



**KRONİK KARACİĞER FİBROZUNDA SİSTEMİK İMMÜN YANITIN
YÖNLENDİRİLMESİ**

Esra CANPOLAT

**Genel Cerrahi Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Tez Danışmanı
Prof. Dr. Başak KAYHAN**

Malatya 2019

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
KARACİĞER NAKLİ ENSTİTÜSÜ

KRONİK KARACİĞER FİBROZUNDA SİSTEMİK İMMÜN YANITIN
YÖNLENDİRİLMESİ

Esra CANPOLAT
Genel Cerrahi Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Tez Danışmanı
Prof. Dr. Başak KAYHAN

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından
2016/137 proje numarası ile desteklenmiştir.

Malatya
2019

KABUL ve ONAY SAYFASI



İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğer.....	3
2.1.1. Karaciğerin Fonksiyonları	4
2.1.2. Hepatositler.....	5
2.1.3. Hepatik Stellat Hücreler.....	5
2.1.4. Sinüzoidal Endotel Hücreler	6
2.1.5. Kupffer Hücreleri.....	6
2.2. Karaciğer Fibrozisi	7
2.2.1. Karaciğer Fibrozunun Patogenezi.....	7
2.2.2. Karaciğer Fibrozu ve Hepatik Stellat Hücreler.....	8
2.2.3. Hepatik Stellat Hücrelerin İmmünregulator Rollerı	9
2.3. Karaciğerde İmmün Yanıt	9
2.4. Karaciğer Fibrozu ve İmmün Yanıt	10
2.5. Aşı ve Aşı Tipleri.....	12
2.5.1. Aşılamaya Sonrası Gelişen İmmün Yanıt	14
2.5.2. Aşılamayın Yetersiz Olduğu Durumlar	14
2.6. Karaciğer Fibrozunda İmmünizasyonun Etkinliğı.....	15
2.7. Karaciğer Fibrozunda Kullanılan Deney Hayvan Modelleri	17
3. MATERYAL VE METOD.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Kullanılan Deney Hayvanları	20
3.1.2. Kullanılan Deney Araç-Gereçleri	20
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	21
3.2. Metot.....	21
3.2.1. Deney Gruplarının Belirlenmesi.....	21

3.2.2. Ağırlık Ölçümleri.....	22
3.2.3. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması	22
3.2.4. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümleri	22
3.2.5. Histopatolojik Analiz Yöntemleri.....	22
3.2.6. İmmünolojik Analiz Yöntemleri.....	23
3.2.6.1. Kemilüminesan Mikropartikül İmmünolojik Tetkik Yöntemi ile Anti- HBs Ölçümü.....	23
3.3. İstatiksel Analiz	24
4. BULGULAR.....	25
4.1. Karaciğerin Makroskopik Bulguları	25
4.2. Deneklerin Canlı Ağırlığı ve Karaciğer Ağırlığı Bulguları	25
4.3. Histopatolojik Bulgular.....	26
4.4. Biyokimyasal Bulgular	35
4.5. İmmünolojik Bulgular.....	39
5. TARTIŞMA	41
SONUÇ VE ÖNERİ	45
KAYNAKLAR	46
EKLER.....	56
EK 1. ÖZGEÇMİŞ.....	56
EK 2. DENEY HYAVANLARI ETİK KURUL İZNİ.....	57

TEŞEKKÜR

Mevcut tez çalışmasının yürütülmesi için, 2016/137 numaralı projeye sağladığı maddi destekten dolayı İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.



ÖZET

Kronik Karaciğer Fibrozunda Sistemik İmmün Yanıtın Yönlendirilmesi

Amaç: Mevcut çalışmanın amacı deneysel kronik karaciğer fibrozu oluşturulan deneklerde immünizasyon sonrası oluşan zayıf özgül antikor yanıtının, tetanoz toksoidi ile immün stimülasyon sonucu arttırılabilmesinin araştırılmasıdır.

Materyal ve Metod: Tiyoasetamid (TAA) ile uyarılarak karaciğer fibroz modeli oluşturulmuş BALB/c türü deney farelerine Engerix™ hepatit B aşısı ve Tetavax tetanoz toksoidi intramüsküler yoldan verilmiştir. Gruplara ait deneklerin serum örneklerinde karaciğer enzim düzeyleri ve Anti-HBs düzeylerinin ölçümleri, karaciğer doku örneklerinde ise histopatolojik değerlendirmeler gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Mevcut çalışmada TAA ile oluşturulan karaciğer fibrozunda karaciğer fonksiyon enzimlerinden AST, ALT, AP enzimlerine ait serum konsantrasyonlarında belirgin düzeyde artış görülmüştür. TAA + Hepatit B aşısı grubunda serum AST, AP düzeyindeki azalma anlamsız, ALT düzeyindeki azalma anlamlı bulunmuştur. Deneklerin canlı vücut ağırlığı / karaciğer ağırlığı oranında kontrol grubu ile Hepatit B aşısı grubu arasında anlamlı farklılık görülmezken; TAA, TAA + Hepatit B aşısı, TAA + Hepatit B aşısı + Tetavax tetanoz toksoid gruplarında bu oranda görülen belirgin azalma saptanmıştır. Çalışmada fibroz oluşturulan deneklere uygulanan hepatit B aşısı sonrası ölçülen Anti-HBs düzeyi sadece hepatit B aşısı uygulanan deneklere göre belirgin düzeyde düşük saptanmıştır. TAA + Hepatit B aşısı + Tetanoz toksoidi uygulanan grupta ise TAA + Hepatit B aşısı grubuna göre Anti-HBs düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir.

Sonuç: Kronik karaciğer fibrozunda immünizasyon sonrası zayıf özgül antikor yanıtı oluşmakta ve bu yanıt bir immün stimülatör olan tetanoz toksoidi kullanılarak arttırılabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer Fibrozu, İmmün yanıt, Tetanoz toksoidi, Anti-HBs.

ABSTRACT

Management Of Systemic Immune Response In Chronic Liver Fibrosis

Aim: The aim of the study is to investigate the ability of the subjects with experimental chronic liver fibrosis to develop a weak specific antibody response after immunization as a result of immune stimulation with tetanus toxoid.

Materials and Methods: The subjects with BALB / c type of hepatocytes were injected with TAA and the Engerix™ hepatitis B vaccine and Tetavax tetanus toxoid were administered intramuscularly. Liver enzyme levels and anti-HBs levels were measured in the serum samples of the subjects and histopathological evaluations were made in liver tissue samples.

Results: In the study, serum concentrations of AST, ALT and AP enzymes were significantly increased in liver fibrosis induced by TAA. In the TAA + Hepatitis B vaccine group, the decrease in serum AST, AP level was insignificant and the decrease in ALT level was found to be significant. There was no significant difference between the control group and the hepatitis B vaccine group in terms of body weight / liver weight. The significant decrease in TAA, TAA + Hepatitis B vaccine, TAA + Hepatitis B vaccine + Tetavax tetanus toxoid groups was found to be statistically significant. When the anti-HBs levels of the control group and the hepatitis B vaccine group were compared, a significant increase was detected in the hepatitis B vaccine group. In the study, the level of Anti-HBs measured after hepatitis B vaccine was significantly lower in subjects with fibrosis than the subjects who received hepatitis B vaccine. In TAA + Hepatitis B vaccine + Tetavax tetanus toxoid group, there was a statistically significant increase in Anti-HBs level according to TAA + Hepatitis B vaccine group.

Conclusion: In chronic liver fibrosis, it produces a weak specific antibody response after immunization and this response can be increased by using an immunostimulator, tetanus toxoid.

Key Words: Liver Fibrosis, Immune response, Tetanus toxoid, Anti HBs

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Anti-HBs	: Hepatit B Yüzey Antikoru
AP	: Alkalen Fosfataz
ALT	: Alanin Amino Transferaz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
CCl ₄	: Karbon Tetraklorür
CCR	: Kemokin Reseptörü
CD	: Farklılaşma Kümesi
CRP	: C-reaktif protein
EIA	: Enzim İmmünoassay
ESM	: Ekstrasellüler Matriks
H&E	: Hematoksilen-Eozin
HBV	: Hepatit B Virüsü
HCC	: Hepatosellüler Karsinom
HNP	: Human Nötrofil Peptid
HSH	: Hepatik Stellat Hücre
IFN	: Interferon
Ig	: İmmüoglobülin
IL	: İnterlökin
i.p.	: İntraperitoneal
LPS	: Lipopolisakkarit
LSEC	: Karaciğer Sinüzoidal Endotel Hücre
M-CSF	: Makrofaj Koloni Stimüle Eden Faktör
MAPK	: Mitojen Aktive Eden Protein Kinaz
MCP-1	: Monosit Kemotaktik Protein-1
MMP	: Matriks Metalloproteinaz

NADPH	: Nikotiamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NAFLD	: Alkolik Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı
NK	: Doğal Öldürücü
PAS	: Periyodik Asit Schiff
PBS	: Phosphate-Buffered Saline
PDGF	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PRR	: Kalıp Tanıma Reseptörü
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
TAA	: Tiyoasetamid
TCR	: T hücre Reseptörü
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TGF	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
TIMP	: Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri
TLR	: Toll Benzeri Reseptör

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Grupların canlı vücut ağırlığı / karaciğer ağırlığı oranının karşılaştırmaları	26
Şekil 4.2. Gruplara göre inflamasyon parametresinin histopatolojik karşılaştırmaları	28
Şekil 4.3. Gruplara göre erezyon nekroz parametresinin histopatolojik karşılaştırmaları	29
Şekil 4.4. Gruplara göre intralobular dejenerasyon ve fokal nekroz parametresinin histopatolojik karşılaştırmaları	30
Şekil 4.5. Gruplara göre fibroz parametresinin histopatolojik karşılaştırmaları	31
Şekil 4.6. Grupların histopatolojik karşılaştırmaları	32
Şekil 4.7. Karaciğer dokusunda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fibrotik bağ doku oluşumunun H&E boyama ile elde edilen histolojik görüntüleri.....	33
Şekil 4.8. Karaciğer dokusunda trikrom ve PAS boyama analizleri..	34
Şekil 4.9. Gruplara göre serum AST ölçümlerinin karşılaştırmaları	36
Şekil 4.10. Gruplara göre serum ALT ölçümlerinin karşılaştırmaları.....	37
Şekil 4.11. Gruplara göre serum AP ölçümlerinin karşılaştırmaları	38
Şekil 4.12. Gruplara göre Anti-HBs ölçümlerinin karşılaştırmaları.....	40

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Deneyde kullanılan cihazlar.....	20
Tablo 4.1. Kontrol grubu, Hepatit B aşısı grubu, TAA grubu, TAA + Hepatit B aşısı grubu, TAA + Hepatit B aşısı + Tetanoz Toksoid Aşısı gruplarında yer alan farelerin canlı vücut ağırlığı / karaciğer ağırlığı bulguları.....	26
Tablo 4.2. Kontrol grubu, Hepatit B aşısı grubu, TAA grubu, TAA + Hepatit B aşısı grubu, TAA + Hepatit B aşısı + Tetanoz Toksoid Aşısı gruplarında yer alan örneklerle ait karaciğer dokularının histopatolojik değerlendirmeleri.....	28
Tablo 4.3. Kontrol grubu, Hepatit B aşısı grubu, TAA grubu, TAA + Hepatit B aşısı grubu, TAA + Hepatit B aşısı + Tetanoz Toksoid Aşısı gruplarında yer alan örneklerle ait biyokimyasal bulgular	35
Tablo 4.4. Kontrol grubu, Hepatit B aşısı grubu, TAA grubu, TAA + Hepatit B aşısı grubu, TAA + Hepatit B aşısı + Tetanoz Toksoid Aşısı gruplarında yer alan örneklerle ait immünolojik bulgular	39

1. GİRİŞ

Karaciğer fibrozu son yıllarda yaygın olarak görülen yüksek morbidite ve mortaliteye sahip önemli bir sağlık sorunudur (1). Karaciğer fibrozisi, küçük klinik semptomlara veya karaciğer hücre fonksiyonunun bozulmasına neden olan yeni lif oluşumundan kaynaklanan fazla kollajenin varlığı olarak tanımlanır (2). Karaciğer fibrozunun ana nedenleri arasında kronik hepatit C enfeksiyonu, alkol, alkolsüz steatohepatit ve viral hepatit (hepatit B ve C) yer almaktadır (3).

Karaciğer fibrozunda tedavi stratejileri patogenezin çok yönlülüğünü göz önünde bulundurmalı ve iltihaplanma ile başlayan tüm basamaklara karşı hareket edilmelidir. Karaciğer fibrozu için standart bir tedavi bulunmamakla birlikte, alkol alımının kesilmesi veya viral hepatit tedavisinin başarıyla uygulanması gibi karaciğer hasarı olaylarının azaltılmasının sürecin kontrolüne katkıda bulunduğu bilinmektedir (4). Genel olarak, tedavi iki kategoriye ayrılır; hepatit B ve C ilişkili karaciğer hastalığında virüsün yok edilmesi ve karaciğer transplantasyonudur (3).

