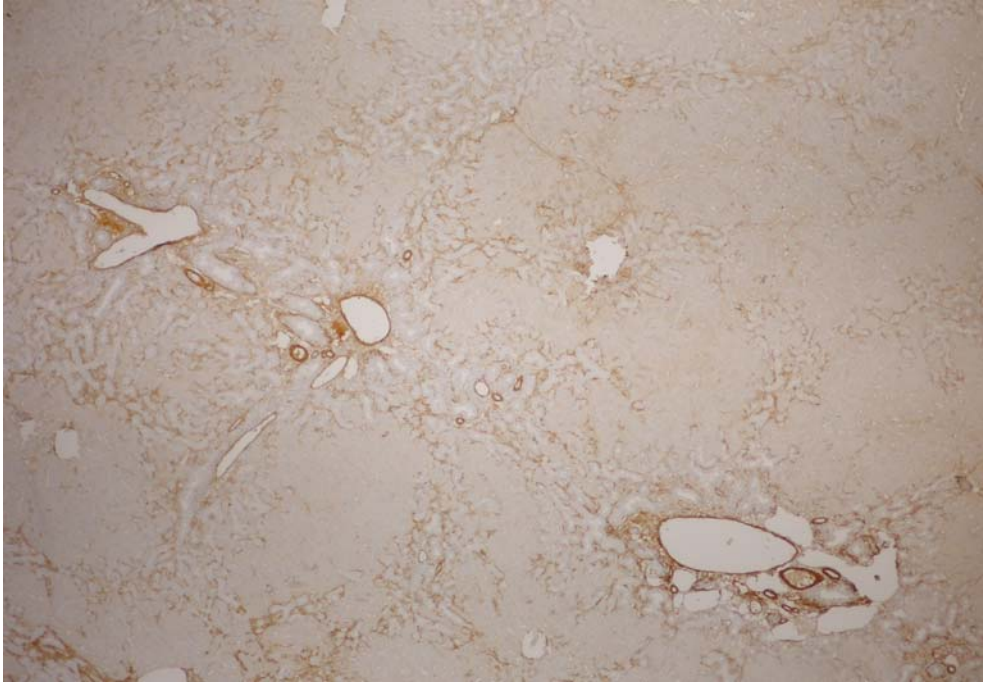
Şekil 20: Kontrol grubunda α - SMA immün (+) reaksiyonun portal alandaki damarların çevresinde belirgin olduğu görülmekte X20.



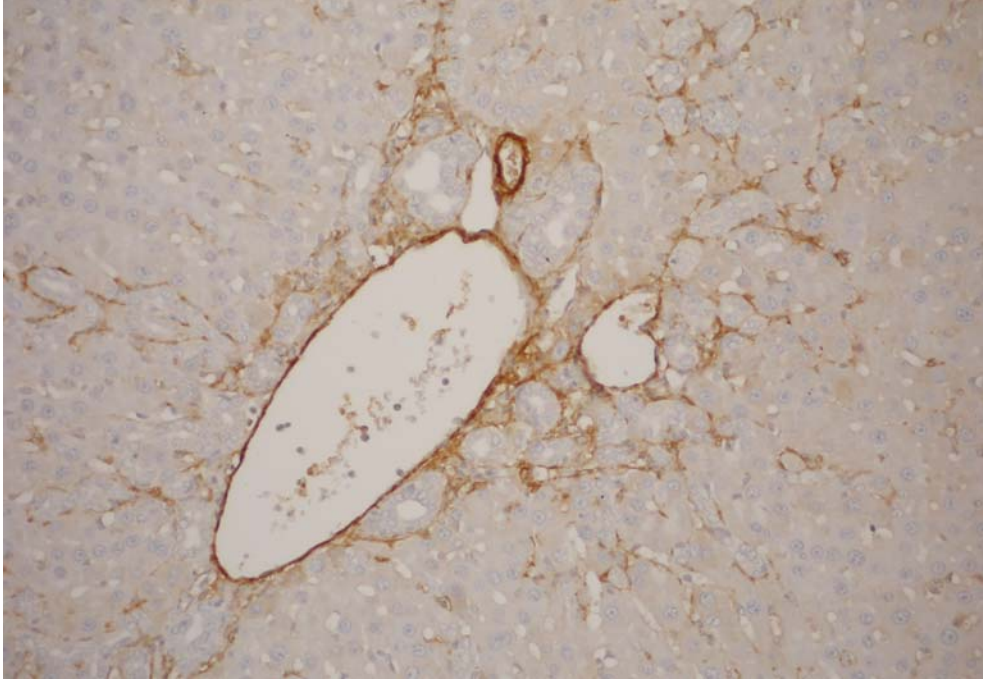
Şekil 21: Ligasyon grubunda α - SMA immün boyanması v. sentralis ve safra kanallarının çevresinde olduğu görülmekte X20.



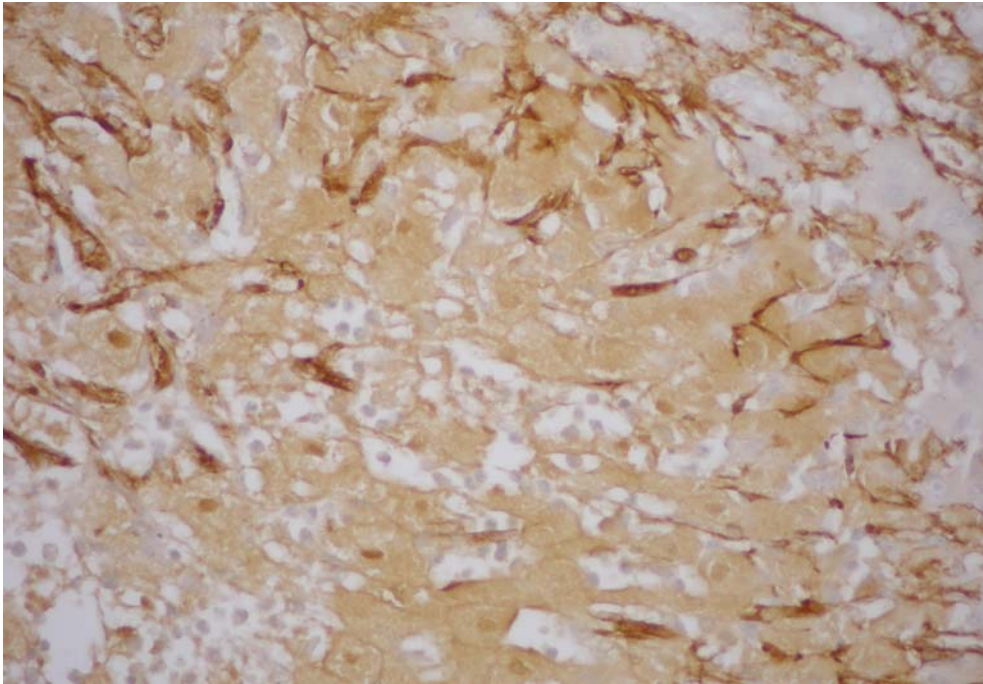
Şekil 22: Ligasyon uygulanan grupta nekroz alanları çevresindeki yassı hücrelerde kuvvetli α -SMA immün boyanması görülmekte x20.



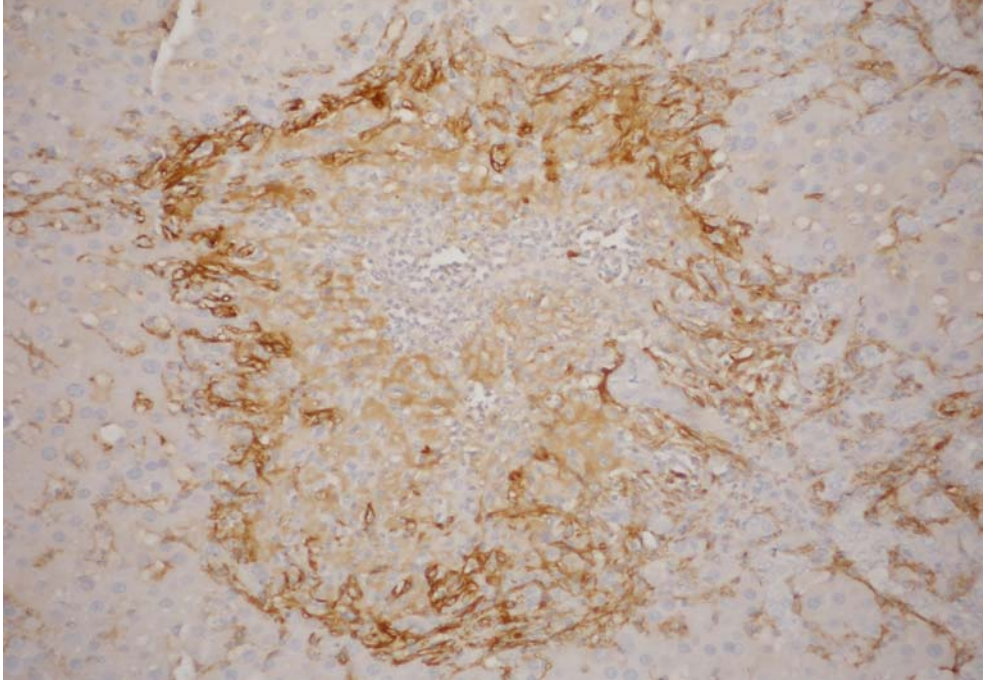
Şekil 23: NAC uygulanan grupta portal alandaki damar duvarlarında ve safra kanalları sınırlarında kuvvetli α -SMA boyanma görülmekte x4.



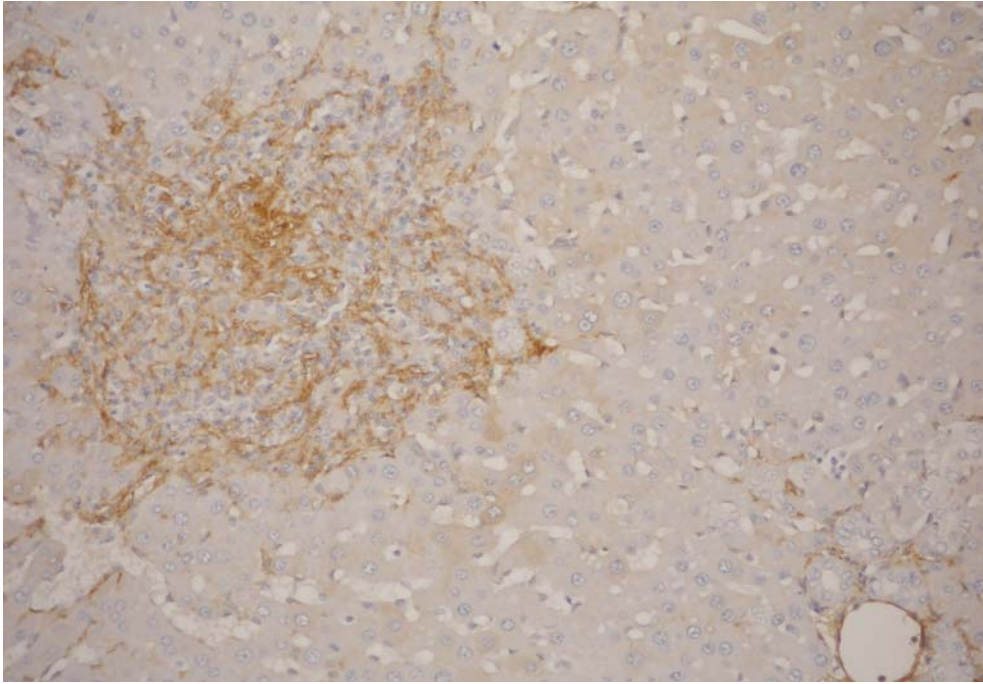
Şekil 24: NAC+C Vitamini uygulanan grupta α - SMA immün boyanmanın portal alanda damar duvarlarında ve safra kanalları çevresinde belirgin olduğu görülmekte X20.



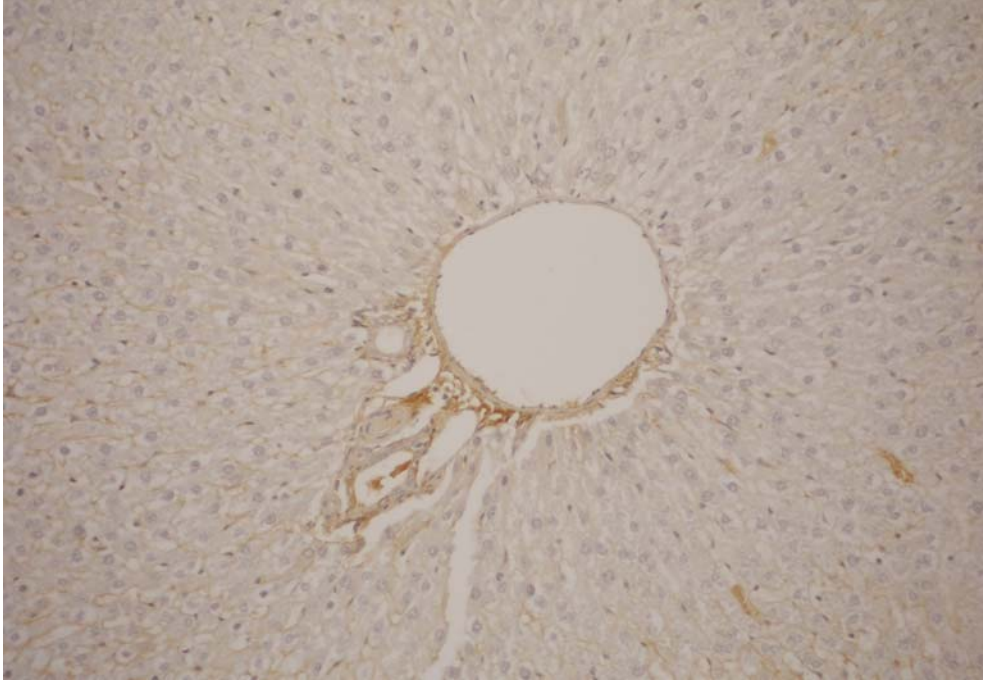
Şekil 25: NAC+C Vitamini uygulanan grupta nekroz bölgesinde kuvvetli α - SMA immün boyanması ve nekroz alanı merkezinde hepatosit dejenerasyonu görülmekte X40.



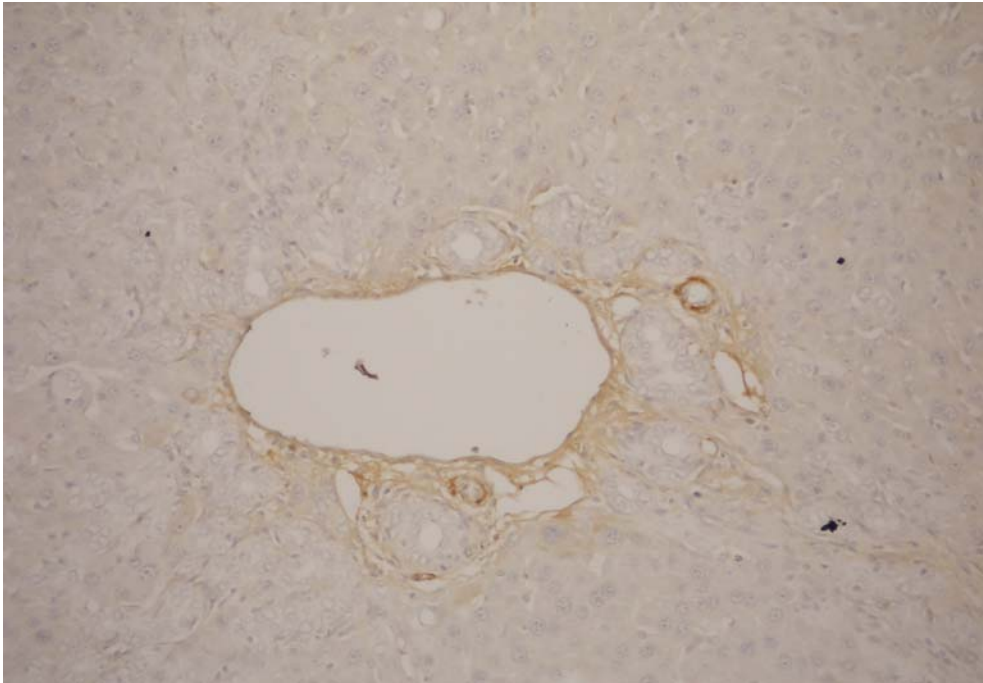
Şekil 26: C vitamini uygulanan grupta fibrotik bölgenin çevresinde kuvvetli α -SMA immün boyanan hücreler ile merkezdeki hepatositlerde piknozis ve bozulma görülmekte X20.



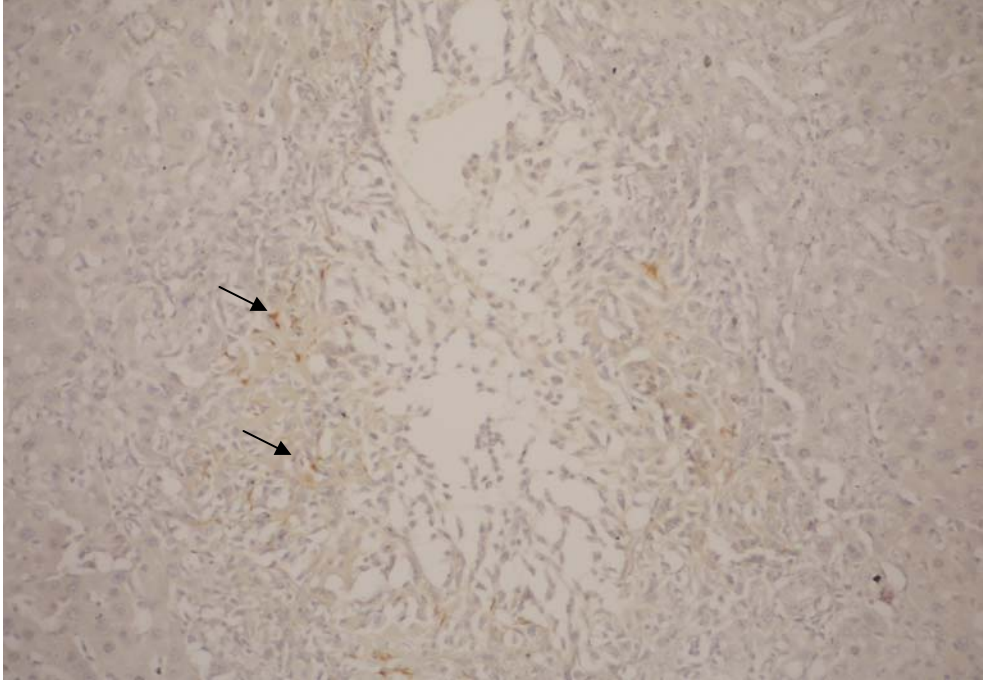
Şekil 27: Rapamisin verilen grupta yoğun α -SMA immün boyalı hücreler görülmekte x20.