Karaciğer fetal dönemde hematopoiezde etkin rol alan ve lenfoid organ olarak kabul edilmese de, erişkin dönemde rol alacak olan immün sistem hücrelerinin fetal dönemde üretiminden sorumludur (5, 6). Erişkin dönemde karaciğer hematopoietik özelliğini kaybeder ancak immün sistem üzerinde etkinliği günümüzde hala cevabı aranmakta olan bir sorudur.

Vücudumuzda farklı organlarda meydana gelen hastalıklar immün sistemin uyarımı ve işleyişi üzerinde olumsuz etkilere yol açabilmektedir. Bu konuda kronik böbrek yetmezliği olan hastaların immünizasyonu sonucu gelişen aşı yanıtında yaşanan sıkıntılar örnek olarak verilebilir. Bu sorunu çözebilmek ve hastada aşıya karşı yeterli düzeyde immün yanıt oluşturabilmek için ya hastalara hepatit B aşısı ile tetanoz toksoidi verilmektedir ya da aşılama yolu değiştirilerek enjeksiyon yapılmaktadır (7). Benzer sorunla viral kaynaklı ve viral kaynaklı olmayan karaciğer rahatsızlıklarında da karşılaşılmaktadır (8). Bu sorunun kaynağı viral kaynaklı olmayan karaciğer hastalıklarında araştırılmamış ve herhangi bir model üzerinde bu konuda çalışma yapılmamıştır.

Bu nedenle mevcut tez çalışmasında, deneysel kronik karaciğer fibroz modeli kullanarak, karaciğer fibrozu oluşturulmuş farklı gruplardaki deney farelerine hepatit B

aşısı uygulaması yapılarak, bu aşılanmanın kontrol grubuna göre ne derece özgül immün yanıt oluşturduğu ve immünizasyon sonrası gelişen humoral immün yanıt düzeyindeki değişimlerin neler olduğunun araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer

Karaciğer vücudumuzdaki en büyük parankimatöz organdır (9). Normal erişkin bir bireyde yaklaşık ağırlığı 1200–1500 gram kadardır, bu da toplam vücut ağırlığının %2'sini karşılamaktadır (10, 11). Karaciğer sağ ve sol olmak üzere iki loblu bir organdır ve her bir anatomik lobunun kendine has vasküler ve biliyer dallanması vardır ve bu loblar kendi aralarında sıklıkla birleşiktir. Karaciğer sağ üst kadran ve epigastriumun neredeyse tümünü kaplar (11).

Karaciğerin yapısal ve işlevsel biriminin nasıl tanımlanacağı konusu uzun süren tartışmalar sonrasında; karaciğerde işlevsel birim olarak birkaç milimetre uzunluğunda, 0,8-2 mm çapında, silindirik bir yapıya sahip karaciğerdeki fonksiyonel ve anatomik yapının temel ünitesini oluşturan ve hepaton olarak adlandırılan karaciğer lobülü tanımlanmıştır (10, 12). Erişkin bir insan karaciğerinde yaklaşık olarak 50.000 ile 100.000 arasında lobül bulunur, bu lobüllerin bir araya gelmesi ile karaciğer oluşur ve bu lobüller bağ dokusu ile sınırlanmış düzensiz altıgen şeklinde, damarlarla çevrelenmiş doku parçalarıdır (11). Bu lobüller; portal damar, hepatik arter ve safra kanallarının küçük dallarını içeren periferik boşluklar (portal alanlar veya portal triadlar) ile sınırlandırılmıştır. Lobüller hepatositler, sinüzoid ile ayrılır ve tabakalar portal bölgelerden (sınırlayıcı tabaka olarak bilinen bir alan) lobüller yapının merkezinde bulunan merkezi vene kadar uzanır (12). Her bir lobülün merkezinde var olan ve o lobüldeki kanı vena hepatika sistemine boşaltan vena sentralis bulunmaktadır. Karaciğer parankim hücreleri olan hepatositler vena sentralisten çevreye doğru ışınal bir şekilde sıralanmışlardır, bu sıralanma erişkin bir bireyde tek sıra halindedir. Karaciğerdeki bu hücreler arasında sinüzoid denilen damar ağı yer alır (11).

Karaciğerin enfeksiyöz organizmaları algılama ve yanıt verme kabiliyeti, hem anatomisinin hem de bu organda bulunan hücre popülasyonlarının bir fonksiyonudur. Karaciğer en büyük makrofaj popülasyonunu, doğal öldürücü (NK) hücrelerin ve doğal öldürücü T (NK-T) hücrelerinin büyük yoğunluğunu ve vücuttaki en geniş retikuloendotel hücre ağını barındırır (13).

Kupffer hücreleri, vücudumuzdaki savunma sisteminin en geniş ağını teşkil eder ve sinüzoid duvarlarına yerleşik şekilde, kan aracılığıyla karaciğere ulaşan toksik ve

gereksiz maddelerin filtrasyonunu sağlamaktadır (9). Sinüzoidlerde bulunan kupffer hücreleri karaciğere özel retikülo endotelyal sistem elemanıdır ve sinüzoid kapillerden sürekli bir endotel örtünün bulunmaması ile ayrılır (11).

Karaciğer parenkimal hepatosit hücreleri ile sinüzoid duvarı arasında Disse aralığı denilen kapiller aralık bulunur. Kan akımının disse aralığında çok yavaş olmasından dolayı kan ve karaciğer hücresi arasında gerçekleşen madde değişimi yeterli miktarda ve kolay gerçekleşmektedir. Karaciğer fonksiyonel ve arteryel olmak üzere farklı iki kaynaktan gelen kan ile beslenen istisnai bir organımızdır. Vena porta ile başlayan fonksiyonel dolaşım sindirim sisteminden emilen besin maddelerince zengin kan karaciğere taşırken; karaciğerin arteryel kanı ise arteria hepatica vasıtasıyla karaciğere ulaşır ve böylece oksijen açısından zengin kan taşınımı gerçekleşir (11).

2.1.1. Karaciğerin Fonksiyonları

Vücudumuzun en büyük parankimatöz organı olan karaciğerin birçok önemli işlevi vardır ve bunlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir (10);

- Yağların emilim ve sindiriminde görev alan safra tuzlarını sentezler.
- Duodenumdaki asidin nötralize edilmesini sağlayan bikarbonattan zengin sıvıyı salgılar.
- Kolesterolu sentezler ve kana salgılar.
- Hormonları metabolize eder.
- Tiroksinden (T4) triiyodotironin (T3) oluşumunu sağlar.
- D vitamini aktifleşmesinde önemli rol oynar.
- Büyümeyi sağlayan insülin benzeri büyüme faktörünü salgılar.
- Anjiyotensinojeni salgılamaktadır.
- Plazma pıhtılaşma faktörlerinin çoğunu sentezler.
- Bilurubin ve diğer safra pigmentlerini safraya salgılamaktadır.
- Eritrositleri parçalar.
- Açlık dönemlerinde yağ asitlerini keton cisimlerine çevirir.
- Protein katabolizmasının son ürünü olan üreyi sentezler ve kana salgılar.
- Karbonhidrat metabolizmasında görevlidir (glikojen depolama, galaktoz ve fruktozu glukozu çevirme).
- Vitaminlerin depo edilmesinde rol alır.

2.1.2. Hepatositler

Karaciğer hücrelerinin yaklaşık %80'ni hepatositlerden oluşmaktadır (14). Periferde bulunan hepatositler periportal olarak adlandırılırken, lobülde daha merkezi konumda bulunan hepatositler perisentral, perivenular olarak adlandırılır. Karaciğer tabakaları birbirine bağlıdır ve periportal hepatositler birden fazla tabakaya ait olabilir. Yetişkin bir karaciğer tabakası 20-25 hepatosit içerir, bu hepatositlerin ilk 6-8'i periportal hepatosit olarak kabul edilirken geri kalanları sentrilobüler hepatositleri oluşturur (12). Kronik karaciğer hasarını takiben, hepatositler apoptozise girerek hepatik stellat hücrelerin aktivasyonuna neden olur. Sonuç olarak, aktive hepatik stellat hücreler (HSH) çoğalır ve yara oluşumundan sorumlu aşırı ekstra sellüler matriks üretir (4).

2.1.3. Hepatik Stellat Hücreler

Hepatik stellat hücreler, (Ito hücreleri, yağ depolayan hücreler) ilk kez Von Kupfer tarafından 1876 yılında karaciğer stellat hücreleri olarak tanımlanmıştır (3). Kupfer tarafından tanımlanan hepatik stellat hücresi, hepatoselüler fonksiyon ve karaciğer yaralanma esnasındaki tepkisi açısından hayati önem taşıyan çok yönlü bir mezenşimal hücre olarak ortaya çıkmıştır. Parankimal olmayan hücre popülasyonunun yaklaşık üçte birini ve karaciğerdeki yerleşik hücrelerin toplam sayısının %15'ini oluştururlar (15). HSH'ler, hepatositlerin bazolateral yüzeyi ve sinüzoidal endotel hücrelerinin antiluminal tarafı arasındaki Disse perisinüzoid boşluğunda bulunan vitamin A depolayan, fibrojenizde rol alan ana hücreler olarak görev yapar (9, 15). Hepatik stellat hücreler, intrahepatik safra yollarının gelişimi sırasında da hayati önem taşımaktadır (15). Bu hücreler hepatositlerin, endotel hücreler ve sinir lifleri arasındaki iletişimi gerçekleştirirler (9). Daha ilginç olan, karaciğer stellat hücrelerinin bir alt kümesi, kök hücre belirteci olan CD 133'ü ifade eder, bu da stellat hücrelerinin gelişmekte olan veya erişkin karaciğerinde pluripotent potansiyele sahip hücreler olabileceğini düşündürmektedir (15).

Hepatik stellat hücre aktivasyonu, fibrozda kritik bir olayı temsil eder, çünkü bu hücreler, yaralanma üzerine karaciğerdeki ekstrasellüler matriksin birincil kaynağı haline gelir (16). Hepatik stellat hücreleri, transforme edici büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1), anjiyotensin II ve leptin gibi fibrojenik sitokinler tarafından aktive edilirler ve yaralı karaciğerde kollajen üretirler (17). Aktive edilmiş HSH'ler, ekstrasellüler matriks (ESM)'in üretiminde artış, smooth muscle α -actin (α -SMA) ekspresyonu, pro-

inflamatuvar sitokin salgılanması ve matriks bozucu enzimlerin ve inhibitörlerinin salınması gibi farklı fenotipler kazanırlar (14). Aktive edilmiş HSH'ler fibrotik matriks birikimine neden olan fibriler kollajenleri salgılar ve metalloproteinazların spesifik doku inhibitörleri (TIMP)'leri ifade ederler, böylece matriks bozucu metalloproteinaz aktivitesi engellenir (3). HSH'lerin bir diğer görevi, kemokinler salarak ve hücre adezyon moleküllerini eksprese ederek farklı mekanizmalar yoluyla inflamatuvar hücrelerin toplanmasına katılmalarıdır (18). Bu kemokinler, inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonunu artırarak karaciğer fibrozisini düzenleyen inflamatuvar mediyatörler olarak görev alırlar (19). HSH'ler, CCR2, CCR5, CCR7, CXCR3, CXCR4, CCL2 monosit kemotaktik peptit-1 (MCP-1), CCL5 gibi geniş bir profibrojenik ve antifibrojenik kemokinler serisini üretirler (20). Karaciğer makrofajları, nükleer faktör-kappaB- (NF-κB-) bağımlı şekilde aktive HSH'nin hayatta kalmasını sağlayarak karaciğer fibrozunu destekler (14).

2.1.4. Sinüzoidal Endotel Hücreler

Karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri (LSEC), hepatik sinüzoidlerin duvarını oluşturan, eşsiz morfoloji ve fonksiyona sahip özelleşmiş endotel hücrelerdir (21). Bu hücreler, tehlikeli makro moleküllerin kandan uzaklaştırılmasından sorumlu olan ve karaciğer bağışıklığında önemli bir oyuncu olarak kabul edilen çöpçü hücre gibi görev yaparlar (22). LSEC'lerin bağışıklık fonksiyonları vücudun diğer endotelial hücreleri arasında eşsizdir (13). Bu hücreler endositik Fc gamma reseptör IIB2 (FcγRIIB2) ve mannoz reseptör, çöpçü reseptörler, bazı toll like reseptörler (TLR) gibi çeşitli kalıp tanıma reseptörlerini (PRR) ifade ederler. LSEC'ler sinüzoidal kan akışının düzenlenmesine önemli oranda katkıda bulunurlar. Bu hücreler karaciğer rejenerasyonunun tetiklenmesinde anahtar rol almalarının yanı sıra, karaciğer fibrozu ve karaciğer metastazı gibi hepatik komplikasyonlarda da rol alırlar (22).