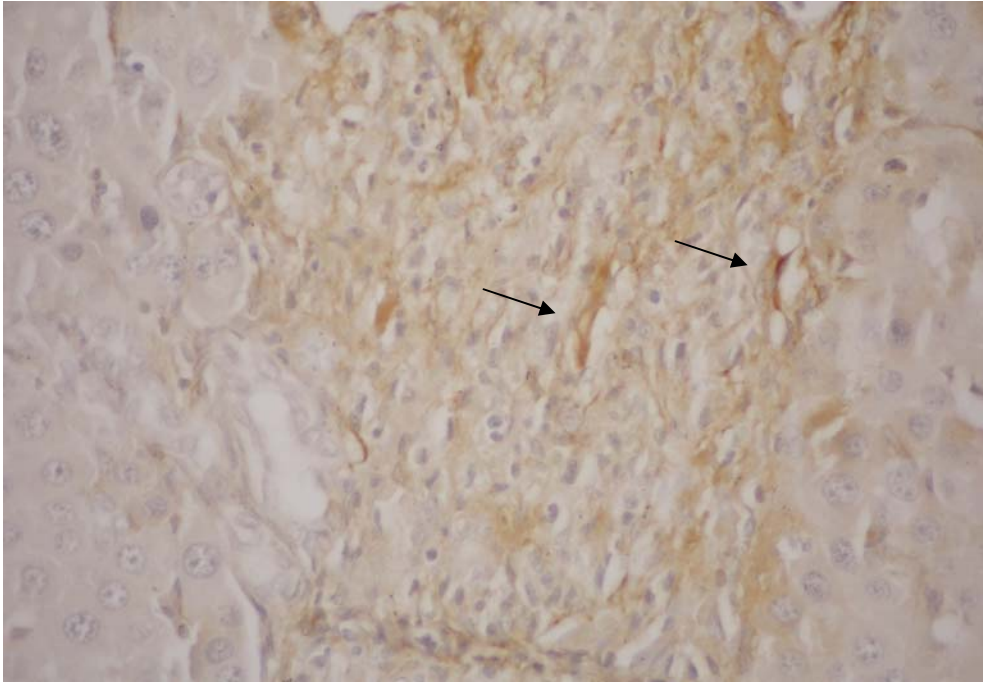
Şekil 28: Kontrol grubunda desmin immün reaksiyonunun portal alanda oldukça zayıf olduğu görülmekte x 20.



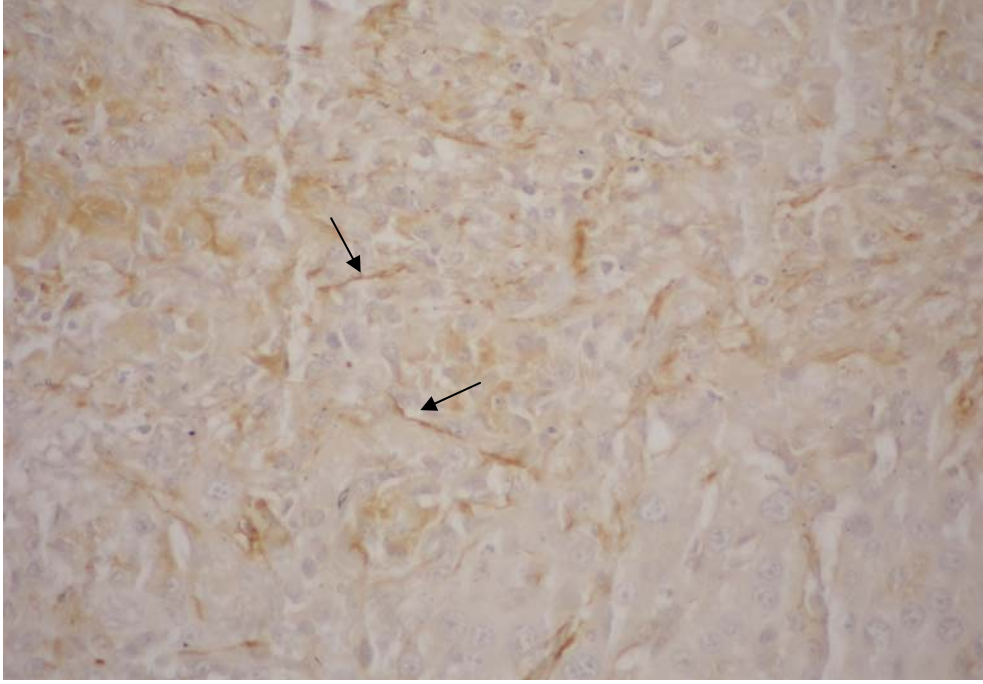
Şekil 29: Ligasyon grubunda Damsin (+) immün boyanmanın portal alandaki damarların çevresinde olduğu görülmekte X20.



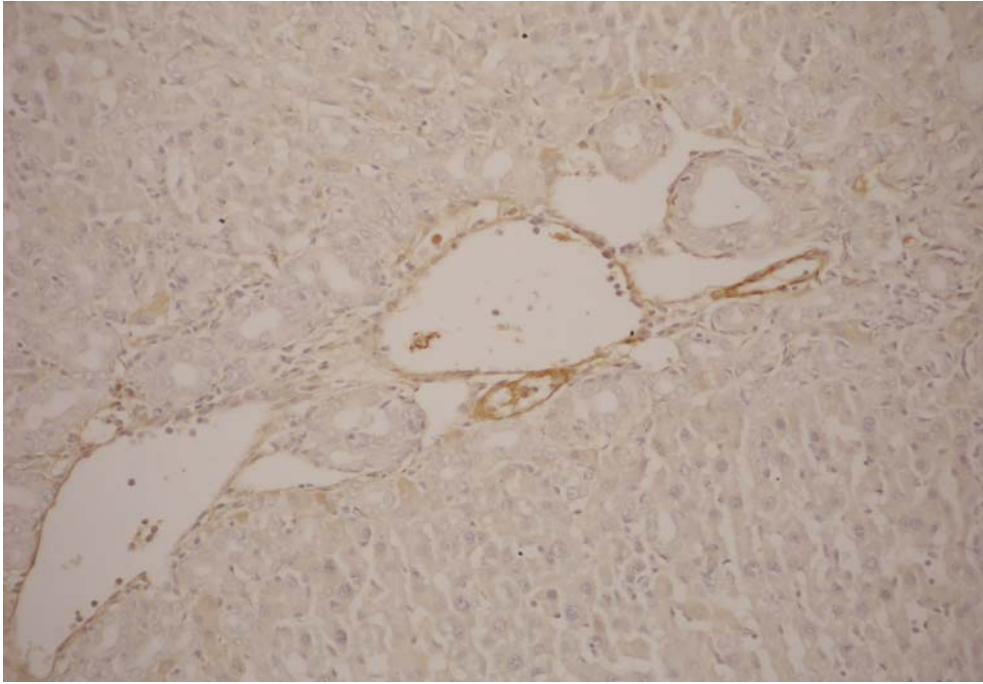
Şekil 30: Ligasyon grubunda nekroz alanlarında desmin (+) boyanmış uzantılı hücreler (→) görülmekte x20



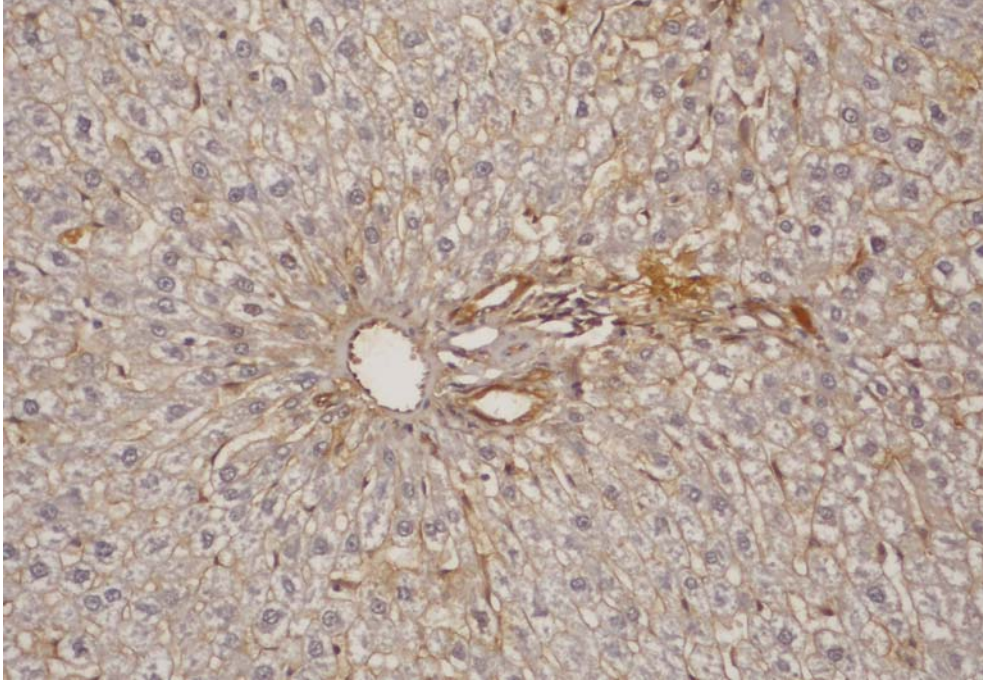
Şekil 31: Ligasyon grubunda fibrotik alanlarında desmin (+) boyanmış uzantılı hücreler (→) görülmekte x40



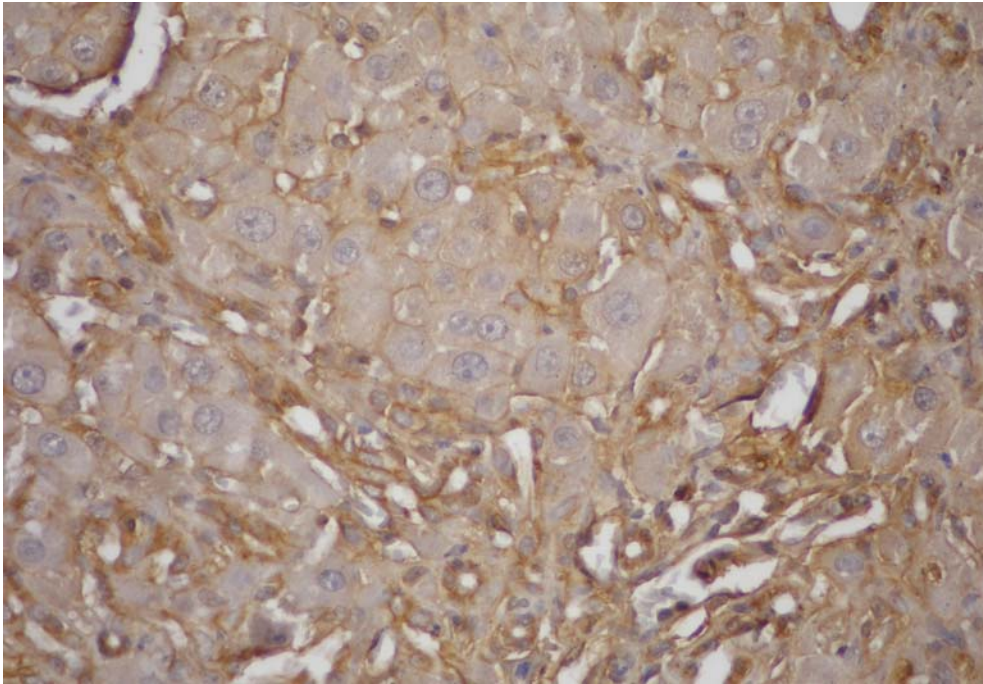
Şekil 32: C vitamini uygulanan grupta fibrotik alanda desmin immün boyanmış iğsi uzantıları olan mekik şeklinde hücreler (→) görülmekte X40.



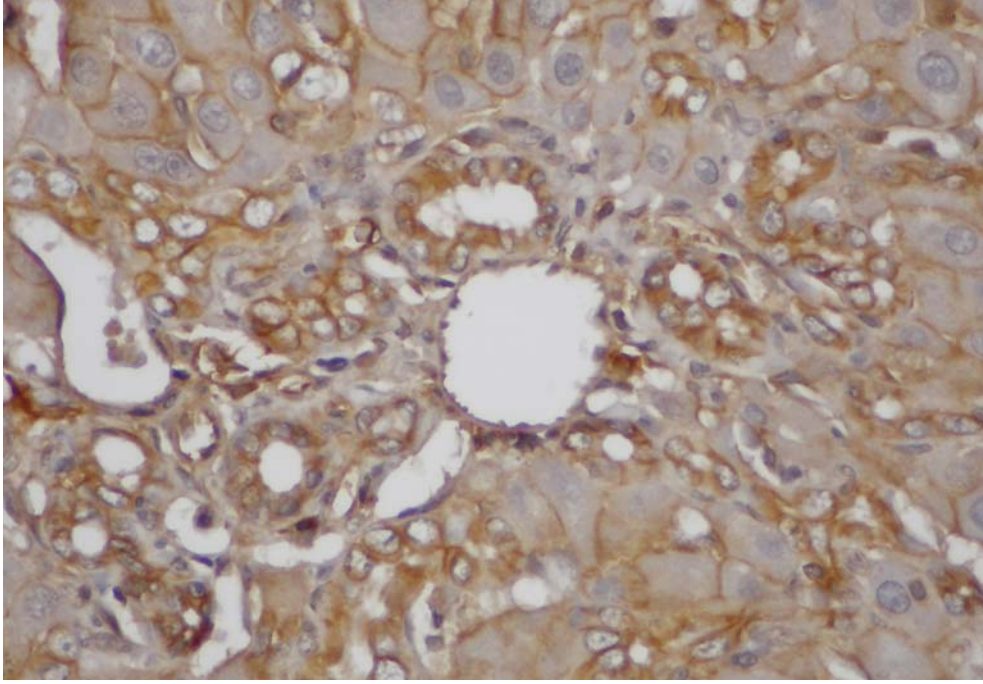
Şekil 33: Rapamisin verilen grupta desmin immün boyanması portal alanlardaki damar çevrelerinde görülmekte. x20.



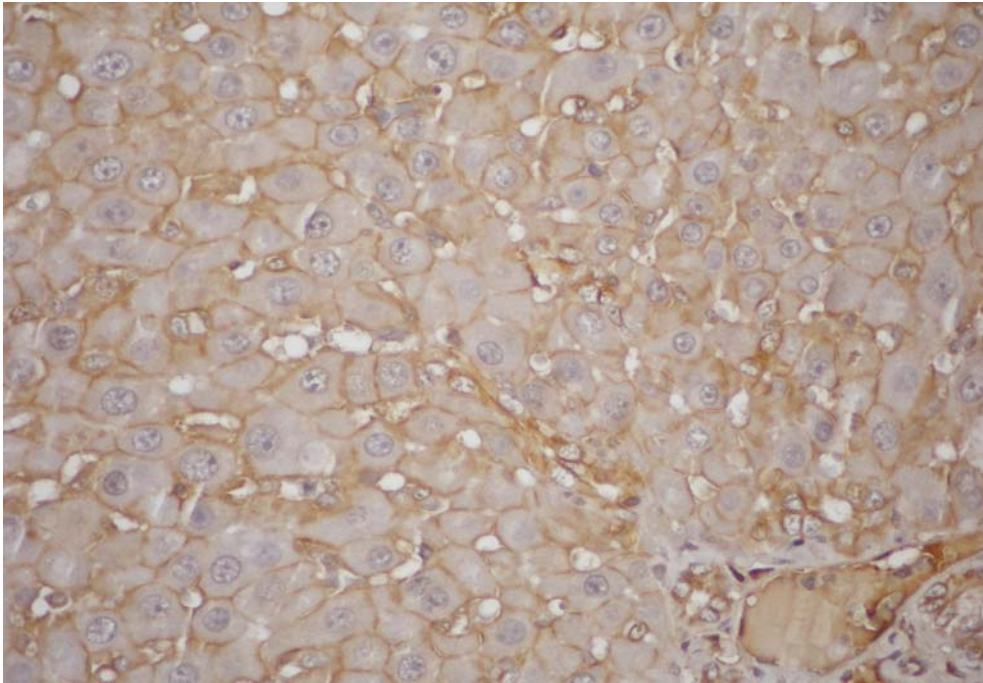
Şekil 34: Kontrol grubunda β - Katenin immün boyanmasının portal alandaki safra kanallarında belirgin olduğu, hepatosit sınırlarında ise daha zayıf bir tutulumun bulunduğu görülmekte. X20.



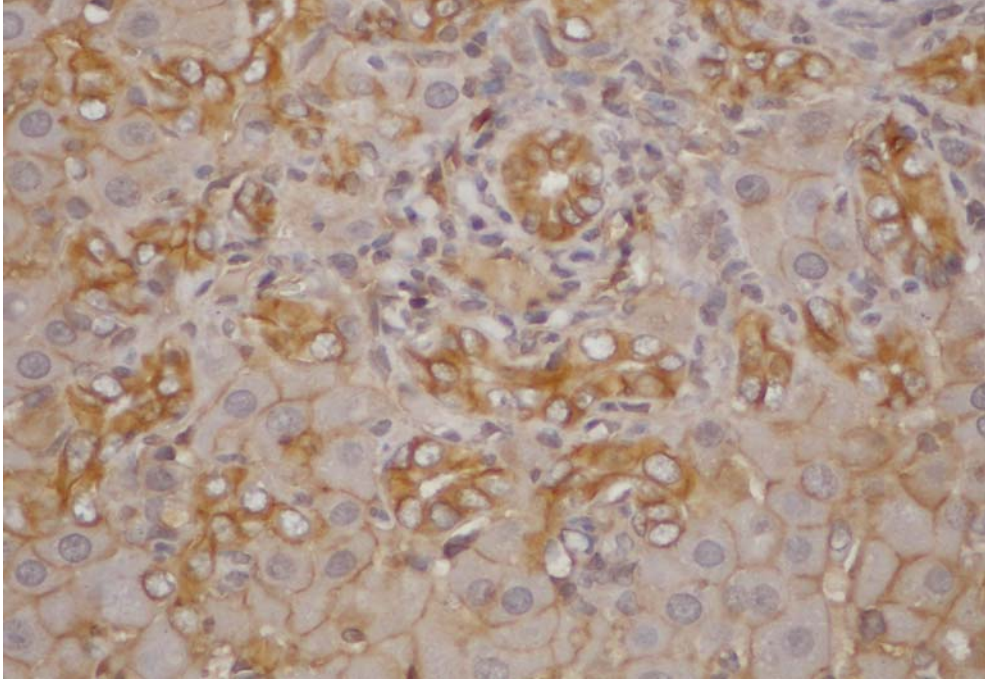
Şekil 35: Ligasyon yapılmış grupta β - Katenin immün boyanmasının safra kanal epitel hücre sitoplazması ve hepatosit sınırlarında olduğu görülmekte. X40.