2.1.5. Kupffer Hücreleri

Kupffer hücreleri karaciğer makrofajlarıdır ve karaciğerdeki parankimal olmayan hücrelerin yaklaşık %35'ini temsil ederken vücuttaki tüm doku makrofajlarının %80-90'ını temsil etmektedir (23). Yapılan ilk çalışmalar kupffer hücrelerinin kemik iliğinden köken aldığı, karaciğere monositler halinde geldiğini ve doku makrofajlarına farklılaşmış olduğunu gösterdi. Daha sonraki zamanlarda karaciğerde hematopoietik kök hücreler tespit edildi ve bu hücreler kupffer hücre benzeri makrofajlara dönüşme kapasitesi gösterildi. Bu da kupffer hücrelerinin karaciğerdeki bölgesel hematopoiezden

türetildiğini düşündürmektedir. Kupffer hücreleri, LSEC'lere bağlı ve doğrudan kan içeriğine maruz kalan hareketsiz hücrelerdir (13). Kupffer hücreleri aktif fagositozun yanı sıra, immün sistemin esaslı bir elemanı olarak immunolojik olaylara katılır ayrıca sinuzoid içi dolaşımın düzenlenmesinde görev alır (11).

2.2. Karaciğer Fibrozu

ESM bileşenlerinin aşırı üretimi ve birikmesiyle karakterize olan, kronik hasarlı karaciğerdeki yara iyileşme sürecine karaciğer fibrozu denir (24). Fibrozun oluşum süreci; HSH'lerin aktivasyonu ve ESM proteinlerinin aşırı düzeyde ifadesini içermektedir (2, 25). Karaciğer fibrozuna yol açan etkenler arasında viral hepatitler (B, C, D) toksin ve ilaçlar, alkolik olmayan steatohepatit, hemakromatozis, tip IV glikojen depo hastalığı, alfa-1 antitripsin eksikliği, wilson hastalığı, galaktozemi, tirozinemi, primer biliyer siroz, otoimmün hepatit gibi metabolik ve kalıtsal hastalıklar yer almaktadır (25). Kronik bir süreç olan karaciğer fibrozu tedavi edilemediği zaman siroza ilerleyebilir (4). Fakat karaciğer hasarını oluşturan travma geçici ise karaciğerdeki değişiklikler de geçici olabilir ve karaciğer fibrozisi çözülebilir (26). Karaciğer fibrozunun derecesini ve siroza ilerleme durumunu etkileyen faktörler arasında yaş, cinsiyet, kilo, günlük tüketilen alkol miktarı, enfeksiyona maruz kalma süresi, şeker hastalığı, karaciğer demir seviyesi sayılır (27).

2.2.1. Karaciğer Fibrozunun Patogenezi

Karaciğer fibrozuna yol açan hücresel ve moleküler patogenezin anlaşılması büyük önem taşımaktadır (28). Karaciğerde fibrozun gelişimi, inflamasyon ve fibrojenez reaksiyonları sonucunda gerçekleşir. İnflamasyon anında karaciğer yaralanmasını takiben inflamatuvar hücrelerin yaralı bölgede birikimi gerçekleşir (4). Başlangıçta hepatotoksik faktörlerle çeşitli hepatik hücrelerden (endotel, kupffer hücreleri, trombosit vb.) gelen parakrin uyarılar HSH'lerin gen ifadelerinde değişikliğe neden olur (29). Endotelin-1 erken döneminde tip 1 kollajen gen ifadesini yükselterek HSH aktivasyonunu uyarırken bazı inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinlerin salınımını ise kupffer hücreleri gerçekleştirir. Özellikle kupffer hücrelerinden salgılanan TGF- β 1 HSH'lerdeki kollajen I ifadesini arttırmaktadır (25). Sağlıklı karaciğer için normal olan düşük yoğunluklu matriks, fibrozis esnasında bozulur ve fonksiyonel olmayan kollajenöz yapıyla yer değiştirir. Başlangıçta kupffer hücrelerinden salınan TGF- β 'nın uyarımı ile aktive olan HSH'ler ESM proteinlerini salgılar. Bu proteinler özellikle tip I-III-IV kollajen, fibronektin, elastin, laminin ve proteoglikanlardır (4, 25). Normal karaciğer dokusunda

1:1 oranında olan kollajen tip I / tip III oranı fibrozun artarak siroza doğru ilerlemesi durumunda 4:1 oranına dönüşmektedir (30). HSH'ler, matriks metalloproteinaz (MMP)-2'nin önemli bir kaynağını oluşturmaktadırlar. MMP'ler ESM'nin ana bileşenleri olan tip IV kollajen ve lamini bozar (16, 25). Kalsiyum bağımlı enzimlerin ana ailesi olan MMP'ler kollajen ve kollajen olmayan ESM substratlarını yıkıma uğratırlar. Bir inaktif proenzim olarak salgılanan MMP'ler, endojen proteinaz inhibitör ailesinin üyesi olan TIMP'lerce düzenlenir. Karaciğer yaralanması esnasında TIMP'ler; MMP aktivitesine karşı etki ederek matriks birikimini önlemede büyük rol oynamaktadır (16). MMP-1'in etkisini engelleme yeteneğine sahip olan TIMP'ler kollajen fibrillerinin birikmesine sebebiyet verirler (25). Karaciğerde fibroz gelişimi çeşitli etkenler nedeniyle oluşan inflamasyon sonucu meydana gelen yara iyileşme cevabı olarak gerçekleşir. Hastalık etkeni ortadan kaldırılmadığında ve hastalık kronik bir sürece girdiğinde kalın fibröz bantların ve rejenerasyon modüllerinin oluşumunu takiben siroz meydana gelir (29). Fibrozisin çözülmesi sırasında hepatik makrofajlar, MMP-13 üretimini arttırarak matriks yıkımında görev alır (16). Karaciğer fibrozu için geliştirilen tedavi stratejilerinde, fibroz patogenezinin çok yönlülüğü hesaba katılmalı; HSH ve hepatositlerden başlayarak tüm hücre hatları stratejiye dahil edilmelidir (14).

2.2.2. Karaciğer Fibrozu ve Hepatik Stellat Hücreler

Karaciğerde fibroz süreci, karaciğer fibrozundan sorumlu hücre olarak kabul edilen HSH aktivasyonu ile başlar; esas olarak, reaktif oksijen türleri (ROS), lipid peroksidasyonu ürünleri (TGF- β) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi fibrojenik sitokinler gibi etkenlerden kaynaklanmaktadır (14). Bu etken maddeler, hasar görmüş hepatositlerden ve / veya hepatik yaralanmayı takiben aktive edilmiş kupffer hücrelerinden, makrofajlardan ve trombositlerden salınır (31, 32). Aktive edilmiş HSH hem proliferatif (PDGF) hem de fibrojenik sitokinlere (TGF- β) cevap verir (33). Karaciğer hasarında hepatik stellat hücreler birçok farklı sitokin salgırlar, lenfositlerin toplanmasında rol alırlar ve böylelikle karaciğer hastalığının patogenezinine aktif olarak katılırlar (34). Bu sitokinlerin hem mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) sinyalini hem de fokal adezyon kinaz- fosfatidilinositol 3-kinaz-Akt-p70 S6 kinaz FAK-PI3K-Akt-p70S6K) sinyal kaskatını aktive ettiği açıkça görülmektedir (33).

2.2.3. Hepatik Stellat Hücrelerin İmmünregülatör Roller

Hepatik stellat hücreleri, mono- ve polimorfonükleer lökositlerin infiltrasyonunu indükleyerek inflamatuvar cevabı artırabilir. Aktive stellat hücreler; MCP-1, CCL21 ve CCR5'i içeren kemokinler üretirler (15). HSH'ler aynı zamanda, lenfosit çoğalmasını veya apoptozu uyaran profesyonel antijen sunan hücreler olarak da işlev görebilirler (35, 36). HSH'ler yapılan bir çalışmada aktive olan T hücrelerinin apoptozunu indüklemiştir, ancak proliferasyon veya sitokin üretimini inhibe etmemiştir. Stellat hücreleri hem lökosit davranışını düzenler hem de spesifik lenfosit popülasyonlarından etkilenir (15). Aktive edilmiş HSH'ler lipopolisakkarit (LPS) reseptör kompleksini oluşturan TLR4'ü ve CD14 moleküllerini ifade eder (37).

2.3. Karaciğerde İmmün Yanıt

Vücudumuzu işgal eden mikroorganizma ve yabancı antijenlere karşı savunmada rol alan hücre, doku ve moleküllerin tamamını oluşturan sisteme immün sistem, bu hücre ve moleküllerin enfeksiyona yol açan mikroorganizmalar ve hastalıklara neden olan patojenlere karşı verdikleri düzenli tepki bütününe de immün yanıt denir (38). Bir organizmanın fiziksel bütünlüğü enfeksiyon veya yaralanma nedeniyle ihlal edildiğinde, inflamatuvar yanıt olarak adlandırılan fizyolojik tepki harekete geçirilir. Bu tepki, enfeksiyona neden olan enfeksiyonu ya da doku hasarını ortadan kaldırmakla, kendi kendini denetleyen bir yöntemle vücudun sağlıklı bir hal almasını sağlamaktır (39). Sağlıklı bireyler patojenlere karşı kendini korumak için ilk savunma mekanizması olarak doğal immün yanıt ve sonrasında devreye giren edinsel immün yanıt olmak üzere iki savunma mekanizması kullanırlar (38). Doğal immün sistem elemanları; epitelyum, epitelde bulunan özelleşmiş hücreler, PRR'ler, antimikrobiyal peptitler, immün hücreler (makrofajlar, dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreler, NK-T hücreleri) kompleman sistemi ve çeşitli sitokinlerdir (38, 40).

Hem portal damar kanı hem de arteriyel kanı alan karaciğer, kanla bulaşan enfeksiyonlara karşı savunmada önemli ve kritik bir ögedir. Bu rolü yerine getirmek için, karaciğer, kandan patojenlerin tespiti ve yakalanması konusunda uzmanlaşmış çok sayıda doğal ve edinsel immün yanıt hücresi içerir. Bu bağışıklık hücreleri, patojen temizlenmesi, lenfositlere antijen sunumu gibi koordineli bağışıklık tepkilerine katılır (13). Karaciğer hasarını takiben, birkaç hücre türü inflamatuvar sitokinleri salabilir; bu hücre tipleri kupffer hücreleri, hepatositler, HSH'ler, NK hücreleri, lenfositler ve

dendritik hücreleridir. İnflamatuar sitokinler, karaciğer fibrozunda önemli bir rol oynarlar, bu sitokinler; kemokinler (MCP-1, IL-8) interferonlar (IFN- α , IFN- γ) interlokinler (IL-1, IL-6, IL-10) büyüme faktörleri, adipokinler ve çözünür nörohumoral ligandları içeren protein ailesidir (16). PRR'ler, immün hücrelerde olduğu gibi karaciğer parenkimal hücrelerinde de mevcuttur. C-reaktif protein (CRP), lipopolisakkarid bağlayıcı protein, peptidoglikan tanıma proteini ve çözünür CD14 gibi vücuttaki PRR'lerin başlıca kaynağı karaciğerdir ve karaciğer TLR'ler, nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon (NOD) benzeri reseptörler gibi çeşitli PRR'leri ifade eder. Karaciğer stellat hücreleri aynı zamanda TLR4, TLR2'yi ve CD14'ü ifade eder (40).

2.4. Karaciğer Fibrozu ve İmmün Yanıt

Karaciğer hasarını takiben, hasarlı bölgede inflammatuar hücrelerin birikimi meydana gelir (3). Karaciğer inflamasyona karşı savunma rolünü başarmak için, kandan patojenlerin saptanması ve tutulması konusunda uzmanlaşmış çok sayıda doğal ve edinsel immün yanıt hücresi içerir (13). Normal karaciğer içinde çok sayıda lökosit olmasına rağmen, karaciğer hasarı sonucu yerleşik inflammatuar hücre havuzunun aktivasyonu ile aynı anda bir araya gelen inflammatuar hücrelerin büyük bir birikimi meydana gelir. Belirli bir karaciğer hasarı tipine yanıt olarak bireysel olarak aktive edilmiş ve bir araya toplanan inflammatuar hücre popülasyonlarının karışımı, inflammatuar cevabın süresini ve yoğunluğunu kontrol edebilir (3).

Kronik yaralanmalar oluştuğunda, makrofajlar, lenfositler, plazma hücreleri gibi mononükleer hücrelerin infiltrasyonu ile inflamasyon karakterize edilir (41). İnflamasyon ile hepatik fibroz arasındaki ilişkiyi incelemek ve anlamak için, bir takım çalışmalar yapılmıştır ve karaciğer fibrojeninde bireysel inflammatuar hücre tiplerinin rolleri gösterilmiştir. Trombositler, nötrofiller, makrofajlar, mast hücreleri ve doğal öldürücü hücrelerini içeren doğal immün yanıt hücrelerine ek olarak T ve B hücreleri gibi edinsel immün yanıt hücreleri de fibrojeniz sürecine katılır (3). Bu süreçte rol alan hücrelerden trombositlerin fibrojenizle ilişkisi, TGF- β ve PDGF gibi sitokinleri salma kapasitesinden kaynaklanmaktadır (42). Nötrofiller, hücre proliferasyonunu ve aktive HSH'leri indükleyerek karaciğer fibrozunu arttıran human nötrofil peptid-1 (HNP-1) ve IL-17A'yı sentezler. Mast hücreleri, çeşitli karaciğer hastalıklarında rol oynayan; karaciğerde doğal olarak bulunan immün yanıt hücreleridir (4). Yapılan çalışmalarda mast hücrelerinin sayılarının fibroz ile ilişkili kronik karaciğer hastalıklarında arttığı rapor edilmiştir (43).

Karaciğer parankiminde, toplam lenfositlerin %30-50'si NK hücreleri olan nispeten yüksek miktarda infiltrate bağışıklık hücresi bulundurduğundan kesinlikle eşsiz bir organ olarak kabul edilmektedir (44). Bu yüzden karaciğer zengin bir NK hücre popülasyonuna sahiptir (4). NK ve NK-T hücreleri aynı zamanda karaciğer fibrozunun inhibe edilebilmesi konusuna dikkat çekmektedirler (45). NK hücreleri ve NKT, interferon gama (IFN- γ) üreterek karaciğer fibrozunu azaltır ve aktive HSH'lerin erken ölümüne veya yaşlanmasına neden olur. NK hücreleri, NKG2D, TRAIL bağımlı ve Fas ligand bağımlı mekanizmaları yoluyla aktive HSH'leri öldürür ve böylece karaciğer fibrozunu düzeltir (4). Sonuç olarak yapılan çalışmalarda NK hücresi aktivasyonunun aktive HSH'lerin ölümüne yol açtığı ve karaciğer fibrozunun şiddetini zayıflattığı görülmüştür (3).

Karaciğerde kupffer hücreleri olarak bilinen makrofajlar hepatik sinüzoidlerde bulunan hücrelerdir (40). Karaciğer yaralanması üzerine, makrofajlar göreve başlar. İşlev görmeleri, kemokinler ve reseptörleri, özellikle C-C motifi kemokin reseptör 8 (CCR8), 2 (CCR2) ve CC kemokin ligandı 2 (CCL2), MCP-1 aracılığı ile gerçekleşir (13). Makrofajlar, TGF- β , IL-1 β , IL-8, PDGF, tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ve MCP-1 gibi sitokinler üreterek inflamasyonu ve fibrozu düzenler (46). İnflamatuar mediyatörlerden TGF- β ve TNF- α HSH'lerin miyofibroblastta benzer bir fenotipe dönüşmesi, çoğalması ve de ekstrasellüler matriksin aşırı birikiminde rol alır (47). Fibrojenik bir sitokin olan TGF- β HSH'ler aracılığı ile α -SMA ve tip I kollajenin sentezinde artışa neden olur. PDGF, myofibroblastların çoğalmasını indükler (48). Herhangi bir fibroz indüksiyonundan sonra tüm karaciğer lenfositlerinin sayıca artışı görülmüştür. Lenfositler karaciğere sızdığına, fibrojenik yanıtı modüle etmek ve lenfosit çoğalmasını indüklemek için aktive HSH'ye doğrudan bağlanırlar (4). Lenfositler, özellikle de CD8+ T hücreleri, karaciğer fibrozunun gelişmesinde rol oynar (49). Ek olarak, CD4+ T hücreleri, TNF- α ve IL-2 sitokinleri salgılayarak fibrogeneze neden olabilir (50). Th1 alt grubu yüksek seviyede antifibrotik IFN- γ üretirken, Th2 hücreleri başta IL-4, IL-5 ve IL-13 olmak üzere yüksek düzeyde profibrojenik sitokinler üretir (41). B lenfositler de fibrogenezde rol alır; fakat etkisi T hücrelerinden daha az araştırılmıştır (4). Aynı zamanda HSH'ler, çeşitli bağışıklık hücresi türleriyle etkileşim yoluyla inflamasyon sürecine aktif olarak katılmaktadırlar (51). Dahası, proliferasyon ve aşırı ekstrasellüler matriks birikiminden sorumlu bir miyofibroblast benzeri fenotip ile karakterize pasif HSH'lerin aktif hale dönüşümleri TGF- β ve TNF- α dahil olmak üzere inflamatuvar mediyatörler tarafından düzenlenir (4). HSH'ler sitokinler tarafından uyarılan

nötrofil kemoatraktan protein, MCP-1, M-CSF gibi salgıladığı kemoatraktanlar sayesinde monositlerin, makrofajların ve lenfositlerin inflamasyon bölgesinde toplanmasını sağlar (47).

2.5. Aşı ve Aşı Tipleri

Aşı, immün sistemi uyararak hastalığa karşı korumada rol oynayan biyolojik ürünlerdir (52). Aşılama, modifiye veya öldürülmüş mikroorganizmalar kullanılarak hastalıklara karşı direncin uyarılmasına yardımcı olan işlemdir (53). Bilim tarihinin en parlak dönemlerinden biri de aşıların insan yaşamı üzerindeki uzun ömür ve sağlık etkisinin gösterilmesidir. Çiçek hastalığından korunmak için yapılan çiçek aşısı, toksik etkilere karşı bağışıklık oluşturmak için küçük miktarlarda zehir kullanımına benzer bir çalışmadır (54). Bilimsel aşı uygulaması 18. yy sonlarına dayansa da daha önceki yıllarda da aşı uygulamaları birçok kez denenmiştir. İlk kez 1796 yılında Edward Jenner bilimsel aşı uygulamasını gerçekleştirmiştir (55). Variolasyon çalışmalarının önce Orta Asya da yapıldığı sonraları Türkiye, Çin ve Hindistan'a yayıldığı düşünülmektedir. Jenner'in çiçek hastalığı oluşumunu önlemek için bir hayvan poks virusu kullanması, aslında hayvanlarda tehlikeli bir maddenin insanlarda zayıflatılabileceği fikrine dayanıyordu (54). Bu çalışmada cowpox virüsü ile aşılanan bireyler ve aşı sonucu bağışıklanmış kişilerde aşının koruyucu etkisi ortaya konulmuştur (55). Edward Jenner bağışıklama ve çiçek hastalığının ortadan kaldırılması için yenilikçi katkılarından dolayı dünya çapında iyi bilinmektedir (56). Aşılanmanın mantığı, kişinin etkenle karşılaşıp; vücudunun bağışıklık oluşturması fakat bu sırada hastalığa yakalanmaması üzerine kuruludur (52). Aşının etkisi, zayıflatılmış, öldürülmüş mikroorganizmaya ya da mikroorganizmanın bazı parçalarına karşı gelişen immün sistemin yanıt vermesi ile gerçekleştirilir (52). Böylece, aktif bağışıklığı indükleyerek koruyucu etkilerini gösterirler ve immünolojik bellek oluştururlar (57).

Bir aşının taşınması gereken bazı özellikler şunlardır: uzun süreli, koruyucu ve etkin immün yanıt oluşturabilmesi, toksik olmaması, maliyetinin düşük olmasıdır (55). Bu ticari aşılar, aşı antijeninin doğasına bağlı olarak 2 grupta sınıflandırılırlar. Bunlar; inaktive aşılar ve zayıflatılmış canlı aşılardır (52).

1. İnaktive Aşılar: Bu tip aşılar enfeksiyon kaynağı mikroorganizmaların sıcaklık, kimyasallar ve radyasyon gibi etmenlere maruz bırakılması sonucu öldürülmesi ya da etkisiz hale getirilmesi ile elde edilirler (55). Etkenin tamamı veya belirli bir

kısından üretilmiş aşı grubudur ve uygulama sonrası ilerleyen zamanlarda pekiştirme dozu uygulaması gerekebilir (52). Etkin immün yanıt oluşturan bu grup aşılar canlı aşılara kıyasla daha güvenilir olmaları ve yüksek dozda, daha sık yapılabilmeleri açısından kullanışlıdır. Hepatit A, kuduz aşısı ve grip aşısı bu grup aşılara örnektir (55).

İnaktive grubu aşı çeşidi olarak bilinen alt birim aşılar sadece bir antijene ya da bu antijenin sahip olduğu epitopa karşı geliştirilen aşılardır (58). Alt birim aşılara Hepatit B aşısı ve şarbon aşısı örnek olarak verilebilir. Bu grup aşıdaki antijen eldesi patojenden rekombinant DNA teknolojisi ile ya da ajandan saflaştırma ile olur (55).

İnaktive grubu aşı çeşidinin bilinen bir diğer grubu toksoid aşı grubudur. Bazı patojenler bir egzotoksin salgılayarak hastalığa sebep olurlar, örneğin; tetanoz, difteri, kolera gibi (57). Toksoid aşıların  temel avantajı vardır. Birincisi, güvenlidirler çünkü önledikleri hastalığa neden olmazlar ve virülansa geri dönüş olasılığı yoktur. İkincisi, aşı antijenleri aktif olarak oğalamadıklarından dolayı aşılanmamış bireylere yayılamazlar üçüncüsü, sıcaklık, nem, ışıktaki değişimlere daha az duyarlı olmalarından dolayı uzun mrldrlere. Toksoid aşıların iki dezavantajı vardır. İlk olarak, genellikle bir adjuvana ihtiyaç duyarlar ve birkaç doz gerektirirler. İkincisi, adjuvan veya tip III (Arthus) reaksiyonuna bağlı olabilen aşı yerindeki lokal reaksiyonların daha yaygın olmasıdır (59).

2. Zayıflatılmış Canlı Aşılar: Zayıflatılmış canlı aşılar insanda kullanılmak üzere viral patojen ya da bakterinin çeşitli yaklaşımlarla zayıflatılmış formudur. Bu yaklaşımlardan biri yabancı konakda virüsün geliştirilmesidir. Örneğin, kızamık virüsünün civciv yumurta fibroblastlarında geliştirilmesi. Bu gibi durumlarda viral replikasyon, bir dizi mutant tipin ortaya çıkmasına neden olur: yabancı konaki için gelişmiş virülansa sahip olan mutantlar, daha sonra, insan konaki için genel olarak azalmış virülans gösterdiğinden potansiyel aşı suşları olarak seçilir (59). Canlı aşılardaki zayıflatılmış patojenlerin mutasyon geçirmeleri ile zararlı formlar oluşturması ve immün yetmezliği olan kişilerde canlı patojene yeterli immün yanıt oluşturulamadığından patojenin zararlı etkisi gerekleēebilir (55). Canlı aşıların bir diğer dezavantajı ise, hastalıklara karşı korunmak için tasarlandıkları hastalıklara sebep olma ihtimalidir çünkü bazı kişiler için (rneğin, immün sistemi baskılanmış) bu tip aşılar yetersiz zayıflatılmışlardır. Bu aşı grubuna örnek olarak; kızamık, kızamıkçık, suçiçeği aşıları verilebilir (59).

2.5.1. Aşılama Sonrası Gelişen İmmün Yanıt

İmmün sistem, sitokinler ve doğrudan temas yoluyla iletişim kurabilen ve belirli savunma yanıtlarını düzenleyen özel hücre tipleri ve dokuları ağıdır. Sağlıklı bir immün sistemin net işlevselliği, moleküler düzeyde bağışıklık sistemi bileşenleri arasındaki etkileşime; sistem düzeyinde bütünleşmeye ve düzenlenmeye bağlıdır. Bağışıklık sisteminin sağlam işleyişinin temeli, hücre içi biyokimyasal etkileşimler, hücreler arası iletişim ve organlar arası hücresel ağlar arasında bağlantı kuran oldukça karmaşık, çok basamaklı etkileşim ağına dayandığı düşünülmektedir (58). Aşı kullanımının bulaşıcı hastalıkları kontrol etme ve önleme yeteneği ile immün sistemin koruyuculuğunu arttırmada büyük etkisi olmuştur (53). Başlangıçta aşılanmış deneklerdeki beyaz kan hücrelerinin gen ekspresyonu analizi kullanılarak, daha sonra sadece gen ekspresyonunu değil, tüm immün sistemin temel bileşenleri olan yüzlerce hücre tipi ve alt grupları, sitokinler ve kemokinlerin çoğunu (60) kapsayacak şekilde genişletilmiştir. DNA dizileme teknolojisindeki ilerlemeler, aşılarla büyük ölçüde yanıt veren immünoglobulin (Ig) ve T hücre reseptör (TCR) repertuarlarını da analiz etmeyi mümkün kılmaktadır (58).