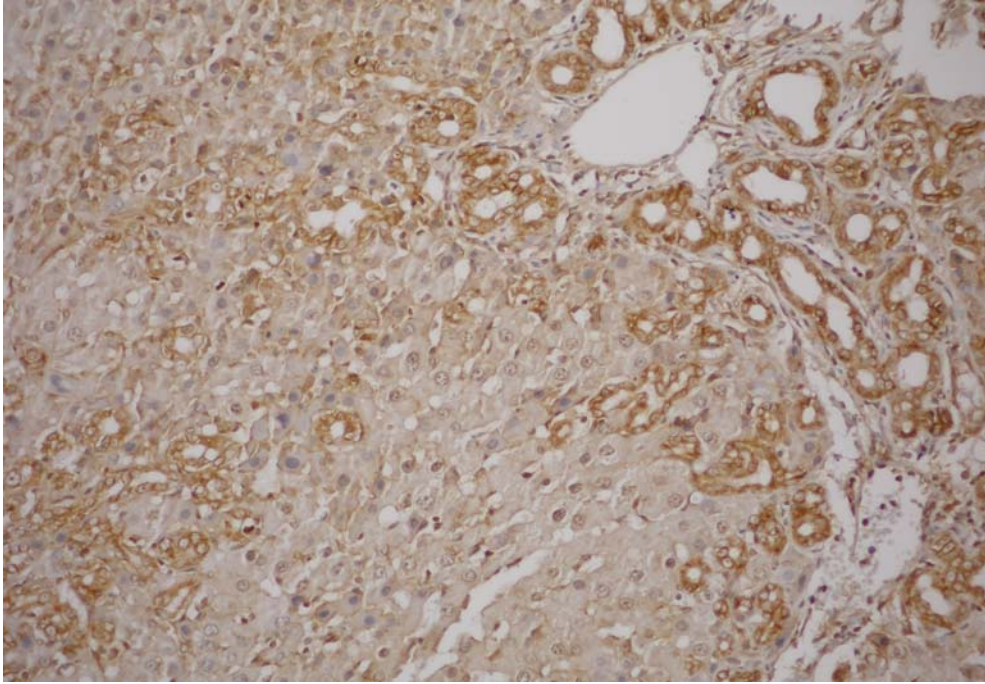
Şekil 36: NAC uygulanan grupta β - Katenin immün boyanmasının ligasyon grubuna benzediği görülmekte. X40.



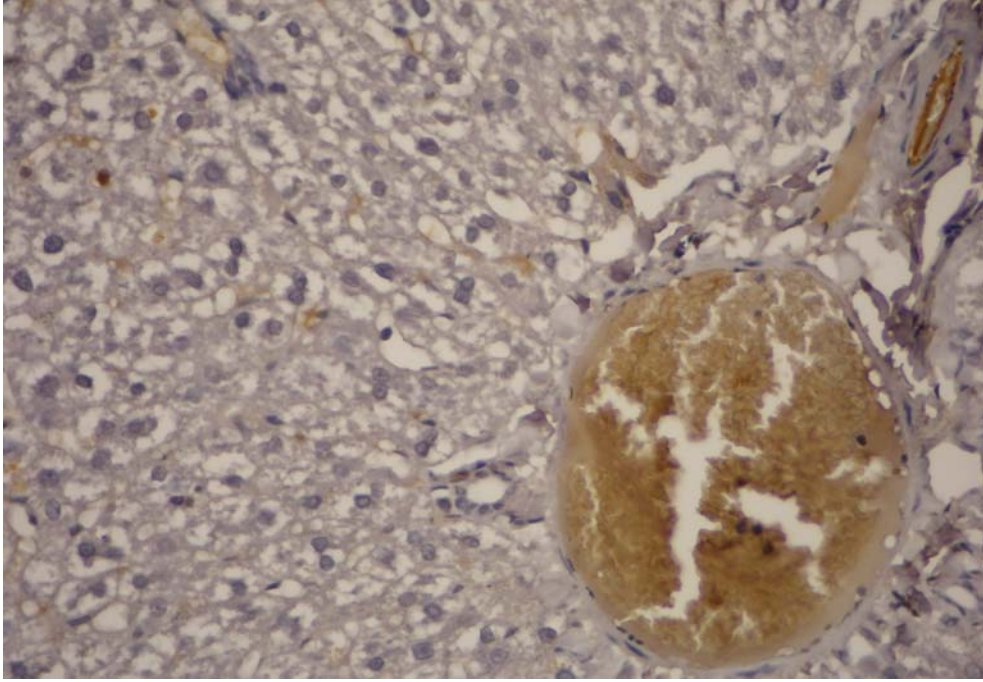
Şekil 37: NAC+C Vitamini uygulanan grupta β - Katenin immün boyanmasının hepatosit sınırlarında daha belirgin olduğu ve reaksiyonun safra kanalı epitel hücre sitoplazmasından daha çok hücre sınırlarında olduğu görülmekte. X40.



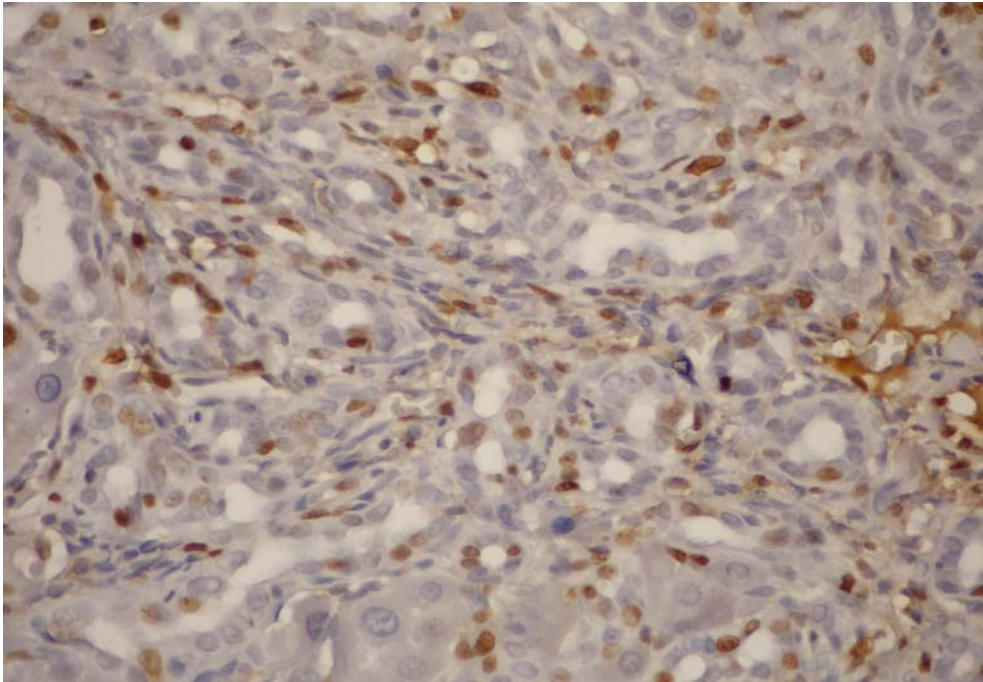
Şekil 38: C vitamini uygulanan grupta β - Katenin immün boyanmasının ligasyon grubuna benzediği, hepatosit sınırlarında ve safra kanal hücrelerinin sitoplazmalarında belirgin olduğu görülmekte x40.



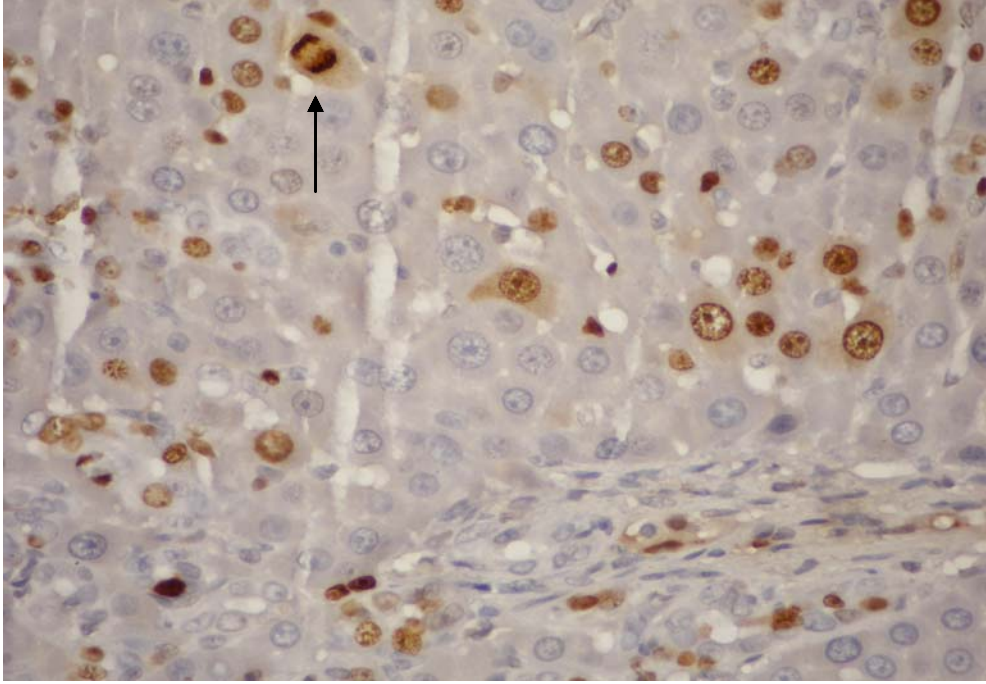
Şekil 39: Rapamisin verilen grupta β - Katenin immün boyanması safra kanalları epitelinde ve sitoplazmalarında belirgin görülmekte x20.



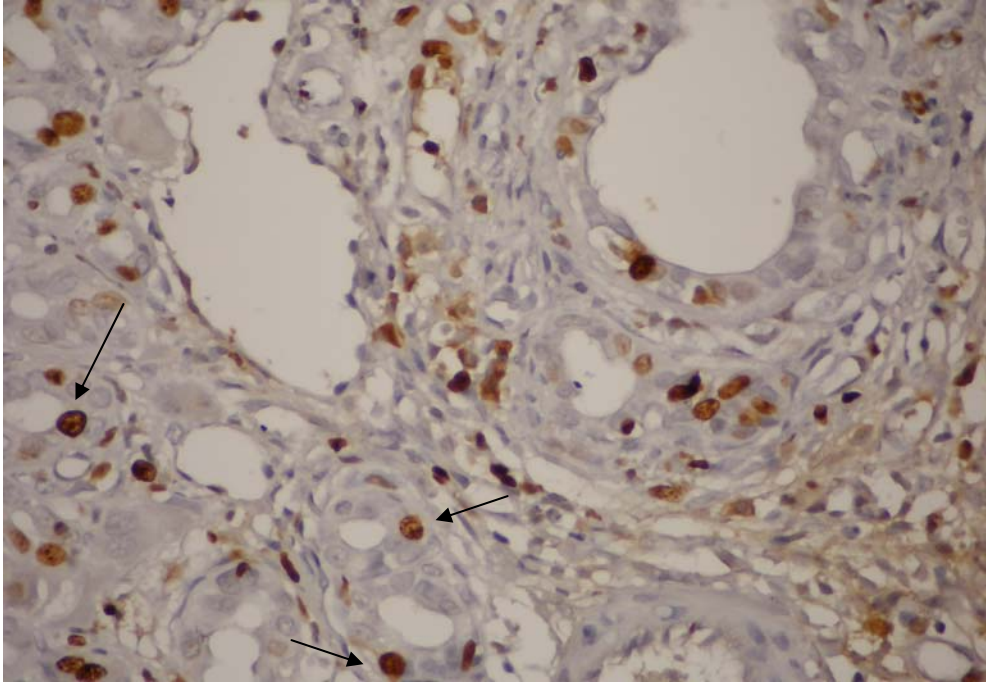
Şekil 40: Kontrol karaciğer dokusundaki hepatositlerde Ki- 67 immün boyanma oldukça az olarak gözlenmekte X20.



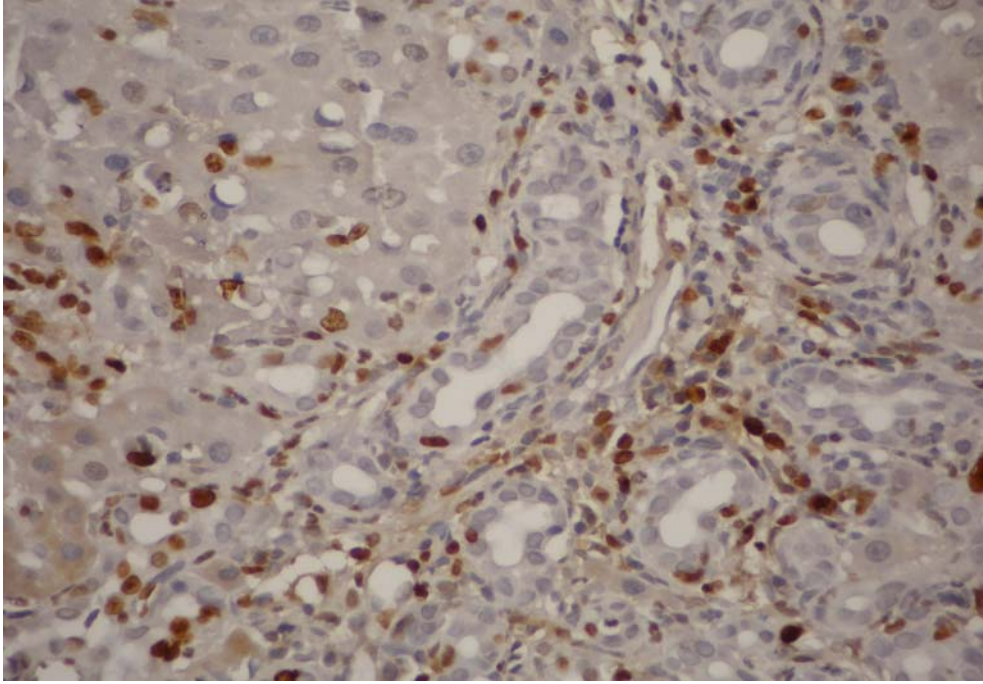
Şekil 41: Ligasyon uygulanan grupta safra kanalı proliferasyonlu bölgede safra kanal hücrelerinde kuvvetli Ki- 67immün boyanması görülmekte X40.



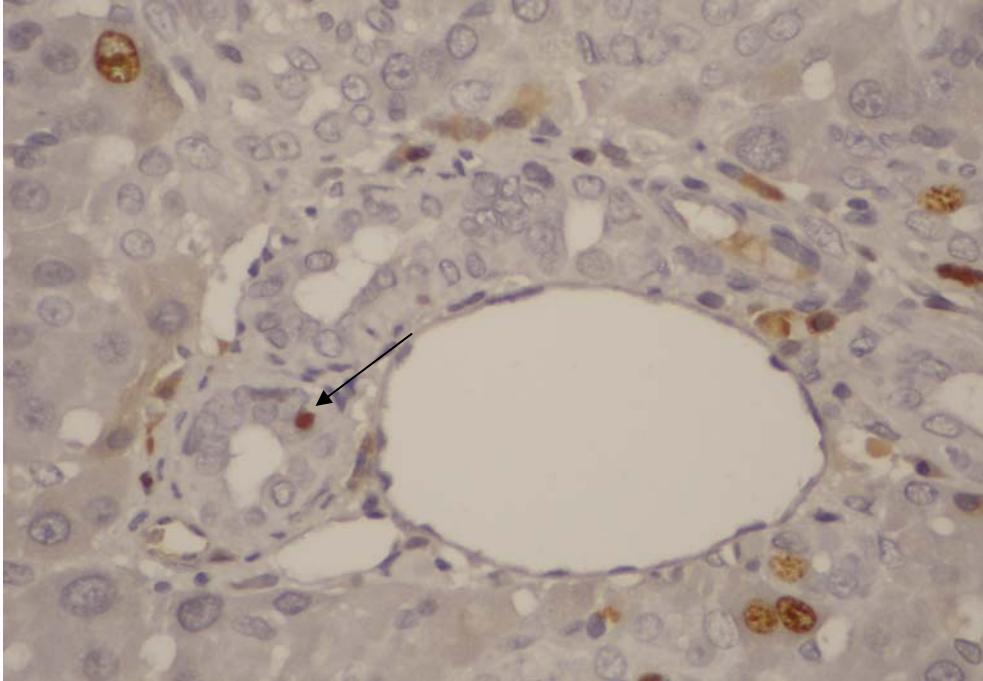
Şekil 42: Ligasyon uygulanan grupta proliferasyon bölgelerinin çevresindeki hepatositlerde Ki- 67 immün boyanmanın belirgin olduğu ve hepatositte mitotik figür (→) görülmekte X40.



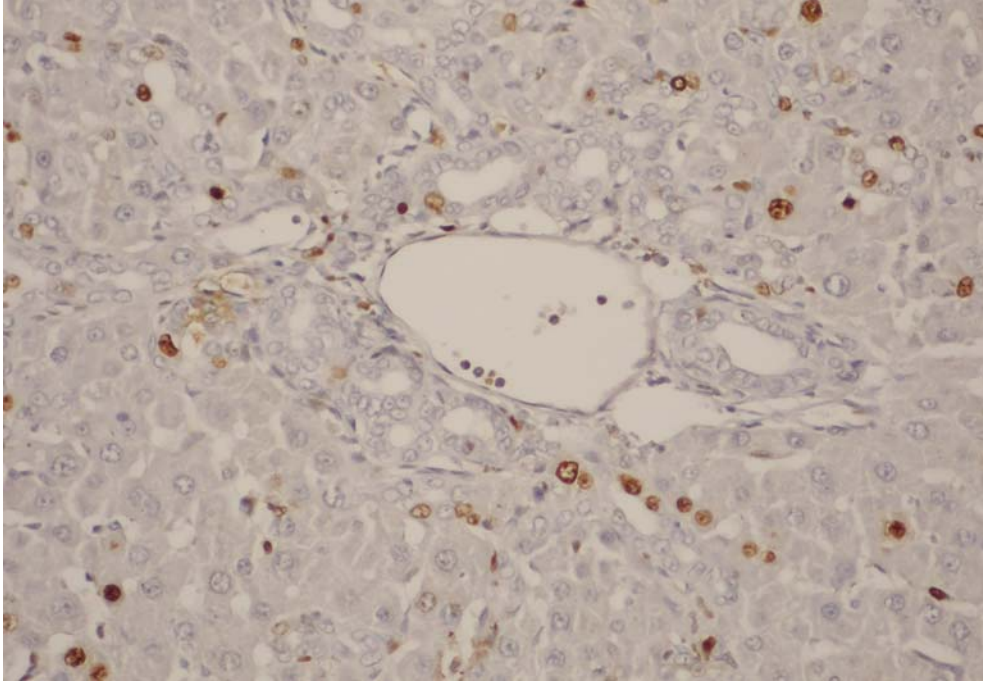
Resim 43: NAC uygulanan grupta safra kanalı proliferasyonu gösteren bölgede bulunan Ki- 67(+) boyanan hücreler görülmekte X40.