2.5.2 Aşılanmanın Yetersiz Olduğu Durumlar

Bağışıklık sistemi, patojenlere ve virülen faktörlere karşı spesifik immün tepkilerini tetikleyerek enfeksiyonlarla savaşır. Aşı kullanımının bulaşıcı hastalıkları önleme ve kontrol etme üzerinde büyük etkisi olmuştur (53). Aşılama, modifiye veya öldürülmüş mikroorganizmalar kullanılarak hastalıklara karşı direncin uyarılmasına yardımcı olurken, aşılarla %100 korunma sağlanamamaktadır ve bireylerin küçük bir kısmı aşı yapılmasına rağmen enfekte olmaktadır (57). Aşılar, birincil veya ikincil aşı başarısızlıkları olarak bilinen iki şekilde başarısız olabilirler. Birincil başarısızlık, bireyin aşının ilk immünolojik yanıtını verememesi durumunda ortaya çıkar. İkincil başarısızlık ise bireyin ilk başta yanıt verip daha sonra bu yanıtın azalması ile gerçekleşmektedir. Ticari aşıların etkinliği, aşıların yüksek koruyucu etkilerine rağmen bazı kronik böbrek yetmezliği, immün yetmezliği olan bireyler, obez bireyler ve hepatit taşıyıcılarında daha düşüktür (55). Yıllardır kronik hemodiyaliz hastaları üzerinde farklı uygulamalar yapılmıştır. Bu uygulamalar arasında; aşının yüksek dozda uygulanması, doz sayısının artırılması; interferon, timopentin, IL-2 sitokininin aşı ile birlikte uygulanmaları sayılabilir (61).

Antikorlar tarafından tanınan antijenin spesifik kısımları olan epitoplara dayanan peptit aşısı spesifik bağışıklık tepkisi üretmede daha güvenilirdir. Bununla birlikte, peptid bazlı aşının başlıca sınırlandırılması, bunların genellikle zayıf şekilde immünojenik olmaları ve etkililikleri için bir taşıyıcı/adjuvanın yardımını gerektirmeleridir (53). Çoklu epitop yaklaşımının kullanılması bu sorunun üstesinden gelebilir (62).

İnsanlarda hepatit B aşılara karşı tepkisizliğe neden olan mekanizma hala açıklanamamıştır. Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda aşıya yanıt vermeyen insanlardaki periferik kan mononükleer hücreleri (PBMK), *in vitro* olarak HBsAg'ye karşı çoğalmazken, tetanoz toksoidi (TT) ile stimülasyon üzerine kuvvetli bir şekilde çoğalmakta oldukları görülmüştür. Aşıya yanıt vermeyenler, yanıt verenlere göre daha düşük bir sitokin cevabına sahiptir (7). Son zamanlardaki çalışmalar, etkili bağışıklık tepkisini ortaya çıkarmak için peptidin tetanoz toksoide konjugasyonunu göstermektedir. Bu nedenle, sistematik peptit modifikasyonları ve tetanoz toksoidine konjugasyon, güvenli ve etkili bir aşı geliştirme yolu olduğunu kanıtlamaktadır. Tetanoz toksoidi, evrensel bir T hücresi epitopu içerdiği ve insanlar için aşı geliştirilmesinde güvenle kullanılabildiği için yüksek bağışıklık tepkisi üretmede yararlı olabilir (53).

2.6. Karaciğer Fibrozunda İmmünizasyonun Etkinliği

Enfeksiyonlar kronik karaciğer hastalığı olan, özellikle siroz hastalarında yaygındır ve bu tür hastalarda karaciğer hasarı ilerledikçe, çoğu bağışıklama etkinliğini kaybeder. İmmünizasyon yoluyla enfeksiyonun önlenmesi, kronik karaciğer hastalığı olan hastaların tedavi yönetiminde çok önemlidir (63). Kronik karaciğer hastalığı olan bireyler, akut veya kronik hepatit B enfeksiyonu nedeniyle ciddi morbidite ve mortalite oranına sahip olma olasılıkları daha yüksektir (64). Sağlıklı bireylerde akut hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonu ile karşılaştırıldığında sirozlu hastalarda HBV enfeksiyonu, hastalığın klinik fenotipi, karaciğer fonksiyon bozukluğu nedeniyle çok daha şiddetli olduğundan ciddi sonuçlar doğurabilir (65). Kronik karaciğer hastalığı olan bireyler, ileri fibrozis veya sirozun başlangıcından önce aşılandığında en iyi sonuçları vermektedir. Genel olarak kronik karaciğer hastalarında, immünizasyonun en etkili olduğu zaman, erken dönemdir ve bu tür hastalarda inaktive veya öldürülmüş tip aşılar ziyade canlı, zayıflatılmış aşılar daima tercih edilir (63). HBV aşısı, hafif ve orta derecede kronik karaciğer hastalığı olan hastalarda güvenli ve iyi tolere edilir, yüksek serokonversiyon oranlarına sahiptir, ancak ilerlemiş karaciğer hastalıklarında ve karaciğer

transplantasyonu sonrasında azalan etkinliğe sahiptir (73). Kronik karaciğer hastalığı pnömoni, influenza aşılara kıyasla hepatit B aşısı için daha yüksek yanıt vermeyen oranlarda görülür (63). Aşılama, hem duyarlı hastaların HBV edinmesini önlemek hem de HBV ile enfekte olan hastaların havuzunu azaltmak açısından önemlidir (66). Bilindiği üzere HBV'nin yüzey antijeni ile yapılan aşılama, enfeksiyonun etkin bir şekilde kontrolünü sağlamakta ve viral bulaşı engellemektedir (67). Bu durumda aşılama HBV enfeksiyonu ile ilişkili hastalık ve ölüm oranlarını düşürmek için temel prensiptir (68). HBV aşılması kronik karaciğer hastalığında da gereklidir, çünkü potansiyel olarak ölümcül komplikasyonları bulunan akut-kronik hastalığın önlenmesine yardımcı olabilir (8). Erken dönem kronik karaciğer hastalığı olanlar geleneksel hepatit B aşılarını alabilirler (63). Bununla birlikte, yaş arttıkça ve karaciğer, böbrek, şeker hastalığı veya diğer immün yetmezlik gibi kronik hastalık durumları olan bireylerde HBV aşılmasına verilen yanıt optimum değildir (8). Yaş ve karaciğer hastalığı ilerledikçe, hepatit B aşısına yanıt oranı sürekli zayıf kalacaktır (64). Ne yazık ki, bu grubun önemli bir oranı HBV aşılmasına yanıt vermeyenlere sahiptir. Bu zayıf cevabı gidermek için çeşitli intramüsküler aşılama yöntemleri kullanılmaktadır, ancak başarı sınırlıdır (8). Sağlıklı bireylerde olduğu gibi kronik karaciğer rahatsızlığı olan bireylerin ve karaciğer transplant hastalarının da aşılmasında sıkıntılar olabilmektedir ve bu hastalarda aşıya yanıt azalmaktadır (7). Karaciğerde oluşan hasarın immün yanıt gelişimi üzerine etkisi ayrıntılı olarak bilinmemekle beraber siroz gibi ileri düzey karaciğer hasarı olan bireylerde immünizasyon etkinliğinde sıkıntı olduğu görülmüştür (7). Sirozlu karaciğer hastaları genel popülasyona kıyasla düşük antikor hepatit B titrelerine sahiptir. Bu nedenle, sirozlu karaciğer hastalarında HBV aşısının değerlendirilmesinde bazı soruların yanıtlanması gerekir: kimler aşıya ihtiyaç duyar? Aşı bu hasta grubunda nasıl ve ne zaman uygulanmalı? Bu bireylere uygulanan aşı ne kadar etkilidir? Bu soruları cevaplamak, kronik karaciğer hastalıklarında HBV aşılarını uygulamak için etkili bir strateji sağlayacaktır (64). Genel popülasyonda aşılanmanın antijenite oranları > %90 iken, kronik karaciğer hastalıklarında %18 ile %100 arasında değişmektedir. Kronik karaciğer hastalığına sahip bireyler arasında HBV aşılara karşı gelişen immün yanıt %70 ile %90 arasında değişmektedir. Literatür, hepatit B aşılarının kronik karaciğer hastalıklarına sahip hastalarda güvenli ve etkili olduğunu göstermiştir, ancak siroz karaciğerindeki veriler hala yetersizdir (64). Koruyucu antikor titreleri, sadece aşılanmış sirozlu hastaların %16-28'inde saptanmıştır ve aşı dozunun tekrarlanmasından sonra, hastaların %37'si koruyucu antikor titrelerine sahip olduğu görülmüştür (69). Aşı dozu ve sayısına

bakılmaksızın siroz hastalarında hepatit B aşısına karşı oluşan yanıt oranı %16 - %87 aralığındadır. Standart doz uygulaması yapıldığında oran %16 - %87 iken çift doz uygulamasında oranın %26 - %87 aralığında olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, birçok çalışma, karaciğer sirozu olan hastalarda HBV aşısını takiben antijenitenin etkisiz olduğunu göstermiştir (65). Sirozlu hastalarda yaşlılık, altta yatan karaciğer hastalığının şiddeti, sirozda azalmış hümmoral ve hüccresel immün yanıtlar, HBV aşısına zayıf yanıtın nedenleri olarak ileri sürülmüştür (70). Sirozlu hastalar ve genel olarak daha ileri derecede kronik karaciğer hastalığı olan hastalar standart aralıklarda yüksek doz veya çift doz (40 µg) stratejisinden fayda sağlayabilirler (63). Ancak, sirozun başlangıcı olan fibroz dönemindeki immünizasyon için net bir bilgi bulunmamaktadır (7).

2.7. Karaciğer Fibrozunda Kullanılan Deney Hayvan Modelleri

Hayvan model çalışmaları; insan çalışmaları ele alınmaması gereken soruların kapsamlı bir araştırılmasının yapılmasına, gelişme/çözölme aşamasında stratejik zamanlarda çoklu örnekleme yapılmasıyla değışken sayısının en aza indirgenmesi ile deneysel test çalışmalarına olanak sağlar. Bu yüzden hayvan modelleri fibrogenezi incelemek ve potansiyel tedavi edici yaklaşımların anti-fibrotik etkilerini doğrulamak için yıllardır kullanılmaktadır (71). Fibroz alanındaki; fibrogenezis kinetiğı, fibrogenezi yöneten hücre içi yolların ve matriks üreten hücrelerin ana mekanizmaların tanımlanması, matriksin yeniden şekillenmesi, fibrozun geri dönüşümü mekanizmaları gibi başlıca ilerlemeler hayvan modellerinin çalışılmasından kaynaklanmaktadır (31, 72). Farelerde karaciğer fibrozunu modellemek için sadece fibrogenezin değil, aynı zamanda fibrolizisin de mekanizmaları açıkça tanımlanmalıdır (73). Şimdiye kadar, fibroz ve siroz sürecini taklit etmek için farelerde, sıçanlarda, tavşanlarda ve domuzlarda birçok hayvan modeli geliştirilmiştir. Karaciğer fibrozu ve sirozu aşğıdaki hayvan modelleri yaklaşımlarından herhangi biri ile uyarılabilir (74).

a) Fibrozis, kimyasal ajanlar ve toksinler tarafından indüklenebilir. Bu uyarılar karaciğerde hepatositlere doğrudan hasar verir ve ikincil inflamasyon reaksiyonunu tetikler, HSH'leri aktive eder ve fibroz ile sonuçlanır (74). Genel olarak kullanılan kimyasal ajanlar; karbon tetraklorür (CCI4) (75), tiyoasetamid (TAA) (76), dimetilnitrosamin (DMN) (77), dioksin (78), sodyum arsenat ve etanoldür (74). Bu ajanlar ile tek başına ya da kombine şekilde deneysel hayvan modeli oluşturulur (74). Karaciğer fibrozunu oluşturmak için kullanılan en yaygın modellerden biri, CCI4'ün

tekrarlanarak intraperitoneal (i.p.) olarak enjeksiyonudur (28). Bir hayvan modelinde fibroz uyarının seçimi; oluşan cevabın, insandaki ilgili hastalıkta meydana gelen belirtiler ile benzer mekanizmalar göstereceği beklentisine dayanır (71).

CCL4'e benzer şekilde, azalan TAA uygulaması da deneysel karaciğer fibrozu oluşturmada kullanılan bir başka modeldir (2). Tiyoasetamid; thiono-sülfür içeren bir bileşik olup (79), hepatotoksitesi 1948'den beri bilinen (80) nekrojenik ve kanserojen bir bileşiktir (81). TAA, karaciğer fibrojeniz mekanizmasını anlamak için yapılan çok sayıda çalışmada kullanılan uygulamalardan biridir ve bu konuda hepatotoksin TAA iyi tanımlanmış bir modeldir (28). Karaciğer fibrozu, farelerde uzun süreli TAA uygulaması ile oluşturulmaktadır (82). Fakat sıçanlara uygulanan tek dozun, plazmada transaminaz ve bilirubin artışının eşlik ettiği sentrilobüler nekroza neden olduğu bilinmektedir. Bu etkileri ortaya çıkarmak için, TAA karaciğerde cytochrome P450 2E (CYP2E1) enzimi tarafından önce S-oksit (TASO)'ya ve daha sonraki reaksiyonlarla TAA disülfoksit (TASO₂) metabolize olur (80). TAA, mikrozomal monooksijenaz sistemi vasıtasıyla şiddetli metabolik işlemler (NADPH ve sitokrom P450 gerektiren) sonucu zararlı metabolitlere farklılaşır hepatik makromoleküllere kovalent bağlanarak karaciğer hasarını oluşturur (81) TAA, her iki zon 1 ve 3 hepatositlerini diğer toksik maddelere kıyasla daha belirgin olan periportal hasar ile tahrip eder (71). TAA ile indüklenerek oluşturulan karaciğer fibrozis modeli, insan karaciğerindeki ile aynı histolojik ve metabolik değişiklikleri göstermesinden dolayı alkol bağımlı karaciğer fibrozuna en yakın model olarak görülmüştür (28). TAA deney hayvanlarına; i.p.enjeksiyon yöntemi ile tekrar tekrar enjekte edilerek veya içme suyunda (su tüketimine uyarlanmış bir konsantrasyonda) oral olarak ya da kombine yöntemler şeklinde uygulanabilir (28, 71). TAA aynı zamanda özellikle ratlarda fulminan hepatik yetmezlik ve karaciğer sirozu modellerini oluşturmada kullanılan bir bileşiktir (81).

b) Bazı özel diyetler, kolin eksikliği diyeti, L-amino asit sınırlaması, metionin eksikliği diyeti ve yüksek yağlı diyet gibi. Hayvanlara, bu diyetler tek başına ya da diğer kimyasal ajanlarla birlikte uygulandığında NAFLD ve siroz gelişir (75).

c) Fiziksel yöntemler; safra kanalı ligasyonu, ekstra hepatik safra kanalının tıkanmasına, kolestaza ve biliyer epitelyal hücrelerin ve hepatositlerin yaralanmasına, portal alanı inflamatuvar hücrelerinin infiltrasyonuna, fibröz doku proliferasyonu ve karaciğer fibrozunun oluşumuna neden olur (75). Safra kanalı ligasyonu sekonder biliyer fibroz için kullanılan bir modeldir (71).

d) İmmün yanıt ile uyarılan fibrozis; antijen-antikor kompleksleri hipersensitiv reaksiyonları ortaya çıkarabilir. Portal alan ve merkezi damar bölgesi etrafında immün komplekslerinin birikimi; alerjik reaksiyona ve iltihaplanmaya, HSH'lerin kollajen salgılamasının uyarımına ve fibroz oluşumuna neden olur (83).

e) Genetik modifikasyon; önemli profibrotik genlerin aşırı ekspresyonu ve/veya antifibrotik genlerin susturulması hayvanlarda fibrozun indüklediğini göstermiştir. Örneğin, TGF- β 1'in sade plazmid DNA'sının yüksek hızlı intravenöz enjeksiyonu, farelerde geçici ve geri dönüşümlü karaciğer fibrozunu indükleyebilir (21). Pankreas ve böbrekler üzerine toksik etkisi olan başlıca karaciğerde metabolize olan TAA vücuttan idrarla atılır (81).



3. MATERYAL VE METOD

Mevcut tez çalışması, deney hayvanları etik kurulunun 2016/A-81 sayılı onayı alınarak (Ek-1), İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Karaciğer Nakli Enstitüsü İmmünoloji Araştırma Laboratuvarında ve Histoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Deney Hayvanları

Bu çalışmada; 6 haftalık, ağırlıkları 19g ile 26g arasında değişen 40 adet BALB/c türü erkek fareler kullanıldı. Fareler İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi tarafından temin edildi. Deney hayvanları 22–24 °C sabit sıcaklıktaki odalarda standart ışık (12 saat karanlık – 12 saat aydınlık foto periyodunda), 30x24x12 cm’lik kafeslerde, standart yem ile beslendi.

3.1.2. Kullanılan Deney Araç-Gereçleri

Deneyde kullanılan cihazlar marka, model, üretildiği ülkeye göre Tablo 3.1. de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Deneyde kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka/Model/Ülke
Buzdolabı	Altus/AL370ESY/Türkiye
Derin Dondurucu (-80)	Nüve/DF490/ Türkiye
Hassas Terazı	Nimbus/NBL254i/United Kingdom
Laminar Air Flow	Nuaire/NU-540-400E/USA
Mikropipet (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf/Germany
Mini Santrifüj	Hettich Zetrifugen/Mikro200/Germany
Santrifüj	Nüve/NF800R/Türkiye
Abbot Klinik Kimya Sistemleri	Abbot/Architect C8000/Ireland
İmmünotetik Analizörü	Abbot/Architect i2000/Ireland
Mikrotom	Leica/ RM2145/Germany
Işık Mikroskobu	Nikon/Eclipse Ni/Japan
Kamera	Nikon/DS-Fi2/Japan
Görüntü Analiz Sistemi	Nikon/NIS-Elements Documentation 5.02 /(Nikon Corporation, Tokyo, Japan)

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

1. Tiyoasetamid (TAA) (Acros Organics Cas No:424530250)
2. Formaldehit (CH₂O)
3. Engerix B™ Hepatit B Aşısı (Glaxo Smith Kline Cas No:AHBVC085CL)
4. Phosphate-Buffered Saline (PBS) (Biological Industries Cas No: 02-023-1A)
5. Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)-1640 (Biowest Cas No:L0 500-500)
6. Etil Alkol (C₂H₅OH) (Alkomed Cas No: 64-17-5)
7. Tetavax Tetanoz Toksoidi (Sanfoni Pasteur Cas No:L7437)
8. Ketamin (Bremer Pharma)
9. Ksilazin (Bioveta)

3.2. Metot

3.2.1. Deney Gruplarının Belirlenmesi

Çalışmaya dahil edilen BALB/c türü deney fareleri 5 gruba ayrıldı.

1. Kontrol Grubu (n=8): Herhangi bir uygulama yapılmayan gruptur.

2. Hepatit B Aşı Grubu (n=8): Bu gruptaki farelere PBS içerisinde sulandırılan 0.25 µg/fare Engerix™ B hepatit aşısı 100 µl hacminde sol tibial anterior kasa i.m. olarak enjekte edildi. Bu konsantrasyona karar verirken benzer bir çalışma kaynak alınmıştır (84).

3. TAA Grubu (n=8): TAA çözeltisi, her bir fare için 100 mg/kg konsantrasyonunda PBS çözeltisinde hazırlandı. Bu oranı belirlerken etken madde ile daha önce yapılan çalışmalardaki konsantrasyonlar referans alındı (85). Bu grubu oluşturan her bir fareye PBS içerisinde çözdürülen TAA 14 hafta boyunca haftada 3 defa i.p. olarak uygulandı.

4. TAA + Hepatit B Aşı Grubu (n=8): 14 hafta boyunca TAA uygulaması yapılan farelere fosfat tuz tamponu içerisinde sulandırılan 0.25 µg/fare Engerix B™ hepatit aşısı 2 doz 100 µl hacminde sol tibial anterior kasa i.m. olarak enjekte edildi.

5. TAA + Hepatit B Aşısı + Tetanoz Toksoid Aşı Grubu (n=8): 14 hafta boyunca TAA uygulaması yapılan farelere Engerix™ Hepatit B aşısı ve Tetavax tetanoz

toksoidi 40 IU/0.5ml fare başına 40 µl hacminde intra muscüler olarak uygulandı. Deney süresi sonunda hayvanlar sakrifiye edildi.

3.2.2. Ağırlık Ölçümleri

Deney süresince fare gelişimlerinin kontrolünü sağlamak ve sağlıklı farelerin ayrımını yapabilmek için, enjeksiyon günlerinde (haftada üç defa) düzenli olarak farelerin tartımı gerçekleştirildi. Ayrıca deney sonunda tüm farelerin vücut ağırlıkları ve karaciğer ağırlıklarının tartımı yapıldı.

3.2.3. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması

Kesim yapılmak üzere çalışmadaki tüm gruplar deney süresi sonunda 80 mg/kg ketamin + 20 mg/kg ksilazin karışımının i.p. olarak uygulanmasıyla anestezi edildi. Daha sonra fareler supin pozisyonunda ameliyat tablası üzerinde sabitlendi ve hayvanların fizyolojik tepkilerinin izlenmesi ile hayvanların anestezi altına girdiklerinden emin olundu. Biyokimyasal analizler için aksiller damarlardan kan numuneleri alındı ve eppendorflara konularak, 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ayrılan serumlar -80°C’de muhafaza edildi. Steril şartlar altında yaklaşık 6 cm’lik orta hat kesisi ile karın bölgesi açıldı. Karaciğer dokuları alınarak ve hassas terazi ile karaciğer ağırlıkları tartılıp kaydedildi.

3.2.4. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümleri

Serum örneklerinden karaciğer fonksiyon testlerinden alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkalen fosfataz (AP) düzeyleri kantitatif testler ile otomatize kapalı sistem (Abbot Architect C8000) kullanılarak ölçümleri yapıldı.

3.2.5. Histopatolojik Analiz Yöntemleri

Deney sonunda sakrifiye edilen farelerden alınan karaciğer dokusu örnekleri nekroz, fibroz ve inflamasyon derecesini belirlemek amacıyla ilk önce makroskopik olarak incelendikten sonra %10’luk formaldehit ile 28 saat süreyle oda ısısında tespit edildi. Ardından doku örnekleri yıkama işlemini takiben artan derecelerdeki etil alkol serilerinden (%50, %70, %80, %96, %99,9), ksilen serilerinden ve 62°C’de eritilmiş parafin serilerinden geçirilerek doku takip işlemi tamamlandı ve karaciğer doku örnekleri parafin bloklar içine gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2145) yardımıyla 5-6 µm kalınlığında kesitler hazırlanarak lamalar üzerine alındı. Kesitlere Mayer’s (H&E)

yöntemi ile Hematoksilen-Eozin (H&E) boyamaları, Gomori trikrom ve Periodic Acid–Schiff (PAS) histokimyasal boyamalar uygulandı. Boyanan kesitler ışık mikroskobu (Nikon Eclipse Ni), kamera (Nikon DS-Fi2) ve görüntü analiz sistemi (Nikon NIS-Elements Documentation 5.02) (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) ile incelenerek fotoğraflar alındı.

Hematoksilen-eozin ile boyanan karaciğer kesitleri için Knodell skorum sistemi kullanılarak skorum yapıldı. Tüm gruplar için kesitlerde inflamasyon, erezyon nekroz, intralobular dejenerasyon ve fokal nekroz, fibroz skorları belirlendi. Bu parametreler için değerlendirme; inflamasyon; hiç (0 puan), hafif (1 puan) orta (3 puan), belirgin (4 puan) şeklinde puanlama yapıldı. İntralobular dejenerasyon; hiç (0 puan), hafif (1 puan), orta şiddette (3 puan), belirgin (4 puan) şeklinde puanlama yapıldı. Erezyon nekroz için hiç (0 puan), hafif (1 puan), orta şiddette (3 puan), belirgin (4 puan), orta şiddette ve köprülü nekroz (5 puan), belirgin ve köprülü nekroz (6 puan) çok loblu nekroz (10 puan) şeklinde puanlama yapıldı. Fibroz ise; hiç (0 puan), portal dağılımlı fibroz (1 puan), köprülü fibroz (3 puan), siroz (4 puan) şeklinde değerlendirilerek bu değerlendirmelerin toplamı histolojik puan olarak ifade edildi.

3.2.6. İmmünolojik Analiz Yöntemleri

3.2.6.1. Kemilüminesan Mikropartikül İmmünolojik Tetkik (CMIA)

Yöntemi ile Anti- HBs Ölçümü

Kemilüminesan immünoassay, immünolojide kullanılan biyokimyasal bir teknik olan standart enzim immunoassayinin (EIA) bir varyasyonudur. Kemilüminesan immünoassay yöntemi ile antijen antikor kompleksinin oluşumuna bağlı olarak gerçekleşen, kimyasal reaksiyon sonucu meydana gelen ışığın ölçümü değerlendirilmektedir.