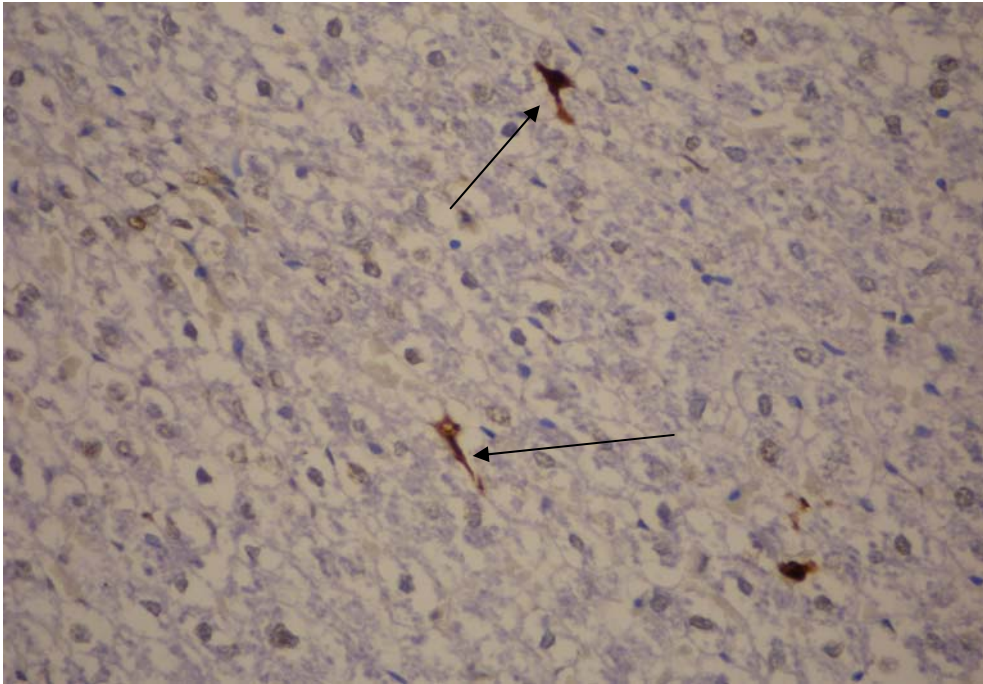
Resim 45: C vitamini uygulanan grupta safra kanalı epitel hücrelerinde Ki- 67 immün boyanmanın NAC+C grubuna göre artmış olduğu görülmekte X40.



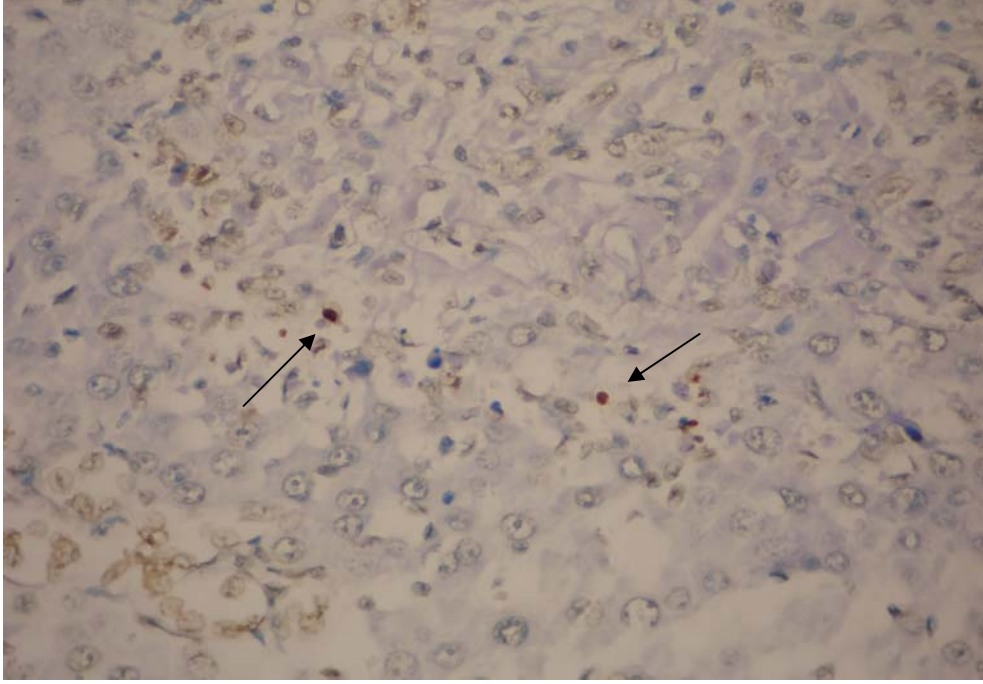
Resim 44: NAC+C vitamini uygulanan grupta Ki- 67 immün boyanan hücrelerin ligasyon grubuna göre daha az olduğu görülmekte x40.



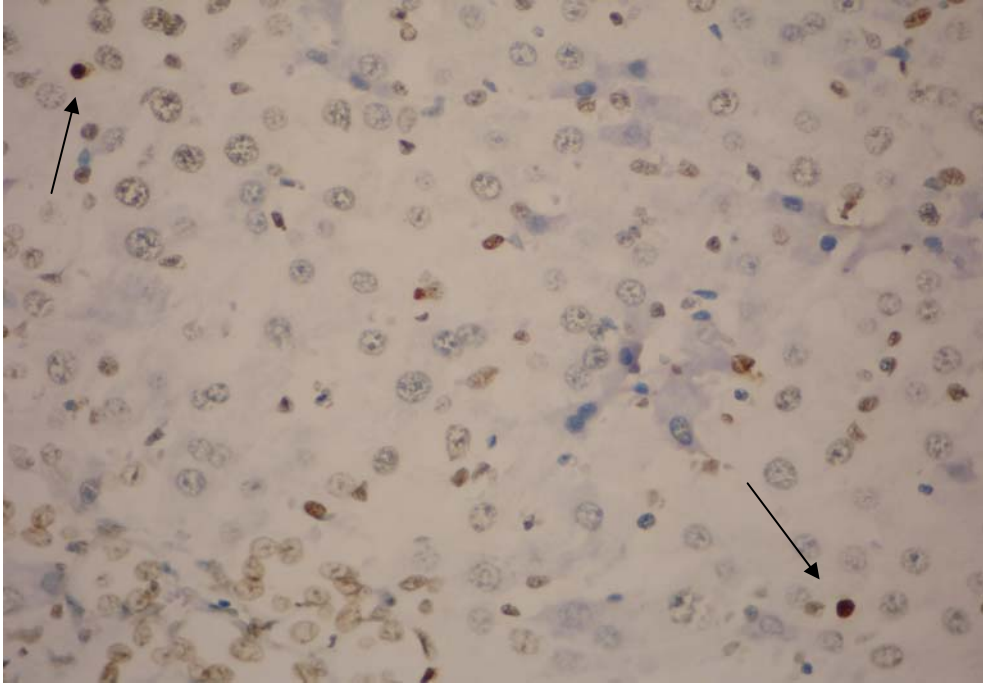
Resim 46: Rapamisin uygulanan grupta safra kanalı proliferasyonlu bölgede safra kanallarında ve hepatositlerde Ki- 67 immün boyanma görülmekte. x20.



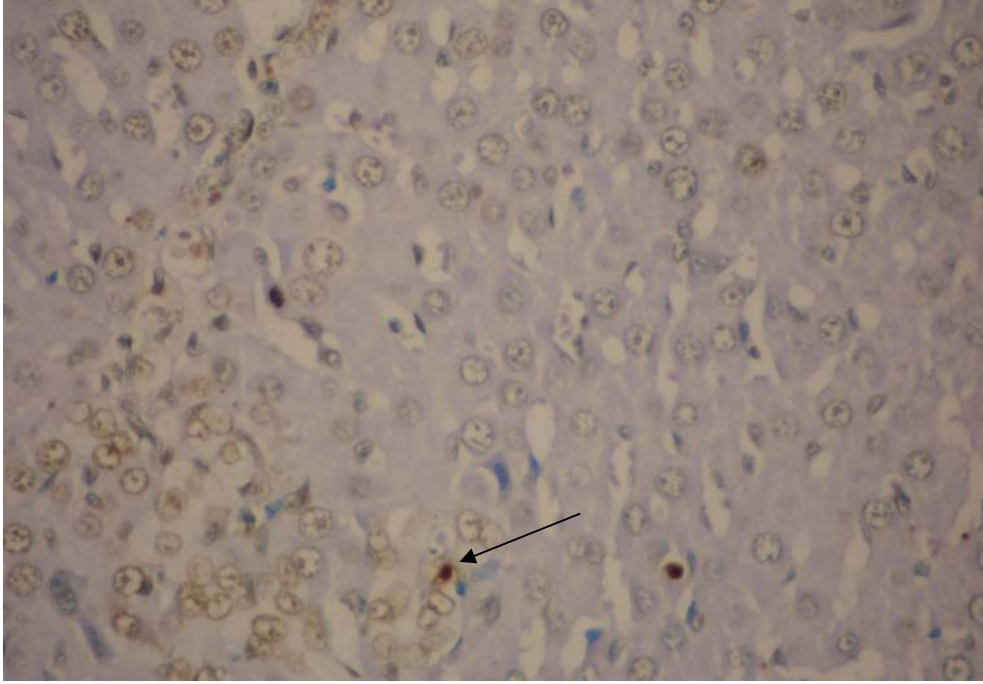
Şekil 48: Kontrol grubunda hepatositler arasında apoptotik (→) yıldız şeklindeki hücreler görülmekte. TUNEL x40.



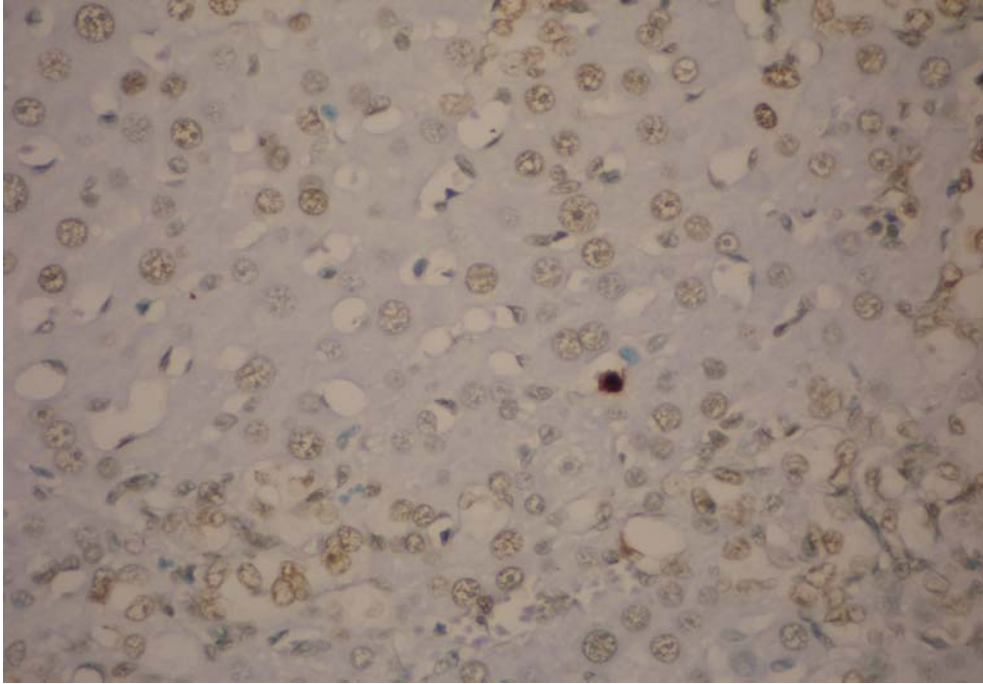
Şekil 49: Ligasyon uygulanan grupta proliferasyon alanlarında TUNEL (+) reaksiyonu gözlenmemekte ancak hepatositlerde (+) hücelere (→) rastlanmıştır TUNEL x40.



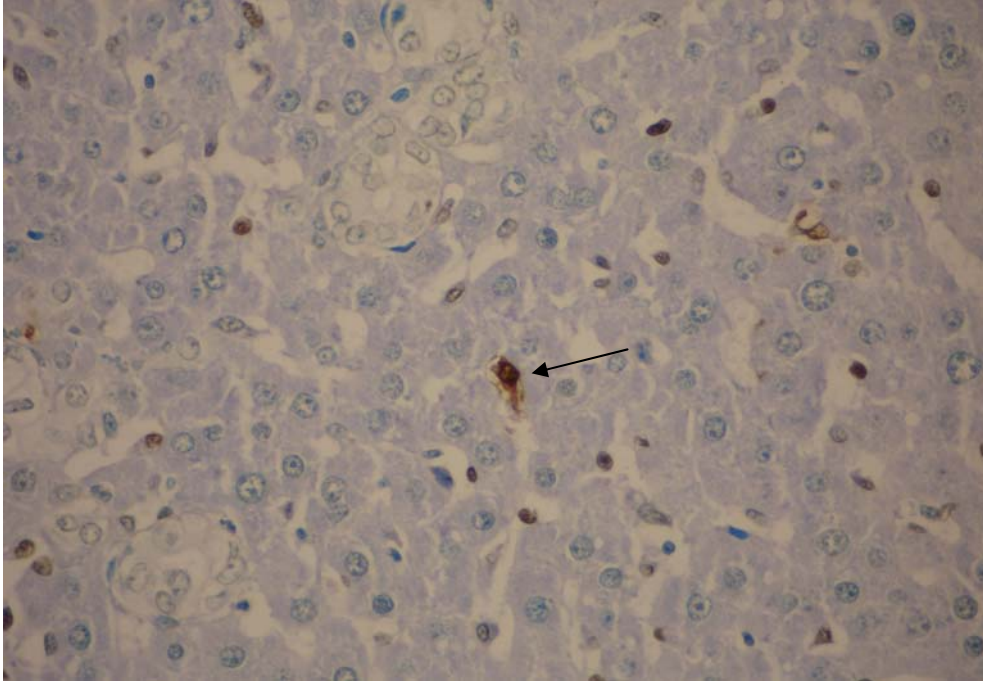
Şekil 50: Ligasyon uygulanan grupta proliferasyon alan dışındaki hepatositlerde apoptotik hüceler (→) görülmekte TUNEL x40.



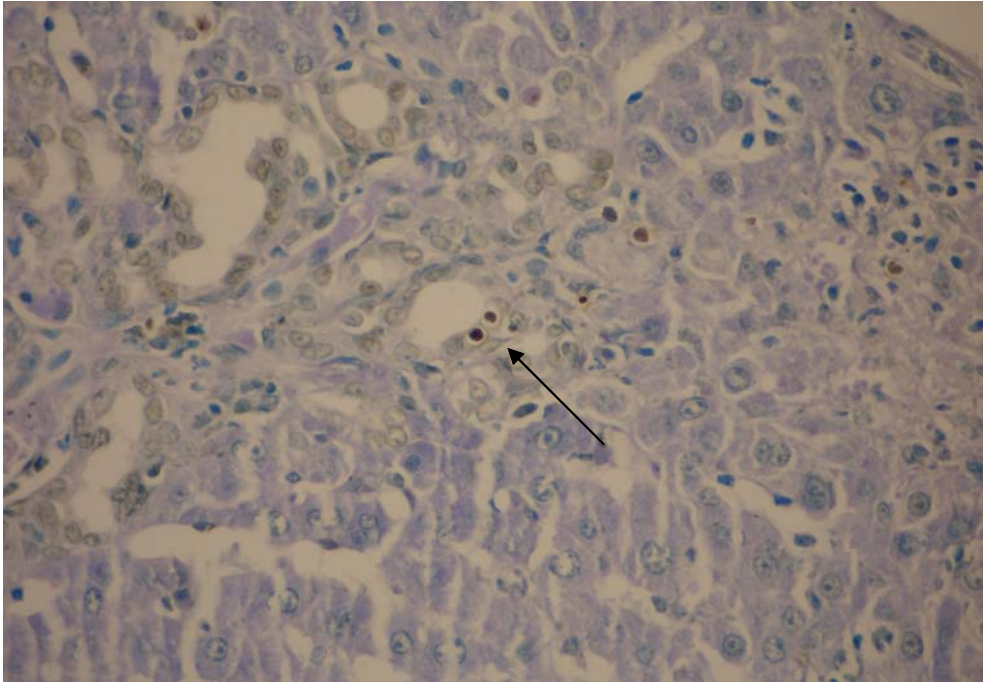
Şekil 51: NAC+C vit uygulanan grupta safra kanal proliferasyon alanında TUNEL (+) hücre (→) görülmekte x40.



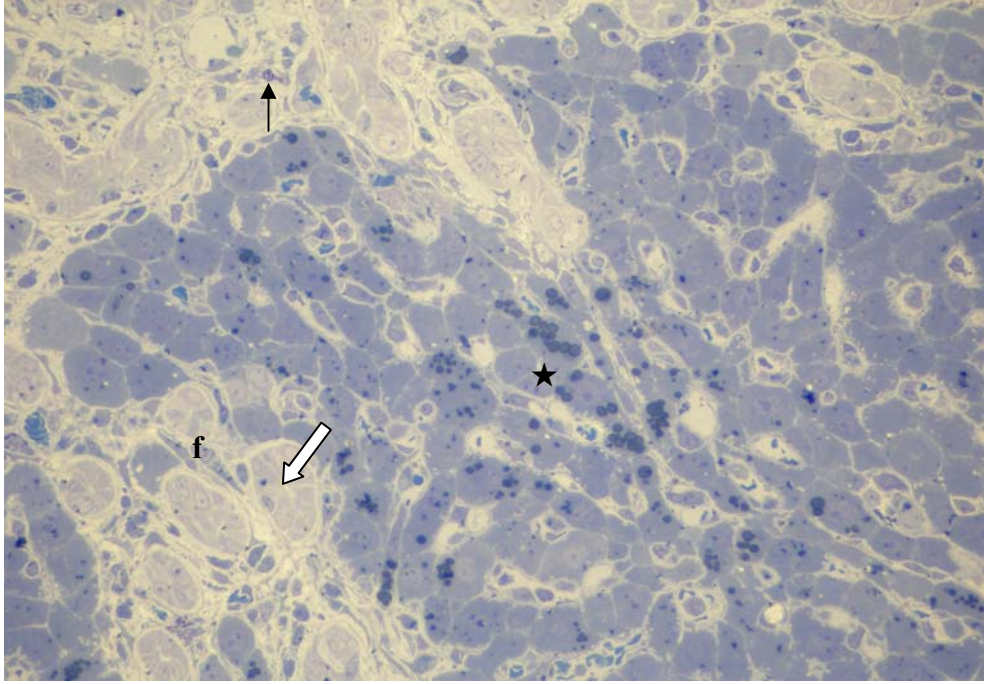
Şekil 52: NAC ile tedavi edilen grupta proliferasyon alanlarında TUNEL (+) hücre izlenmemiştir x40.