Çalışmamızda Hepatit B yüzey antijeni antikorunun (Anti-HBs) kantitatif tayini amaçlı kemilüminesan mikropartikül immünolojik tetkik olan Anti-HBs tetkiki kullanılarak ölçümler yapılmıştır (ARCHITECT Anti-BHs Reagent Kit 7C18).

Anti-HBs tetkikleri genellikle Hepatit B aşısının koruyuculuğunu takip etmede kullanılmaktadır. Anti-HBs varlığı farelerden alınan kandan elde edilen serum örnekleri üzerinden tayin edilmiştir.

Anti-HBs tetkiki CMIA teknolojisini kullanan iki adımlı bir immünolojik tetkiktir. İlk adımda numune ve rekombinant HBsAg (rHBsAg) kaplı paramanyetik mikropartiküller birleştirilir. Böylece serum numunelerinde bulunan Anti-HBs, rHBsAg mikropartiküllerine bağlanmış olur. Kit içerisinde mevcut yıkama tamponuyla akridinyum işaretli rHBsAg konjugatı ikinci adım olarak eklenir. Bir sonraki yıkama döngüsünün ardından reaksiyon karışımına Pre-trigger ve Trigger çözeltileri ilave edilir ve ortaya çıkan kemilüminesan reaksiyon, bağıl ışık birimleri (RLUs-) olarak ölçülür.

3.3. İstatiksel Analiz

Çalışmada verilerin analizi yapılırken Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Windows 10.0 istatistik programı kullanıldı. Çalışma verileri ortanca (min-maks) şeklinde özetlendi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Gruplar arasında ilgili değişkenler açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık olup-olmadığı parametrik olmayan yaklaşımlardan Kruskal-Wallis H testi ile incelendi. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık çıkan durumlarda grupların ikili karşılaştırmaları Conover testi ile gerçekleştirildi. $p < 0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi. Analizlerde İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişim Anabilim Dalı tarafından geliştirilen KruskalWallis yazılımı kullanılmıştır (86, 87).

4. BULGULAR

Bu çalışmada;

- Karaciğerin makroskopik bulguları,
- Kullanılan farelerin canlı ağırlığı ve karaciğer ağırlığı,
- Histopatolojik bulgular,
- Biyokimyasal bulgular,
- İmmünolojik bulgular değerlendirilmiştir.

4.1. Karaciğerin Makroskopik Bulguları

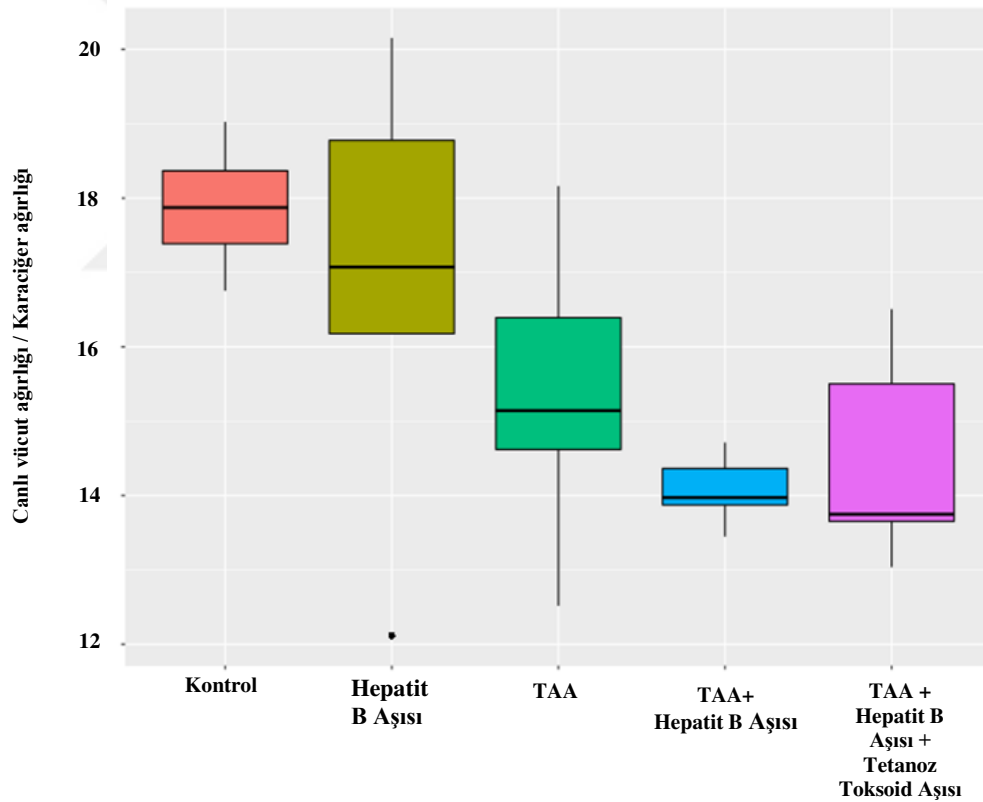
Deney sonunda kurban edilen farelerin karaciğer dokularında meydana gelen hasar ilk olarak makroskopik açıdan incelenmiştir. Kontrol grubundaki sağlıklı farelere ait karaciğer dokularının yüzeyleri parlak ve düzgün, renkleri kahverengi-kırmızı renkli, yapısı ise esnek ve yumuşak olarak gözlemlendi. TAA uygulaması ile oluşturulan fibrozis modelindeki farelere ait karaciğer dokularının ise yüzeyleri mat ve pürüzlü, renkleri kahverengi, yapısı ise sert olarak gözlemlendi. Fibrozis grubundaki fare karaciğer dokularının kontrol grubundaki fare karaciğer dokularına kıyasla yüzey, renk ve yapılarının bozulduğu makroskopik olarak saptandı.

4.2. Deneklerin Canlı Ağırlığı ve Karaciğer Ağırlığı Bulguları

TAA ile oluşturulan fibrozis grubu, TAA + Hepatit B aşısı grubu, TAA + Hepatit B aşısı + Tetavax grubu kontrol grubuna göre fare canlı ağırlığı/karaciğer ağırlığı oranında belirgin bir azalma gözlemlenirken, hepatit B aşısı yapılan aşısı grubuna ait farelerde bu oranda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Tablo 4.1. Kontrol grubu, Hepatit B aşısı grubu, TAA grubu, TAA + Hepatit B aşısı grubu, TAA + Hepatit B aşısı + Tetanoz Toksoid gruplarında yer alan farelerin canlı vücut ağırlığı / karaciğer ağırlığı bulguları

Değişken	Gruplar					p
	Kontrol	Hepatit B Aşısı	TAA	TAA + Hepatit B Aşısı	TAA + Hepatit B Aşısı + Tetanoz Toksoid	
Canlı vücut ağırlığı / karaciğer ağırlığı (Medyan (min-maks))	17,87 ^{b,c,d} (16,755-19,025)	17,072 ^{c,d}	15,143	13,973	13,749	0,021
a: Hepatit B' ye göre farklıdır, b: TAA' ya göre farklıdır, c: TAA + Hepatit B' ye göre farklıdır, d: TAA+ Hepatit B + Tetanoz Toksoid' e göre farklıdır.						



Şekil 4.1. Grupların canlı vücut ağırlığı / karaciğer ağırlığı oranının karşılaştırmaları

4.3. Histopatolojik Bulgular

Karaciğer dokularından hazırlanan kesitlerdeki histolojik değerlendirme, fibroz oluşumu ve inflamasyon düzeyi hemotoksilen eozin boyama ile belirlendi. Gomori'nin

trikrom boyama yöntemi ile fibroz oluşumuyla beraber bağ ve destek dokusunun oluşumu belirlenirken; PAS boyama ile karaciğerde glikojen depolanma durumu belirlenmiştir.

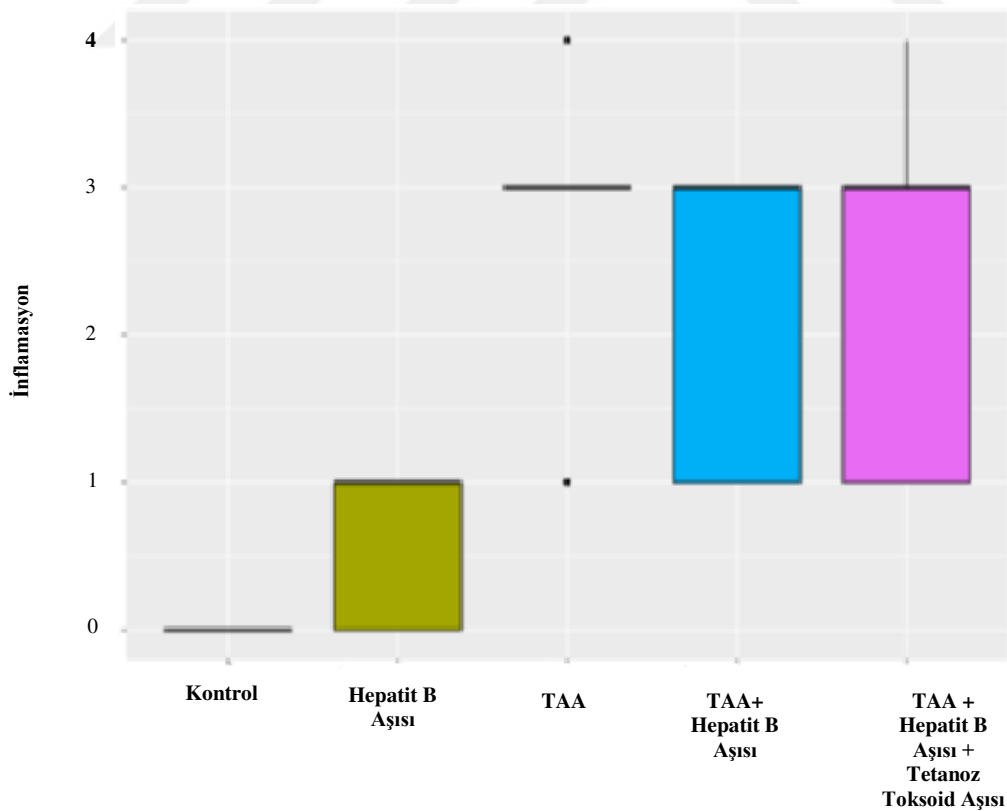
Hematoksilen-eozin ile boyanan karaciğer kesitleri için inflamasyon, erezyon nekroz, intralobular dejenerasyon ve fokal nekroz, fibroz parametreleri Knodell skorum sistemi kullanılarak skorlandı. Kontrol grubu karaciğer kesitleri normal histolojik yapıda değerlendirildi. Knodell Skoru: 0 puan olarak değerlendirildi. Kontrol grubu trikrom boyamada portal alanlarda olağan yapıda bağ dokusu gözlemlendi. PAS boyanan kesitlerde diffüz görünümde orta ve yer yer kuvvetli PAS+ boyanma saptandı. Hepatit B grubuna ait karaciğer kesitlerinde nadir olarak minimal düzeyde inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlemlendi. Trikrom boyaması yapılmış olan kesitlerde bağ dokusu alanlar normal histolojik yapıda değerlendirildi. PAS boyanan kesitlerde diffüz görünümde orta derecede PAS+ boyanma saptandı. TAA, TAA + Hepatit B aşısı ve TAA + Hepatit B aşısı + Tetanoz Toksoid gruplarına ait kesitlerde yaygın olarak inflamatuvar hücre infiltrasyonu saptandı. Karaciğer parankim alanlarında hepatositlerde şişme, hidropik dejenerasyon ve fokal nekroz alanları görüldü. Ayrıca kesitlerde perilobüller ve portal alanlardaki bağ dokusu artışı izlendi. Bazı alanlarda kordonlar şeklinde hepatosit nekrozu izlendi. Nekrotik alanlarda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fibrotik bağ dokusu oluşumu dikkati çekti. Ayrıca bu hepatosit nekroz alanlarının köprüleşmeler şeklinde birden fazla karaciğer lobülleri arasında uzandığı görüldü. Bu grupların histopatolojik değerlendirmesi sonucu elde edilen Knodell skorları TAA grubu: 14, TAA + Hepatit B aşısı grubu: 8 ve TAA + Hepatit B + Tetanoz Toksoid grubu: 11 puan olarak hesaplanmıştır.

TAA, TAA + Hepatit B aşısı grubu ve TAA + Hepatit B aşısı + Tetanoz Toksoid gruplarına ait trikrom boyamasında bağ dokusunda artış ve bazı nekroz alanlarında farklı derecelerde fibrozis saptandı. Her üç gruba ait PAS boyanmış kesitlerde PAS pozitifliğinin kontrol ve Hepatit B aşısı gruplarındakilerden daha düşük düzeyde olduğu görüldü.