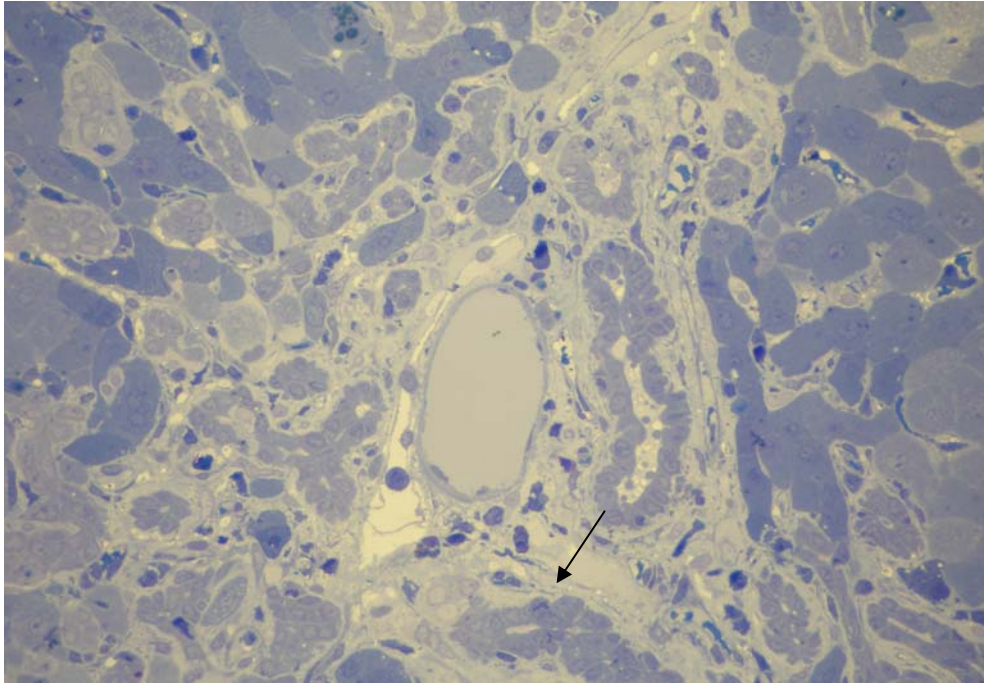
Şekil 53: Rapamisin uygulanan grupta hepatositler arasında TUNEL (+) uzantılı hücre(→) görülmekte. TUNEL x40.



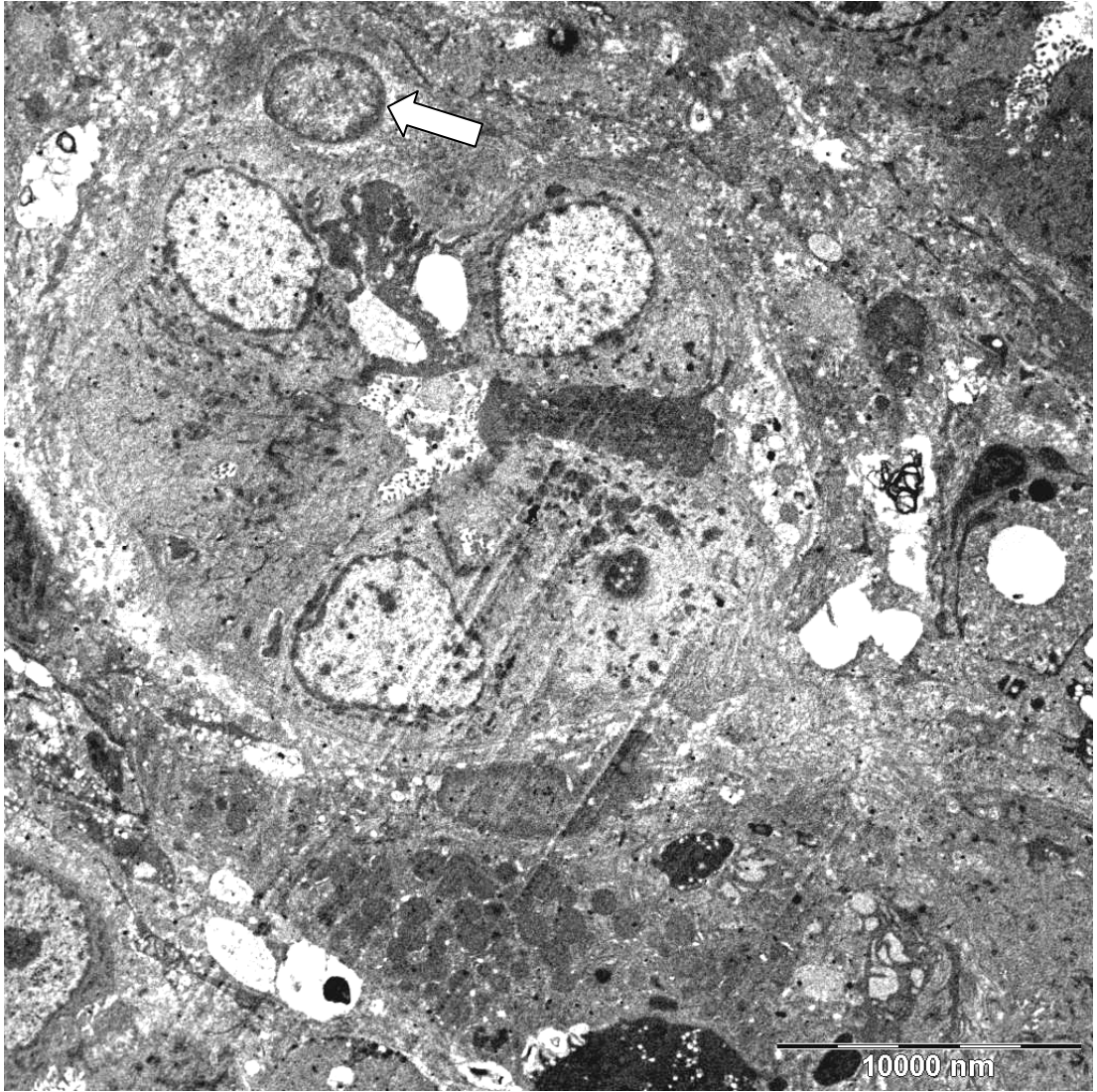
Şekil 54: Rapamisin uygulanan grupta safra kanallarında artmış apoptotik (→) hücreler görülmekte. TUNEL x40.



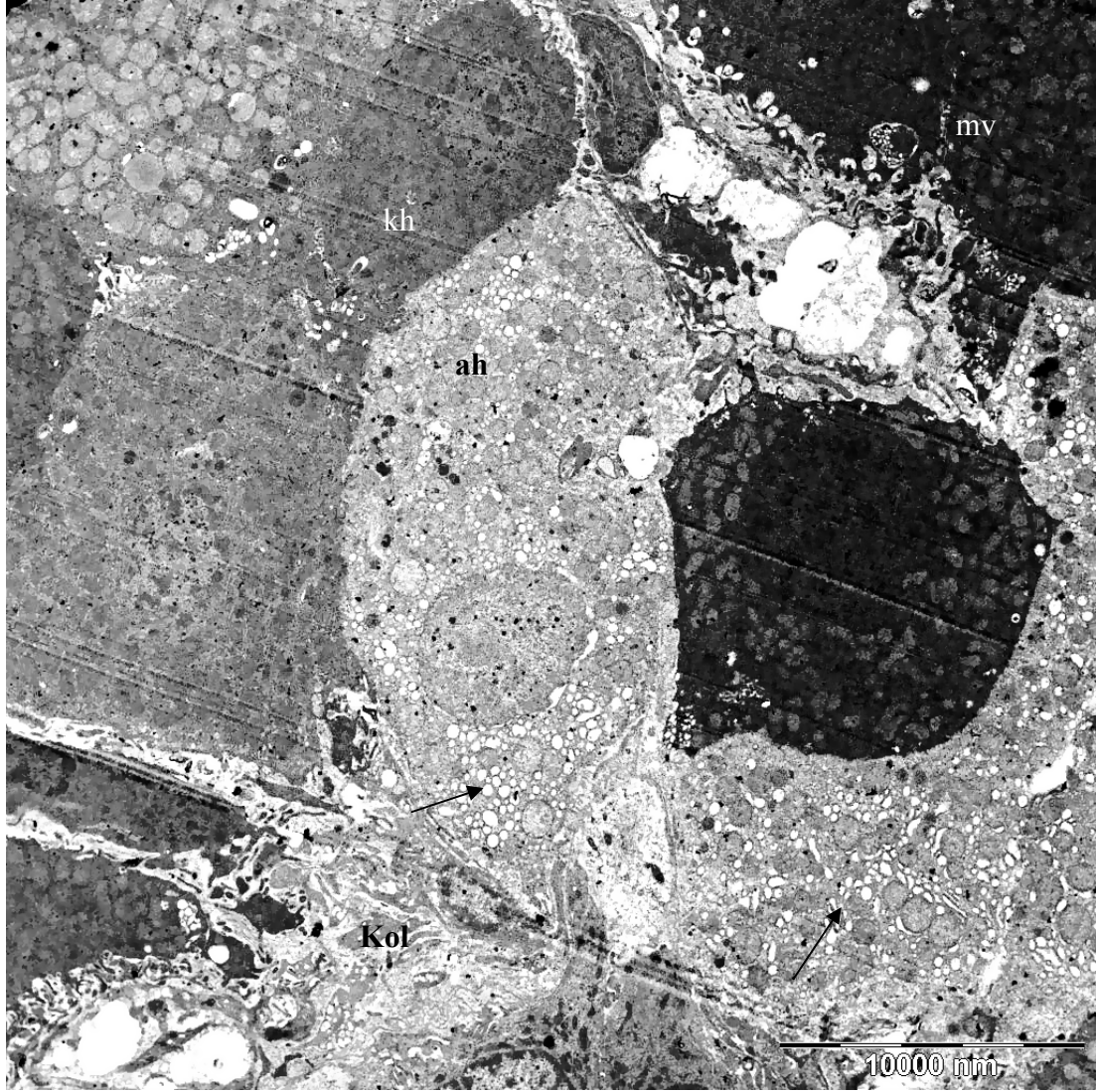
Şekil 55:Ligasyon grubunun yarı ince kesitinde artmış safra kanalları ve çevresindeki hepatositlerde yaygın lipid damlacıkları (★) görülmekte. Genişlemiş sinüzoidler, safra kanallarında koyu boyanmış, yassı çekirdekli hücre(⇨), fibroblastlar (f), mast hücresi (→), görülmekte. Toluidin mavisi- Azur II x 40.



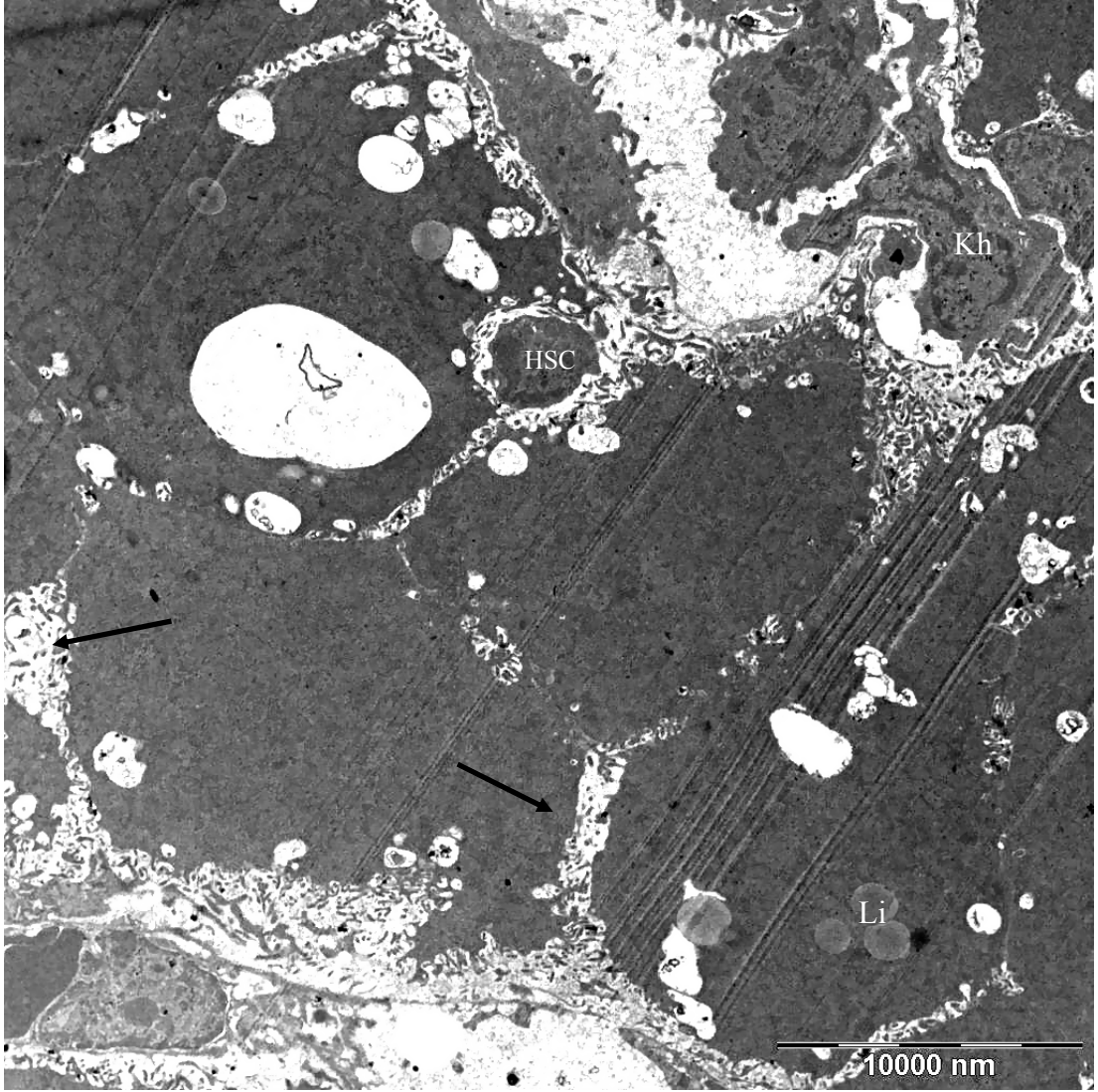
Şekil 56: NAC+C vitamini uygulanan grupta hepatositlerde azalmış lipid damlacıkları ve safra kanal epitelinde mitotik figür (→) görülmekte Toluidin mavisi- Azur II x 40



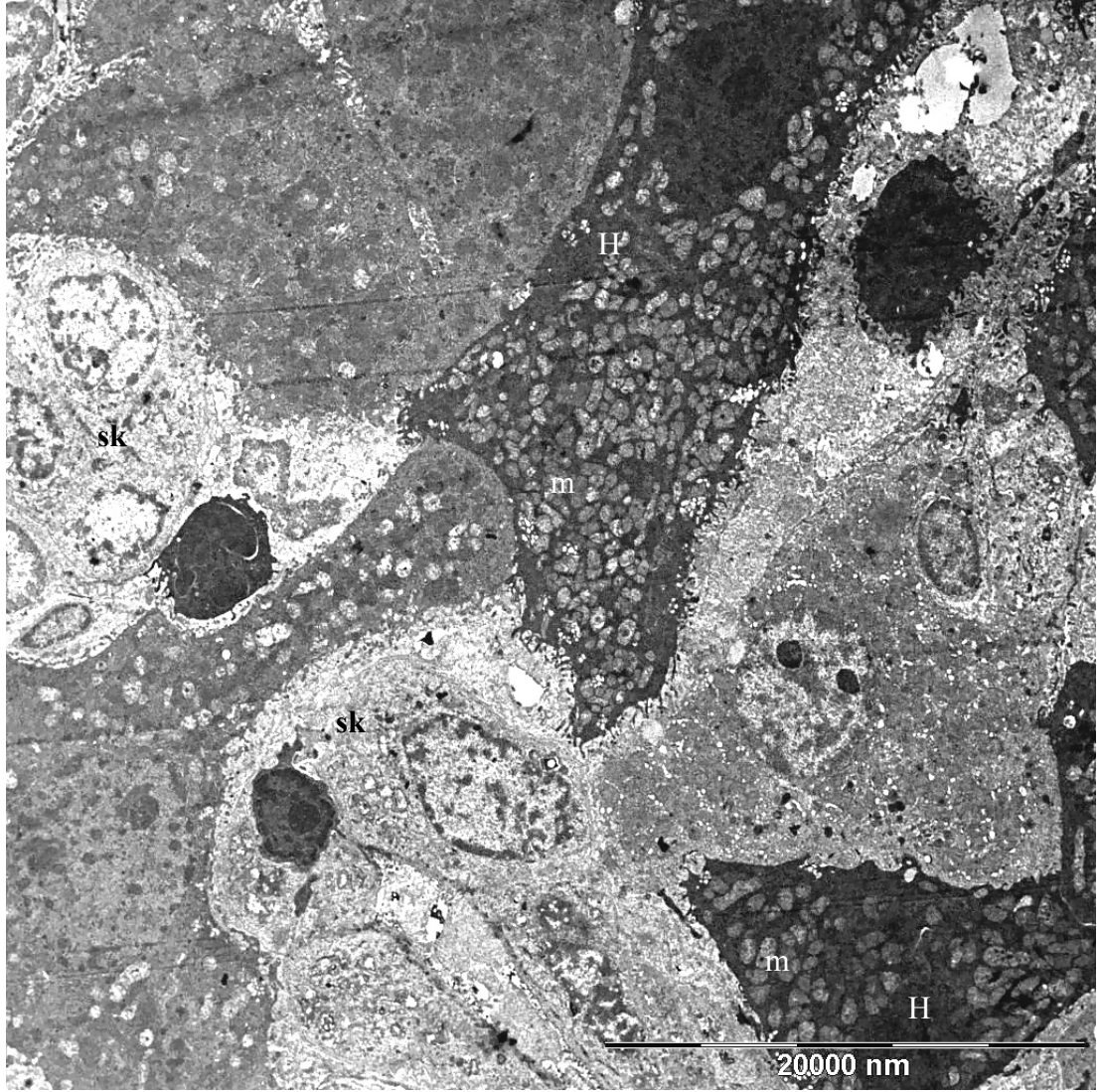
Şekil 57: Ligasyon grubuna ait elektron mikroskobik şekilde safra kanal epiteli görülmekte. Epitel hücre çekirdekleri ökromatik, yuvarlak, merkezi yerleşimli, apikal yüzlerinde mikrovillusler belirgin olarak seçilmekte. Hücreler arası daha koyu boyanmış sitoplazma bölgesi, bazalde oval çekirdekli hücre(⇒) görülmekte. Kurşun sitrat-uranil asetat



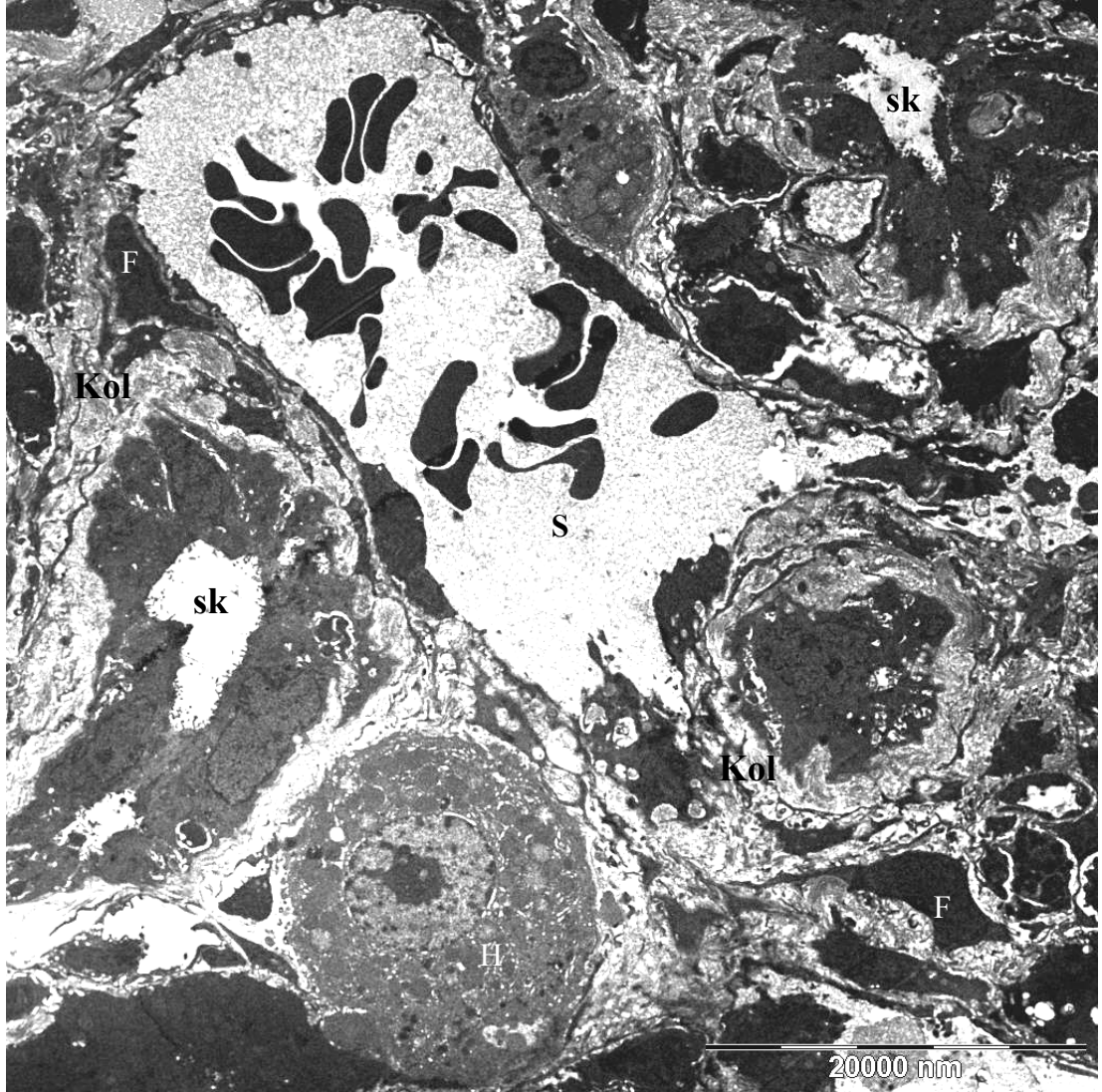
Şekil 58: Ligasyon grubunda açık (ah) ve koyu (kh) boyanmış hepatositlerin ince yapısı görülmekte. Koyu hücrelerde organeller seçilememekte, çekirdek oldukça heterokromatik gözlenmektedir. Hücre periferinde mikrovaziküler cisim (mv) yer almaktadır. Açık hücrelerin sitoplazmalarında çok sayıda genişlemiş endoplazmik retikulum yapıları(→), kristalleri bozulmamış mitokondriyonlar ve lizozomlar seçilmekte. Hepatositlerin çevresinde kollajen lifler (Kol) görülmekte. Kurşun sitrat-uranil asetat



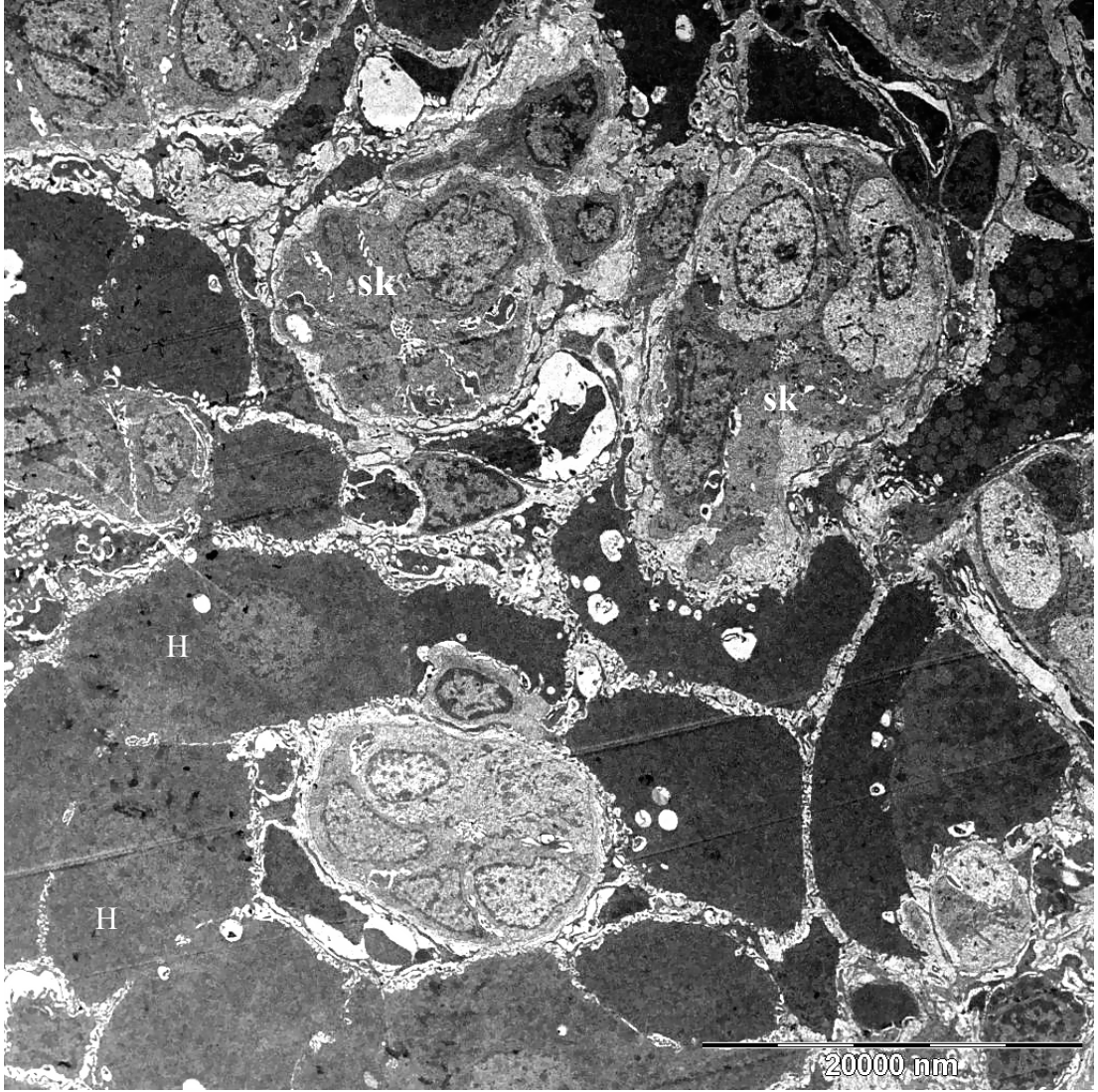
Şekil 59: Ligasyon grubunda organelleri seçilemeyen koyu hepatositler arasındaki genişlemiş safra kanalikülleri (→) görülmekte. Hücre sitoplazmalarında vakuolize yapılar (*), Lipid damlacıkları (Li), sinüzoid içinde Kupffer hücresi (Kh), hepatositler arasında lipid damlacıkları içermeyen HSC hücresi seçilmekte. Kurşun sitrat-uranil asetat



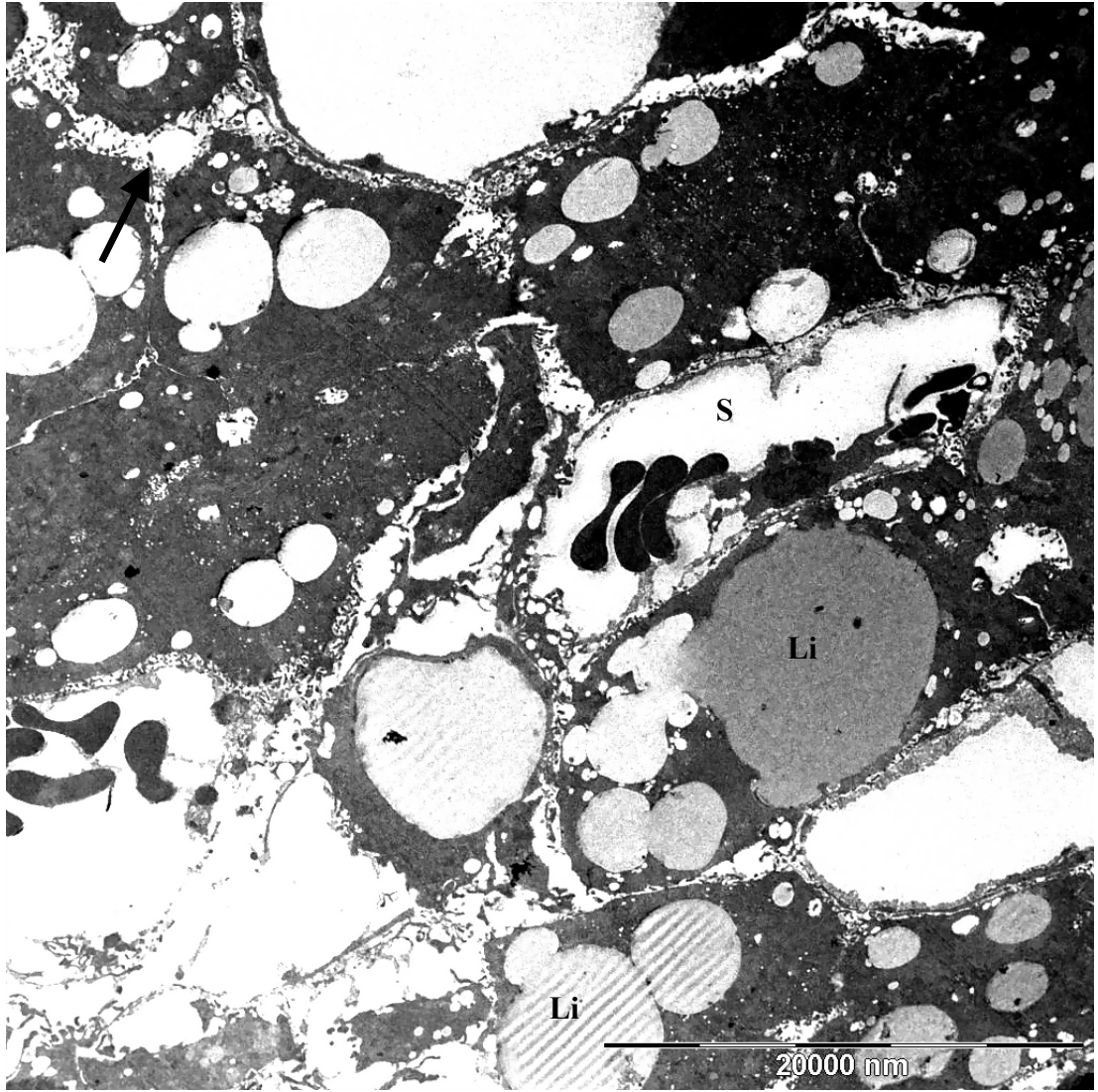
Şekil 60: NAC+C uygulanan grupta prolifer olmuş safra kanalları (sk) koyu boyanan sitoplazmasında çok sayıda mitokondriyon (m) bulunan hepatositler (H) görülmekte. Kurşun sitrat-uranil asetat



Şekil 61: Lig + C vit uygulanan grupta prolifer olmuş safra kanalları (sk) ve çevrelerinde artmış fibroblast benzeri hücreler (F), kollajen lifleri (kol), sinüzoid (S) ve belirgin çekirdek yapısı ile hepatosit (H) görülmekte. Kurşun sitrat-uranil asetat



Şekil 62: Lig+NAC uygulanan grupta prolifer olmuş safra kanalları (sk) ve hepatositler (H) görülmekte. Kurşun sitrat-uranil asetat



Şekil 63: RAPA uygulanan grupta bazı alanlardaki hepatositlerin çok sayıda ve değişik çaplarda lipid damlacıkları içerdiği görülmekte. Genişlemiş sinüzoidler, genişlemiş safra kanalikülleri (→) izlenmekte. Kurşun sitrat-uranil asetat

TARTIŞMA

Karaciğer fibrozisi yapısal ve metabolik bozukluklara bağlı olarak ortaya çıkan patolojik bir tablodur ve çok sayıda faktör buna neden olabilmektedir. Hepatik stellat hücreler, fibrozisin oluşmasında anahtar rol oynamaktadır. Aktifleşen bu hücreler miyofibroblast özelliği kazanmakta, kollajen tip I ve tip III artışı yanında ekstra sellüler matriks artışı da ortaya çıkmaktadır (86,87). Tarihsel olarak hepatik fibrozisin, karaciğer parenkim dokusunun geri dönüşümsüz olarak yıkılması ve kollajenden zengin dokunun hakimiyetine bağlı olarak ortaya çıktığı bilinmektedir (88,89). Halen kronik karaciğer zedelenmelerinde yara iyileşmesi cevabının bu şekilde geliştiği kabul edilmektedir (90). Hepatik fibrozis, geridöndürülebilen dönemde tedavi edilirse başarı oranı yüksektir ve siroza gidiş önlenabilir. Sirozun önlenmesi veya ilerleyişinin kontrol edilmesi hala bir sorun olarak durmaktadır. Etkili ilaçların veya maddelerin bulunması için çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Deneysel olarak karaciğer fibrozisini oluşturmak için uygulanan yöntemlerden birisi olan safra kanalı ligasyonu yapılan bu çalışmada, ligasyon sonrası 21. günde fibrotik değişikliklerin ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Ligasyona bağlı olarak portal alanda safra kanallarının artışı şeklinde ortaya çıkan tipik duktular reaksiyon ışık mikroskopik olarak tanımlandı. Duktular reaksiyonlar, tipik, atipik veya oval hücre proliferasyonu olarak sınıflandırılmaktadır. Tipik duktal reaksiyonda, safra epitel hücrelerinin sayısında artış olmaktadır (91). Ligasyon sonrası 17-31. günler arasında biyokimyasal değişiklikler ortaya çıkmaktadır (92). Altı hafta süre ile ligasyon yapılan köpeklerde ALT ve bilirubin seviyelerinin 1. hafta sonunda en yüksek değerine ulaştığı, ALP ve GGT değerlerinin ise 2 hafta sonra yükseldiği daha sonra bu değerlerin giderek düştüğü ancak ligasyon öncesine göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür (43). Enzim düzeylerindeki artış, ileri dönemlerde azalan portal kan akımı nedeniyle bölgedeki fonksiyonel hepatositlerin sayıca azalmasına bağlı olarak azalmaktadır (93). Karaciğer enzimlerinin ve bilirubin düzeylerinin artışı kollajen birikimine yol açmakta ve fibrozis oluşmaktadır (8,82). Bir başka deneysel çalışma sonucunda, ligasyondan 14 gün sonra ALT, AST, ALP, GGT ve bilirubin değerlerinde benzer değişiklikler saptanmıştır (1). Bu çalışmada, ligasyon sonrası 21. günde ALT, AST, ALP ve bilirubin düzeylerinin kontrol grubuna göre artmış

olduğu tespit edilmiştir. Kolestazın derecesini belirlemede önemli olan GGT düzeyleri, rapamisin verilen grup haricinde ligasyon ve diğer tedavi gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştı. Rapamisin uygulanan grupta GGT düzeyinin anlamlı olarak azalmış olması tedavinin biyokimyasal değerlerin düzelmesinde etkili olduğunu göstermektedir.

Karaciğer fibrozisinin gelişim mekanizması halen tartışmalıdır. İnflamatuvar hücrelerden salgılanan sitokinlerin fibrogenesis oluşumunda önemli rol oynadığına inanılmaktadır (94). Bu çalışmada, ligasyon ve tedavi gruplarında safra kanalı proliferasyonunun olduğu portal alanlarda, nekroz ve fibrotik alanlarda inflamatuvar hücre artışının olduğu saptanmıştır. İnflamatuvar hücre artışının ligasyon grubunda diğer gruplarla karşılaştırıldığında çok belirgin olduğu görülmüştür.

Gelişen veya gelişmiş olan fibrozisi engellemek için çeşitli ilaçlar, antioksidan maddeler, antimitojenik faktörler, bitki ekstratları kullanılmasına rağmen fibrozis tedavisinde belli bir standart bulunmamaktadır (8,41,95,96). Çalışmalar sonucunda İnterferon (97,98), malotilat (99), halofuginon (49,100), deksametazon (1), ACE inhibitörleri (101,102), kolşisin (103), sarımsak ekstresi (96) ve Tiazolidinedion grubu antidiyabetiklerin (57) fibroziste kısmen olumlu etkileri görülmüştür. Ursodeoxycholic acid (UDCA), S-adenosyl-L-Methionine (SAME), Polyenylphosphatidyl choline (PPC) membran yapılarını lipid peroksidasyonun yıkıcı etkisine karşı korumaktadır (21). Allopurinol, NAC, A, E ve C vitaminleri ise antioksidan olarak etki ederek, HSC aktivasyonunu engellemektedir (21,65,104). Antioksidan etkili resveratrolün safra kanal proliferasyonu ve lenfosit infiltrasyonunu azalttığı, plazma AST, ALT, bilirubin değerlerini ve İnterlökin-1, İnterlökin-6 ve TNF- α düzeylerini düşürdüğü tespit edilmiştir (105). Hücre kültür ortamında NAC'ın fibroziste rol oynayan hücrelerin aktivasyonunu önleyici etkileri tanımlanmıştır (106). Ligasyon oluşturulup NAC ile tedavi edilen deneklerin glutasyon düzeylerinin azaldığını (107), AST ve ALT değerlerinin düştüğü (37,65) ancak oksidatif stres değerlerinin değişmediği, histopatolojik bulguları ve inflamasyonu azalttığı saptanmıştır (37). Bu sonuçların aksine bizim çalışmamızda NAC uygulanan grupta, karaciğer enzimlerinin çok az düzeyde azaldığı, histolojik olarak safra kanal proliferasyonunun daha da artmış olduğu, köprüleşmelerin belirginleştiği tespit edilmiştir. Ligasyon yapılan sıçanlarda oksidatif hasardan

karaciğer kanlanması bozulması sorumlu tutulmaktadır (32,108). Yapılan bazı çalışmalarda safra kanalı ligasyonuna bağlı ortaya çıkan fibrozis ve sirozda oksidatif stresin sorumlu olmadığı, lipid peroksidasyonun karaciğer hasarından sonra ortaya çıktığı, antioksidanların enzimleri düzelttiği, ancak hasarı iyileştirmediği öne sürülmüştür (109,110). Antioksidanlardan oral olarak verilen E ve C vitamininin, ligasyonlu deneklerin biyokimyasal değerlerinde ve kollajen içeriğinde düzeltme yapmadığı bildirilmiştir. Kolestazisin ilaçların emilimini azalttığını bu nedenle bu ilaçların parenteral verilmesinin daha uygun olacağını bildirmişlerdir (111). Soylu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada E ve C vitamini subkutan olarak verilmesine rağmen karaciğer enzimlerinde ve histolojik olarak nekroz ve inflamasyonda düzelme görmemişlerdir (75). Toksik madde ile oluşturulan karaciğer toksitesinde ise bu vitaminlerin lipid peroksidasyonu azalttığı saptanmıştır (112). Bizim sonuçlarımızda, ligasyon sonrası intraperitoneal uygulanan C vitamininin fibrozise olan etkilerinin NAC grubuna benzediği, ancak NAC+C vitamini uygulanan grupta ligasyon grubuna göre ışık mikroskopik olarak nekrotik alanların ve inflamasyonun daha az derecede olduğu gözlenmiştir.

Safra kanalı ligasyonu oluşturulan sıçanlarda portal alanda fibrozisin uyarıldığı, erken evrede safra kanal epitellerinin ve çevresindeki fibroblastların çoğaldığı, dört haftalık süre sonunda kollajen miktarının yaklaşık beş kat arttığı gösterilmiştir (107,113). Ligasyon sonrası tip I kollajen inhibitörü olan Halofuginon kullanılmış, ancak enzimlerin yükseldiği, safra kanal proliferasyonunun arttığı ve fibrozisin ağırlaştığı gözlenmiştir (100). CCL₄ ile oluşturulan karaciğer fibrozisinde, ACE inhibitörü olan losartan'ın iyileştirici etkileri görülürken, aynı ilacın ligasyona bağlı fibroziste olumlu etkisinin olmadığı aksine fibrozisi arttırdığı saptanmıştır (100,102). Buna benzer antifibrotik etkili başka bir madde de Metadoksin dir. Metadoksin, CCL₄ ile oluşturulan fibroziste olumlu etki oluştururken (114), ligasyona bağlı fibroziste etki göstermediği bildirilmiştir (115). Bu sonuçlar, karaciğer fibrozisinde uygulanan tedavinin fibrozis etiyolojisine bağlı olarak farklı cevaplar gösterebileceği, toksik hepatitte faydalı olan etken maddenin, ligasyonda fayda sağlayamadığını göstermektedir. Tedavideki farklı cevapların ortaya çıkmasında, CYP2E1 mikrozomal oksidasyon sisteminin, toksik maddelerin

aktivasyonunu önleyici etki göstermesine rağmen, ligasyonda etkin olmaması rol oynayabilir (115).

Asıl olarak immün baskılayıcı bir ilaç olan rapamisin antioksidan etkisi bulunmaktadır. Kültür ortamında akciğer fibroblastlarından tip I kollajen üretimini baskılayan rapamisin, MMP-1 üretimini arttırarak antifibrotik etki oluşturmaktadır (116). Rapamisin, ayrıca epitelyal hücrelerin mezenşimal hücrelere değişimini engellemekte ve mezotel hücrelerinden α -SMA açığa çıkışını azaltmaktadır (117). Neef ve arkadaşları 2006 yılında karaciğer fibrozisi oluşturmak için ligasyon modeli oluşturup düşük doz (0.5mg/kg/gün) rapamisin ile tedavi uygulamışlar ve karaciğer ağırlık yüzdelerinin ve ECM birikiminin ligasyon grubuna göre azaldığını saptamışlardır (118). Bu çalışmada ligasyon sonrası rapamisin ile tedavi edilen grupta portal alanlardaki proliferasyonun, nekrotik ve fibrotik alanların ligasyon grubu ve diğer tedavi gruplarına göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Biyokimyasal olarakta GGT, billirubin değerlerinin ligasyon ve tedavi grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düştüğü, glukoz düzeyinin ise anlamlı olarak arttığı görülmüştür. Karaciğerde enerjinin ana kaynağı olan glikojen, işlevlerin gerçekleştirilmesi için gereklidir ve karaciğer zedelenmelerini gösteren oldukça hassas ve güvenilir bir değerdir. Ligasyon sonucu karaciğer glikojen depolarının hızla tükendiği, glikojen sentezinin sitokinlerce etkilendiği, TNF- α artışının glukoz alınımlarını inhibe ettiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (47,115,119,120). Ligasyon oluşturulup E vitamini verilen karaciğer dokularında glikojen depolarının eski durumuna gelmediği gözlenmiştir (121). Bu çalışmada ligasyon grubundaki hepatositlerde PAS(+) boyanmanın belirgin olmadığı izlenmiştir. NAC uygulanan grupta PAS boyaması ligasyon grubuna benzemektedir. C vitamini, NAC+ C vitamini ve rapamisin ile tedavi edilen gruplarda portal alan çevresindeki hepatositlerin bir bölümünde PAS(+) boyanmanın belirgin olduğu ve boyanan hücre sayısının arttığı gözlenmiştir. PAS boyanma sonuçları glukoz artışı ile uyumluluk göstermekteydi. Glukoz düzeyinin en fazla arttığı rapamisin grubunda boyanmış hepatositlerin daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Fibrozisten sorumlu tutulan HSC'lerin tanımlanmasında desmin ve α -SMA immün boyamaları sıklıkla kullanılmaktadır. Safra kanalı tıkanıklığını takiben 7. güne kadar safra yolları epitel hücrelerinde ve kanallar çevresindeki fibroblastlarda

proliferasyonun arttığı ve fibroblastik hücrelerde α -SMA ve desmin boyanmasının artış gösterdiği görülmüştür (122).

CCL₄ ile oluşturulan karaciğer fibrozisinde, 4. haftada α -SMA ve desmin ile boyanan hücrelerin en üst seviyede olduğunu daha sonraki günlerde azaldığı saptanmıştır (54). Bu çalışmada ligasyon grubunda α -SMA immün boyanmanın proliferasyon olmuş safra kanalları çevresinde ve fibrotik bölgelerde oldukça belirgin olduğu, tedavi gruplarında α -SMA immün reaksiyonunun genel olarak ligasyon grubuna benzediği, boyanma yaygınlığının rapamisin grubunda daha az olduğu gözlenmiştir. Desmin immün reaksiyonu ise α -SMA boyanmasına benzemektedir, proliferasyon alanlarında, fibrotik alanların çevresinde uzamış yassı hücrelerde belirgindi. Tedavi gruplarında aynı özellikte boyalı hücreler varlığını korumaktaydı. Rapamisin uygulanan grupta desmin(+) boyanmış hücreler daha az olarak izlenmiştir. Bieker ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları bir ligasyon çalışmasında rapamisin uygulanan gruplarda desmin ve α -SMA immün boyanan hücrelerin sayısında anlamlı bir azalmanın olduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda safra kanal epitel hücrelerinde, bağ dokuda da azalma gözlemişlerdir (78). Genel olarak fibrotik alanların çevresinde desmin ve α -SMA immün boyalı hücrelerin artışı bu hücrelerin aktifleşmiş HSC ler olduğunu düşündürmektedir.

Hücre proliferasyon aktivitesi ile miyofibroblast benzeri hücrelerin sayısı arasında ters orantılı bir ilişkinin olduğu, α -SMA ekspresyonunun tüm ligasyon süresince devam ettiği, özellikle proliferasyonun ilk 3 gününde artış gösterdiği, 2-4. haftalarda azaldığı bildirilmektedir (123). Yapılan çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da mitotik aktivitenin artmış olduğu ligasyon grubunda α -SMA boyanmasının artmış olduğu gözlenmiştir.

β -katenin; kaderin aracılıklı hücre-hücre adezyon sisteminde düzenleyici olan yapısal bir protein olup dokuların onarımında olduğu gibi doku oluşum ve farklılaşmasında önemli rol oynar (124). Wnt/ β -katenin yolağı embriyolojik ve postnatal karaciğer gelişiminde, morfogeneziste, organogeneziste önemli rol oynar (85). Sıçanlarda safra epitel hücreleri doğumda immatür olup gelişimleri 5. haftaya kadar devam ederken, hepatositlerin gelişimi doğumdan sonraki 10 günde tamamlanır (125). Yapılan bir başka çalışmada karaciğer gelişimi esnasında portal alan etrafındaki ve kapsül yakınındaki hepatositlerde β -katenin ekspresyonu

görülmüştür (126). Karaciğer kanseri olan hastalarda β -katenin çekirdek ve sitoplazmada açığa çıkmaktadır. β -katenin hastalık patogenezisinde rol oynamaktadır (85,127). Normalde β -katenin hepatosit membranları ve safra kanal epitelini zayıf boyar(128).

Ligasyon yapılan bu çalışmada grupların karaciğer dokularında β -katenin immün boyanmasının genel olarak prolifer olmuştur safra kanal epitel sitoplazmalarında, epitel hücre sınırlarında, hepatosit sınırlarında olduğu görülmüştür. Gruplarda hücre çekirdeklerinde boyanmanın olmadığı saptanmıştır. Ligasyon yapılarak fibrozis oluşturulan gruplarda bu evrede malignitenin ortaya çıkmadığı görülmüştür.

Kolestazis modellerinde, biriken safra asid konsantrasyonu ile karaciğer zedelenmesi arasında doğrusal bir ilişki mevcuttur. Safra asitleri hepatik apoptozisi uyarmaktadır (30,129,). Fibrozisin en yüksek değerlere ulaştığı evrede parenkimal olmayan hücrelerde apoptozisin de pik yaptığı gözlenmiştir. Apoptozisin artırılması yolu ile fibrozisin azaltılabileceği öne sürülmüştür (54). Tıkanma sarılığı oluşturulan bir çalışmada ligasyona bağlı apoptozisin arttığı, bal tedavisi ile hepatositlerdeki apoptozisin azaldığı belirlenmiştir (129). Hücre proliferasyonunun morfolojik özelliklerini iyi bir şekilde gösteren, çekirdek proteini olan Ki-67 mitotik indeks ve tümörlerin sınıflandırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır (84). Dokulardaki apoptotik ve mitotik değerler genellikle birlikte değerlendirilmektedir.

Bu çalışma sonucunda kontrol grubunda Ki-67(+) ve TUNEL(+) boyanan hepatositler oldukça az sayıda gözlenmiştir. Ligasyon oluşturulan gruptaki hepatositlerde TUNEL (+) boyanma kontrole göre artmış gözlenirken, portal alanlardaki prolifer safra epitel hücrelerinde az sayıda TUNEL (+) boyanma izlenmiştir. En belirgin boyanma rapamisin uygulanan gruptaki hepatositler arasındaki HSC ve safra epitel hücrelerinde tespit edilmiştir. Rapamisin uygulanan grupta Ki-67 boyanan safra epitel hücre sayısının, ligasyon ve diğer tedavi gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Safra epitel hücrelerinde apoptozisin belirgin olduğu rapamisin grubunda, mitozun azalması rapamisinin etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

Işık mikroskopik olarak gözlenen safra kanalı proliferasyonu, ince yapı düzeyinde de izlenmiştir. Safra kanal epitelindeki yapının kontrol grubuna benzediği,

çekirdeklerin yuvarlak, sitoplazmalarında bol miktarda sitokeratin bulunduğu, az sayıda organel içerdiği görülmüştür. Epitel hücreleri desmozomlarla birbirine bağlı olup apikal yüzlerinde çok sayıda mikrovillus içerirler (123). Bizim çalışmamızda elde edilen elektron mikroskopik görüntülerde, prolifer olmuştur safra kanallarındaki epitel hücrelerin ökromatik, iri, hücre merkezine yerleşmiş, mikrovillüs içermektedir. Yarı ince kesitlerde epitel hücreleri arasında, bazalde, daha koyu boyanmış çekirdekli hücreler dikkati çekmektedir. Bu hücrelerin oval hücre olabileceği düşünülmüş, ancak immün boyama yapılamadığı için tam olarak ayırt edilememiştir. Yarı ince kesitlerde kanallar arası bağ dokuda artmış fibroblastlar ve inflamatuvar hücreler, mast hücreleri kolaylıkla ayırt edilmiştir. Hepatositlerde çok sayıda lipid damlacığı yer almaktaydı. İnce yapı düzeyinde, genişlemiş sinüzoidler içinde artmış Kupffer hücreleri, hepatositler arasında genişlemiş safra kanalikülleri saptanmıştır. Proliferasyon alanlarında miyofibroblast/fibroblast özelliğinde çok sayıda hücre bulunmaktaydı. Elektron yoğun sitoplazmalı, çeşitli şekillerdeki hepatositler, yapısı bozulmuş hepatositler, dikkati çekmektedir. Ligasyon ve tedavi gruplarında lipid damlacığı içeren klasik HSC hücreleri tespit edilememiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada safra kanal ligasyonuna bağlı ortaya çıkan tıkanma sarılığının, karaciğer dokusunda nekroz ve fibrozise yol açtığı gösterilmiştir. Tedavinin en önemli aşaması tıkanmanın ortadan kaldırılması olmakla beraber, bu sürecin en az hasar ile atlatılması için, bazı ilaçların antioksidanların ve vitaminlerin kullanılmasının faydalı olabileceği düşünülmektedir. Özellikle ortaya çıkan inflamasyon, parenkimal ve parenkimal olmayan hücreleri aktive ederek nekroz ve fibrozise gidişi tetiklemektedir. Oluşan serbest oksijen radikalleri hücresel bozulmayı hızlandırmakta, aktifleşen yıldızsı hücrelerden kollajen ve matriks üretimi artmaktadır. Karaciğer fibrozisinin engellenmesi veya azaltılması için bu gelişim basamaklarından birisine etkili olabilecek bir tedavi protokolü uygulanmalıdır. Deneysel oluşturulan bu modelde ortaya çıkan serbest oksijen radikallerine karşı NAC ve C vitamini kullanılmıştır. Tek başına NAC' ın veya C vitamininin fibrozisi engelleyici özelliği saptanmamıştır. NAC+C vitamini uygulanan grupta ise fibrozisin, ligasyon grubuna göre biraz daha hafıflediği ışık mikroskopik olarak tanımlanmıştır. Fibrozisin azaltılmasında en belirgin etki klinikte immunsupresif olarak kullanılan rapamisin ile tedavi edilen grupta elde edilmiştir. Bu grupta, fibrotik ve nekrotik alanların azaldığı, glikojen içeren hepatositlerin arttığı, safra kanal epitelinde proliferasyonun azaldığı ve apoptotik hücrelerin artmış olduğu tespit edilmiştir. Biyokimyasal olarak da rapamisinin, tıkanma sarılığında tanı koydurucu olan direk bilirubin ve GGT değerlerini anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır. Rapamisin, fibrozisi tam olarak engelleyemese de, tedavi sürecinde zaman kazanılması ve zedelenme derecesinin azaltılması yönünden tercih edilebilir. Farklı dozlarda ve sürelerde yapılacak çalışmaların, rapamisinin antifibrotik tedavide yaygın olarak kullanılabilmesi için daha detaylı bilgilerin elde edilmesini sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Eken H, Öztürk H, Öztürk H, Büyükbayram H. Dose-related effects of dexamethasone on liver damage due to bile duct ligation in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5379-83.
2. Wu J, Norton PA: Animal models of liver fibrosis. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31:1137-1143
3. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Robbins Temel Patoloji, Çeviri Editörü: Çevikbaş U, 7. baskı, İstanbul, Nobel, 2003;16: 596-599.
4. Pinzani M. Liver fibrosis. *Springer Semin, Immunopathol*, 1999; 21: 475-490.
5. Shimizu I, Ma YR, Mizobuchi Y, et all. Effects of sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. *Hepatology* 1999; 29:149-60.
6. Baroni GS, D'Ambrosio L, Curto P, et all. Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology*. 1996; 23: 1189-99.
7. Güler O, Aras A, Aydın M, Kisli E, Çıkman Ö. Biliyer obstrüksiyon nedenleri ve uygulanan tedaviler; 139 Olguluk Seri. *Van Tıp Dergisi* 2000; 7: 10-15,
8. Tahan G, Tarcin O, Tahan V, et. all. The effects of N-acetylcysteine on bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. *Dig Dis Sci*. 2007; 52: 3348-54.
9. Abraham L. Kierszenbaum. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Prof. Dr. Ramazan Demir (Çeviri Editörü) Palme, Ankara:, 2006; 17: 467.
10. Williams P, Warwick R, Dyson M, Bannister LH: *Gray's Anatomy*. 37th, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1992;1384-1396.
11. Drake RL,Vogl W, Mitchell AWM: *Gray's Anatomy for Student*. Yıldırım M (çeviri editörü), Ankara: Güneş Kitapevi, 2007; 4: 285-306.
12. Süzen LB. İnsan Anatomisine Giriş, AkademiYayın 2006, 314-319.
13. Cumhuriyet M. Temel Anatomi, Ankara: ODTÜ Yayıncılık-METU basım, 2001; 241-247.
14. Yıldırım M. Topografik Anatomi, baskı, İstanbul: Nobel, 2000; 5:251-255.
15. Moore KL, Agur AMR. Temel Klinik Anatomi, Elban A (çeviri editörü), 2. Baskı, Ankara: Güneş, 2006; 3:168-180.
16. Guyton AJ, Fizyoloji, Çeviri Türk Fizyolojik Bilimler Derneği. 5. Baskı, Ankara: Güneş, 2008; 428-9, 585-594.
17. Ganong WF, Tıbbi Fizyoloji, Çeviri Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, 20.baskı, İstanbul: Nobel, 2002; 26: 483-489.
18. Sancak B, Cumhuriyet M, Fonksiyonel Anatomi; Ankara: METU basım, 1999: 253-262.
19. Çimen A, Anatomi, Bursa: Uludağ Üniversitesi basım evi 1997; 365-375.
20. Guyton, Hall, Tıbbi Fizyoloji, Çavuşoğlu H (Çeviri editörü), 10. baskı, İstanbul: Nobel, 2001; 724, 749-752.
21. Şentürk H. Serbest Radikal Hasarının Hepato-Biliyer Sistem Hastalıklarındaki Rolü *Kocatepe Tıp Dergisi* 2004; 5: 1-8.
22. Bayramiçli M, Deneysel Mikrocerrahi, 1. baskı, İstanbul: ARGOS, 2005; 6: 687.

23. Tekelioğlu M. Özel Histoloji, İnce Yapı ve Gelişme. Ankara, Antıp A.Ş. 2002; 79-86.
24. Junqueira LC, Carneiro J, RO Kelley, Temel Histoloji, Aytekin Y (Çeviri editörü), Barış Kitapevi 1998; 16: 307-322.
25. D Erdoğan, M Görgün, MT Hatipoğlu, C Ilgaz, Özel Histoloji, Hatiboğlu yayımları, 2. baskı, 2007; 4: 94-102.
26. Moore, İnsan Embriyolojisi, Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H (Çeviri Editörleri), 6. Baskı, İstanbul: Nobel, 2002; 12: 277-280.
27. Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji. Başaklar AC (Çeviri editörü), 9. Baskı, Ankara: PALME, 2005; 13: 292-295.
28. Balistreri WF, Grand R, Hoofnagle JH et all. Biliary atresia: current concepts and research directions. Summary of a symposium. Hepatology 1996; 23: 1682-92.
29. Chardot C. Biliary atresia. Orphanet J Rare Dis 2006; 1: 28.
30. Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, et all. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. Hepatology. 2001; 33: 616-626.
31. Montilla P, Cruz A, Padillo FJ, Tunez I, Gasson F. Melatonin versus vitamin E as protective treatment against oxidative stress after extra-hepatic bile duct ligation in rats. J Pineal Res 2001; 31: 138-144.
32. Gürel A, Armutçu F, Söğüt S, Cihan A. Koledok kanalı tıkanıklığı yapılan ratlarda L-Arginin ve N-Nitro- L- Arjinin metil ester tedavisinin karaciğer dokusu lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzimler üzerine etkisi. O.M.Ü Tıp Dergisi, 2003; 20: 186-192.
33. Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 2005; 3: 30-39.
34. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. Mayo Clin Proc. 1988; 63: 381-389.
35. Kurtuluş H, Eskiocak S, Tütüncüler F, Başaran ÜN, Gülen Ş. Deneysel sistemik hipoksi geliştirilmiş yenidoğan ratlarda n-asetilsistein uygulamasının etkileri. Türk Biyokimya Dergisi [Turk J Biochem] 2003; 28 ; 40-44.
36. Uysal M. Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar Klinik Gelişim 1998; 11: 336-341.
37. Doğru-Abbasoğlu S, Balkan J, Kanbağlı Ö, ve ark. Aminoguanidin ve N-Asetilsisteinin endotoksemik sirozlu sıçanlarda karaciğer hasarı, oksidatif ve nitrozatif stres üzerine etkisi. Kocatepe Tıp Dergisi 2004; 5, 27-32.
38. Kurt H, Başaran A, Musmul A. Sıçanlarda karbon tetraklorit'in oluşturduğu oksidatif stresin katışın ile önlenmesi. Kocatepe Tıp Dergisi 2004; 5: 29- 34.
39. Aydoğdu N, Kaymak K, Yalçın Ö: Sıçanlarda böbrek iskemi/reperfüzyon hasarında N-asetilsisteinin etkileri ırat tıp dergisi 2005; 10; 151-155.
40. Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A: Mitochondria in steatohepatitis. Semin Liver Dis, 2001; 21: 57-69.

41. Bataller R, Brenner AD. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218.
42. Şahin Tahan G, N-asetilsisteinin deneysel koledok ligasyonu modelinde oksidatif stres ve karaciğer fibrozu üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi İstanbul: Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi. 2.Genel Cerrahi Şefliği 2005.
43. Gönül R, Meral Y, Kayar A ve ark. Deneysel olarak safra kanalı ligasyonu oluşturulan köpeklerde karaciğer hasarı ve safra yolu tıkanıklıklarının ultrasonografik olarak değerlendirilmesi *Türk J Vet Anim Sci* 2002; 26: 1459-1464.
44. Burt AD, Portmann BC, Ferrell LD. Macswen's pathology of the liver. fifth Edition Churchill Livingstone Elsevier, 2007; 11: 517-581.
45. Morita Y, Yoshidome H, Kimura F et all. Excessive Inflammation but decreased immunological response renders liver susceptible to infection in bile duct ligated mice. *J Surg Res.* 2008;146; 262-70.
46. Sprangers F, Sauerwein HP, Romijn JA et all. Nitric oxide inhibits glycogen synthesis in isolated rat hepatocytes. *Biochem J.* 1998; 330: 1045-9.
47. Fernández-Martínez E, Pérez-Álvarez V, Tsutsumi V et all. Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokines and nitric oxide in the rat. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2006; 58: 49-58.
48. Pinzani M, Gesualdo L, Sabbah GM and Abboud HE. Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. *J Clin Invest* 1989; 84: 1786-1793.
49. Pines M, Knopov V, Genina O, Lavelin I, Nagler A. Halofuginone, a specific inhibitor of collagen type I synthesis, prevents dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 27: 391-398.
50. Cumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic Basic of Disease; 7. edition. Elsevier, Philadelphia, 2005; 18: 877-938.
51. Alcolado R, Arthur MJP, Iredale JP. Pathogenesis liver fibrosis. *Clin Sci* 1997; 92:103-112.
52. Albanis E, Friedman SL. Antifibrotic agents for liver disease. *Am J Transplant.* 2006; 6: 12-9.
53. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci.* 2002; 7: 793-807.
54. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J et all. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 102: 538-49.
55. Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Graham D et all. Surgical Implantation Of Adipose Tissue Reverses Diabetes In Lipoatrophic Mice. *J Clin Invest* 2000; 105: 271-8.
56. Miyahara T, Schrum L, Rippe R, et all. Peroxisome Proliferator-activated Receptors and Hepatic Stellate Cell Activation. *The Journal of Biological Chemistry* 2000: 35715-35722.
57. Galli A, Crab D, Ceni E et all. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and HSC activation in vivo and in vitro. *Gastroenterology* 2002; 122: 1924-1940.
58. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141-179.

59. Ceppi ED, Smith FS, Titheradge MA. Effect of multiple cytokines plus bacterial endotoxin on glucose and nitric oxide production by cultured hepatocytes. *Biochem J* 1996; 317: 503–507.
60. Meyer A, Buhul R, Kampf S, Magnussen H. Intravenous N-acetylcysteine and lung glutathione of patients with pulmonary fibrosis and normal. *Am J Resp Crit Care Med* 1995; 152: 1055-1060.
61. Moldeus P, Cotgreave IA. N-acetylcysteine, *Methods Enzymol* 1994; 234: 482–492.
62. Nakano H, Boudjema K, Jaeck D et al. Amelioration of hepatocellular integrity and inhibition of sinusoidal oxidative stress by N-acetylcysteine pretreatment in cold ischemia reperfusion injury of rats liver. *Eur Surg Res* 1996; 25: 245-255.
63. Gurer H, Ozunes, Neal R, Spitz DR, Ercal N, Antioxidants effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead exposed rats. *Toxicology* 1998; 120: 181–189.
64. Duran A, Kafalı ME, Şahin M, Köylü Ö ve ark. Tavşanlarda oluşturulan deneysel sepsis modelinde düşük doz NAC tedavisinin etkinliği. *Selçuk Tıp Dergisi* 2004; 20: 140-149.
65. Vendemiale G, Grattagliano I, Caruso ML, Serviddio G, Valentini AM, Pirrelli M, Altomare E. Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat. Effect of N-acetylcysteine and interferon-alpha. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;175:130-9.
66. Moldeus P, Cotgreave IA, Berggren M. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. *Respiration* 1986; 50: 31-42.
67. Stamler J, Mendelsohn ME, Amerante P et al. N-acetylcysteine potentials platelet inhibition by endothelium-derived relaxing factor. *Circ Res* 1989; 65: 789-795.
68. Jones AL. Mechanism of action and value of Nacetylcysteine in the treatment of early and late acetaminophen poisoning: a critical review. *J Toxicol Clin Toxicol* 1998; 36: 277–285.
69. Köksel O, Tamer L, Özdülger A ve ark. Oleik asit ile oluşturulan akut akciğer hasarında görülen nitrik oksit metabolitlerinin artışı üzerine n-asetilsistein'in etkisi. *T Klin J Med Sci* 2004; 14: 323-327.
70. Tran A, Tréluyer JM, Rey E et al. Protective effect of stiripentol on acetaminophen-Induced hepatotoxicity in rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2001; 170: 145-152.
71. Dargan PI, ones AL. Management of paracetamol poisoning. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 154-7.
72. Özbek H, Tuncer İ, Dülger H ve ark. E Vitamini, n-asetil sistein, penisilin-G ve *Urtica dioica* 'nin phalloidin toksisitesi üzerine etkisi. *Van Tıp Dergisi* 2005; 12: 16-21.
73. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *2003; 60: 6-20.*
74. Harapanhalli RS, Yaghmai V, Giuliani D, Howell RW, Rao DV. Antioxidant effects of vitamin C in mice following X-irradiation. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1996; 94: 271-287.
75. Soylu AR, Aydogdu N, Basaran UN, et al. Antioxidants vitamin E and C attenuate hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats. *World J Gastroenterol.* 2006; 12: 6835-41.
76. Kayaalp O, Tıbbi Farmakoloji 11.baskı, Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık, 2005;92: 1323
77. Pozzetto U, Citterio F, Romagnoli J et al. Effects of immunosuppressive regimens on plasma level of Transforming Growth Factor- β 1 in renal transplant recipients; *Elenco degli Articoli JCR*; 2002; 34: 1740-1742.

78. Bieker E, Gottardi AD, Neef M et al. Long-term treatment of bile duct-ligated rats with rapamycin (Sirolimus) significantly attenuates liver fibrosis: Analysis of the underlying mechanisms, JPET 2005; 313: 952-961.
79. Mathis AS, Jin S, Friedman GS et al. The pharmacodynamic effects of sirolimus and sirolimus-calcineurin inhibitor combinations on macrophage scavenger and nuclear hormone receptors. J Pharm Sci 2007; 96: 209-22.
80. Wahl PR, Serra AL, Le Hir M et al. Inhibition of mTOR with sirolimus slows disease progression in Han: SPRD rats with autosomal dominant polycystic kidney disease . Nephrol Dial Transplant 2006; 21: 598-604.
81. Kasukabe T, Okabe-Kado J, Kato N, Sassa T, Honma Y. Effects of combined treatment with rapamycin and cotylenin A, a novel differentiation- inducing agent, on human breast carcinoma MCF-7 cells and xenografts; Breast Cancer Res. 2005; 7: 1097-1110.
82. Criado M, Flores O, Ortíz MC et al. Elevated glomerular and blood mononuclear lymphocyte nitric oxide production in rats with chronic bile duct ligation: role of inducible nitric oxide synthase activation. Hepatology. 1997; 26: 268-276.
83. Arıcı S, Kıvanç F, Özer H, Eğilmez R, Elagöz Ş. Mide adenokarsinomlarında CD44 ve Ki67 ekspresyonu. Türk Patoloji dergisi 2006; 22: 26-31.
84. Tosun M, Tosun E, Avunduk MC. Hücre çoğalma belirleyicilerinin önemi ve kullanım alanları. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 2001; 3: 235-244
85. Apte U, Zeng G, Thompson MD et al. Beta-Catenin is critical for early postnatal liver growth. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007; 292: 1578-85.
86. Li CH, Pan LH, Yang ZW, Li CY, Xu WX. Preventive effect of Qianggan-Rongxian Decoction on rat liver fibrosis. World J Gastroenterol 2008; 14: 3569-73.
87. Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? Gut 2000; 46: 443-446.
88. Popper H, Uenfriend S. Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigations. Am J Med 1970; 49: 707-721.
89. Schaffner F, Klion FM. Chronic hepatitis. Annu Rev Med 1968;19: 25-38.
90. Friedman SL. Liver fibrosis-from bench to bedside. J Hepatol 2003; 38:38-53.
91. Lesage G, Glaser S, Alpini G. Regulation of cholangiocyte proliferation. Liver 2001; 21:73-80.
92. Vázquez-Gil MJ, Mesonero MJ, Flores O et al. Sequential changes in redox status and nitric oxide synthases expression in the liver after bile duct ligation. Life Sci 2004; 75: 717-32.
93. Mwanza T, Miyamoto T, Okumuro M., Kadosawa T, Fujinaga T Ultrasonographic evaluation of portal vein hemodynamics in experimentally bile duct ligated dogs. Jpn J Vet Res 1998; 45:199-206
94. Saito JM, Maher JJ. Bile duct ligation in rats induces biliary expression of cytokine induced neutrophil chemoattractant. Gastroenterology 2000; 118: 1157- 1168
95. Zakim D, Boyer T, Hepatology a text book of liver disease. Fourth Ed. Elsevier science, 2003;13: 407

96. Gedik N, Kabasakal L, Sehirli O, et al. Long-term administration of aqueous garlic extract alleviates liver fibrosis and oxidative damage induced by biliary obstruction in rats. *Life Sci* 2005; 76: 2593-606.
97. Tasci I, Mas MR, Vural SA et al. Rat liver fibrosis regresses better with pegylated interferon alpha2b and ursodeoxycholic acid treatments than spontaneous recovery. *Liver Int* 2006; 26: 261–268
98. Muriel P. Alpha-interferon prevents liver collagen deposition and damage induced by prolonged bile duct obstruction in the rat. *J Hepatol* 1996; 24: 614-21.
99. Ryhanen L, Stenback F, Ala-Kokko L, Savolainen ER. The effect of malotilate on type III and type IV collagen, laminin and fibronectin metabolism in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat. *J Hepatol*. 1996; 24: 238-245.
100. Van de Casteele M, Roskams T, Van der Elst I et al. Halofuginone can worsen liver fibrosis in bile duct obstructed rats. *Liver Int* 2004; 24: 502.
101. Park DH, Baik SK, Choi YH, Kim MY et al. Inhibitory effect of angiotensin blockade on hepatic fibrosis in common bile duct-ligated rats. *Korean J Hepatol* 2007; 13: 61-69.
102. Croquet V, Moal F, Veal N, et al. Hemodynamic and antifibrotic effects of losartan in rats with liver fibrosis and/or portal hypertension. *J Hepatol* 2002; 37: 773-80.
103. Castro V, Muriel P. Comparative study of colchicine and trimethylcolchicinic acid on prolonged bile duct obstruction in the rat. *J Appl Toxicol* 1996; 16: 269– 75
104. Muriel P, Moreno MG. Effects of silymarin and vitamins E and C on liver damage induced by prolonged biliary obstruction in the rat. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 94: 99-104.
105. Ara C, Kirimlioglu H, Karabulut AB, et al. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in cholestasis. *J Surg Res*. 2005; 127: 112-117.
106. Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and n-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology* 1998; 27: 1265–1274.
107. Krähenbühl S, Talos C, Lauterburg BH, Reichen J. Reduced antioxidative capacity in liver mitochondria from bile duct ligated rats. *Hepatology* 1995; 22: 607–612.
108. Svegilati Baroni G, D'Ambrosio L, Ferretti G et al. Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1998; 27: 720-726.
109. Muriel P, Suárez OR. Role of lipid peroxidation on biliary obstruction in the rat. *J Appl Toxicol* 1994; 14: 423–426.
110. Barón V, Muriel P. Role of glutathione, lipid peroxidation and antioxidants on acute bile-duct obstruction in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1472: 173–80.
111. Muriel P, Moreno MG. Effects of silymarin and vitamins E and C on liver damage induced by prolonged biliary obstruction in the rat. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 94: 99-104.
112. Altuntas I, Delibas N, Demirci M, Kilinc I, Tamer N. The effects of methidathion on lipid peroxidation and some liver enzymes: role of vitamins E and C. *Arch Toxicol* 2002; 76: 470-473.
113. Aronson CD, De Haan J, James J, 1988. Quantitative aspects of the parenchymal-stroma relationship in experimentally induced cholestasis. *Liver* 1988; 8: 116–126.

114. Annoni G, Contu L, Tronci MA, Caputo A, Arosio B. Pyridoxol L,2-pyrrolidon-5 carboxylate prevents active fibroplasia in CCl₄-treated rats. *Pharmacol Res* 1992; 25: 87– 93.
115. Muriel P, Deheza R. Fibrosis and glycogen stores depletion induced by prolonged biliary obstruction in the rat are ameliorated by metadoxine. *Liver Int* 2003; 23 :262-8.
116. Poulalhon N, Farge D, Roos N, et all. Modulation of collagen and MMP-1 gene expression in fibroblasts by the immunosuppressive drug rapamycin. A direct role as an antifibrotic agent? *J Biol Chem* 2006; 281: 33045-52.
117. Aguilera A, Aroeira LS, Ramirez-Huesca M et all. Effects of rapamycin on the epithelial-to-mesenchymal transition of human peritoneal mesothelial cells. *Int J Artif Organs* 2005; 28:164-169.
118. Neef M, Ledermann M, Saegesser H, Schneider V, Reichen J. Low-dose oral rapamycin treatment reduces fibrogenesis, improves liver function, and prolongs survival in rats with established liver cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2006; 45: 786-796.
119. Hube F, Hauner H. The two tumor necrosis factor receptors mediate opposite effects on differentiation and glucose metabolism in human adipocytes in primary culture. *Endocrinology* 2000; 141: 2582–2588.
120. Padillo FJ, Cruz A, Segura-Jiménez I, et all. Anti-TNF-alpha treatment and bile duct drainage restore cellular immunity and prevent tissue injury in experimental obstructive jaundice. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007; 20: 855-860.
121. Barón V, Muriel P. Role of glutathione, lipid peroxidation and antioxidants on acute bile-duct obstruction in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1472: 173-180.
122. Tuchweber B, Desmoulière A, Bochaton-Piallat ML et all. Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest.* 1996; 74: 265-78.
123. Yoshioka K, Mori A, Taniguchi K, Mutoh K. Cell proliferation activity of proliferating bile duct after bile duct ligation in rats. *American College of Veterinary Pathologists* 2005; 42: 382-385
124. Tien LT, Ito M, Nakao M et all. Expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;11: 2398 - 401.
125. Satake M, Shimano K, Yamamoto T et all. Role of c-kit receptor tyrosine kinase-mediated signal transduction in proliferation of bile epithelial cells in young rats after ligation of bile duct: a study using Ws/Ws c-kit mutant rats. *J Hepatol* 2003; 39: 86-92
126. Loo CK, Wu XJ. Origin of stellate cells from submesothelial cells in a developing human liver. *Liver Int* 2008.
127. Suzuki T, Yano H, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M. Beta-catenin expression in hepatocellular carcinoma: a possible participation of beta-catenin in the dedifferentiation process. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17: 994 - 1000.
128. T Terada, K Ashida, Y Kitamura et all. Expression of epithelial-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin during human intrahepatic bile duct development: a possible role in bile duct morphogenesis. *Journal of Hepatology* 1998; 28: 263–269.

129. Kilicoglu B, Gencay C, Kismet K, Serin Kilicoglu S et. all. The ultrastructural research of liver in experimental obstructive jaundice and effect of honey. Am J Surg 2008;195: 249-56.