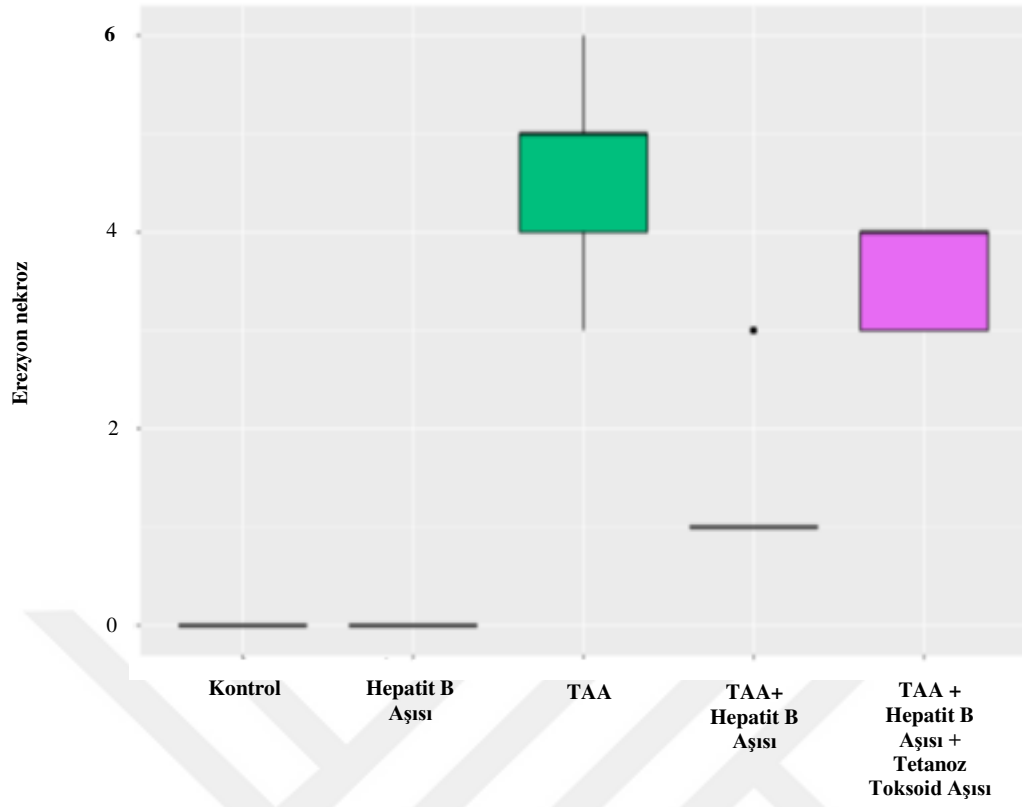
Tablo 4.2. Kontrol grubu, Hepatit B aşı grubu, TAA grubu, TAA + Hepatit B aşı grubu, TAA + Hepatit B aşısı + Tetanoz Toksoid gruplarında yer alan örneklerle ait karaciğer dokularının histopatolojik değerlendirmeleri

Değişken	Gruplar					p
	Kontrol	Hepatit B Aşısı	TAA	TAA + Hepatit B Aşısı	TAA + Hepatit B Aşısı + Tetanoz Toksoid Aşısı	
İnflamasyon (Ortanca (min-max))	0 (0-0) ^{b,c,d}	1 (0-1) ^{b,c,d}	3 (1-4)	3 (1-3)	3 (1-4)	<0,001
Erezyon Nekroz (Ortanca (min-max))	0 (0-0) ^{b,c,d}	0 (0-0) ^{b,c,d}	5 (3-6) ^{c,d}	1 (1-3) ^d	4 (3-4)	<0,001
Lobular Dejenerasyon ve Fokal Nekroz (Ortanca (min-max))	0 (0-0) ^{b,c,d}	0 (0-1) ^{b,c,d}	3 (1-4) ^{c,d}	1 (0-1)	1 (1-1)	<0,001
Fibroz (Ortanca (min-max))	0 (0-0) ^{b,c,d}	0 (0-0) ^{b,c,d}	3 (1-3)	3 (1-3)	3 (1-3)	<0,001
Toplam (Ortanca (min-max))	0 (0-0)	1 (0-2)	14 (7-15)	8 (3-10)	11 (6-12)	<0,001

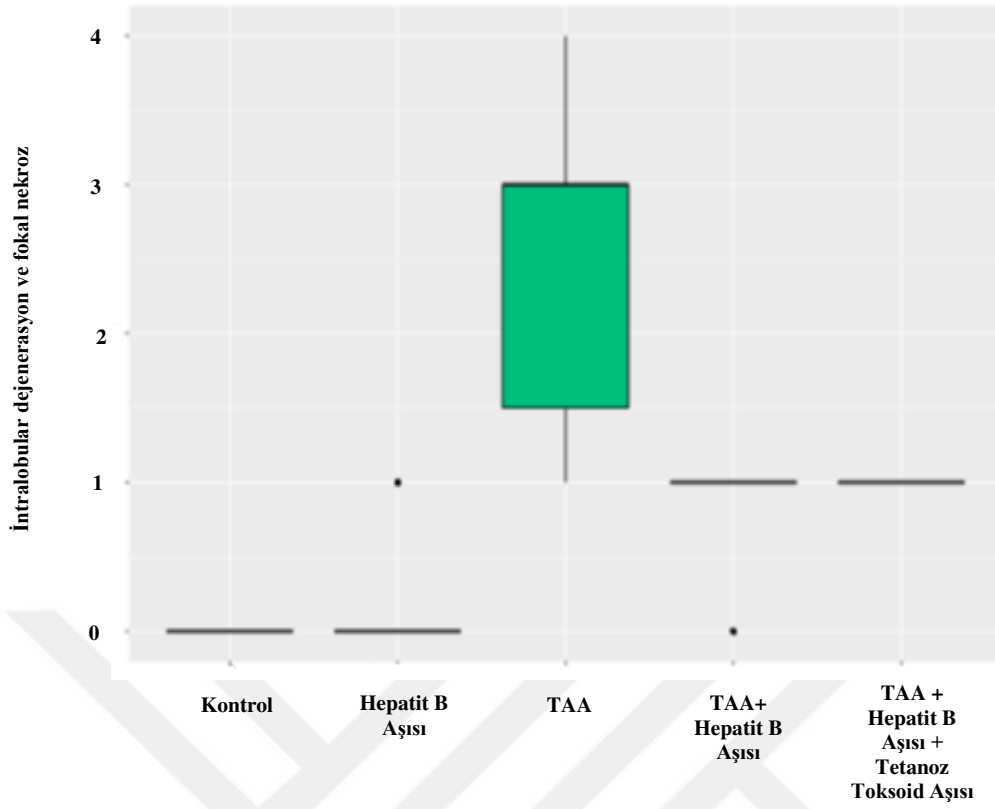
a: Hepatit B' ye göre farklıdır, b: TAA' ya göre farklıdır, c: TAA + Hepatit B' ye göre farklıdır, d: TAA+ Hepatit B + Tetanoz Toksoid' e göre farklıdır.



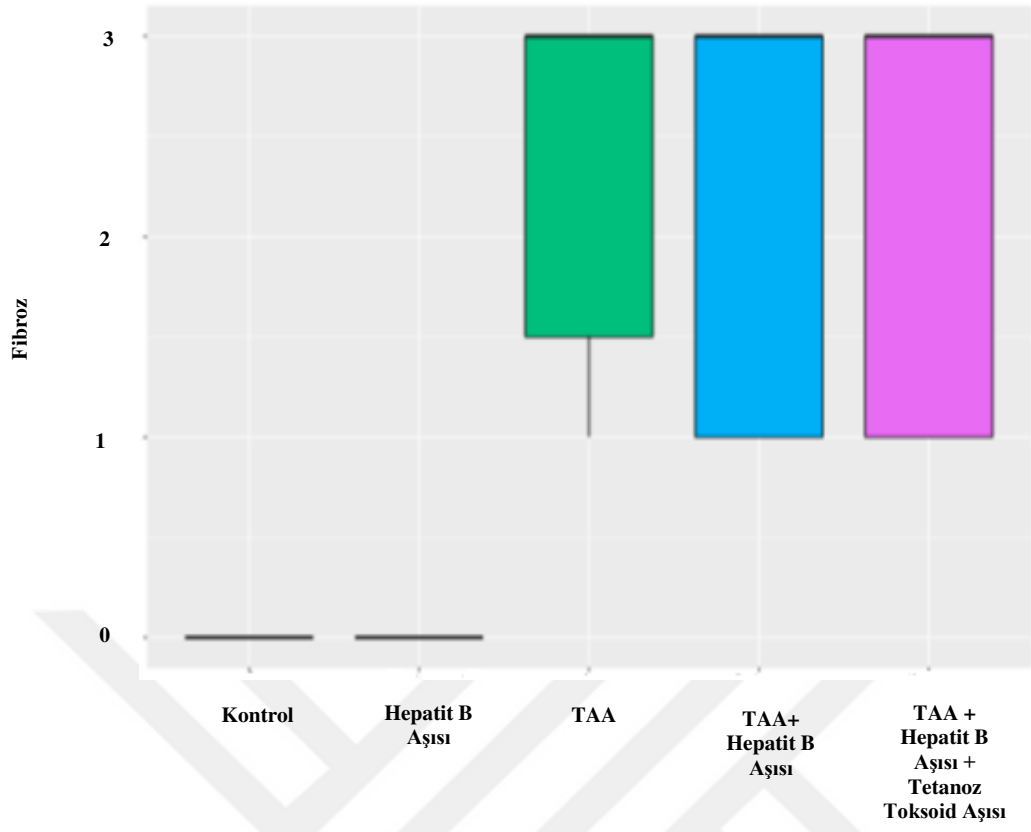
Şekil 4.2. Gruplara göre inflamasyon parametresinin histopatolojik karşılaştırmaları



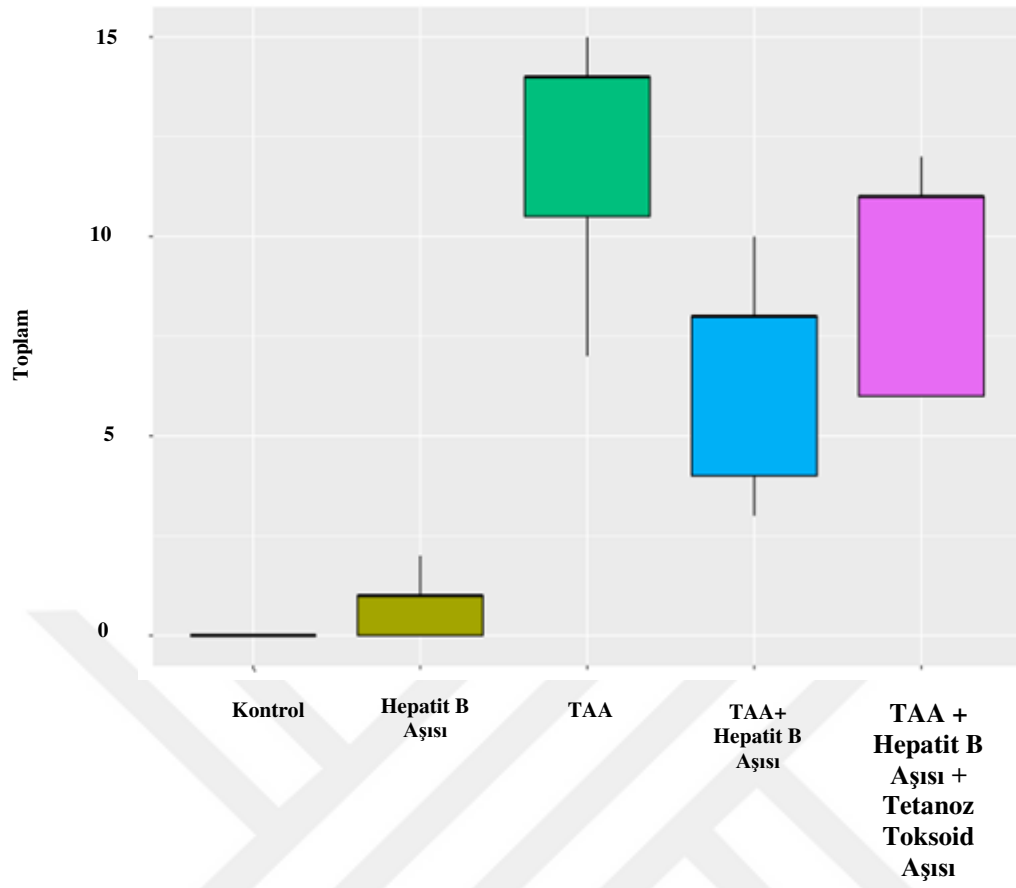
Şekil 4.3. Gruplara göre erezyon nekroz parametresinin histopatolojik karşılaştırmaları



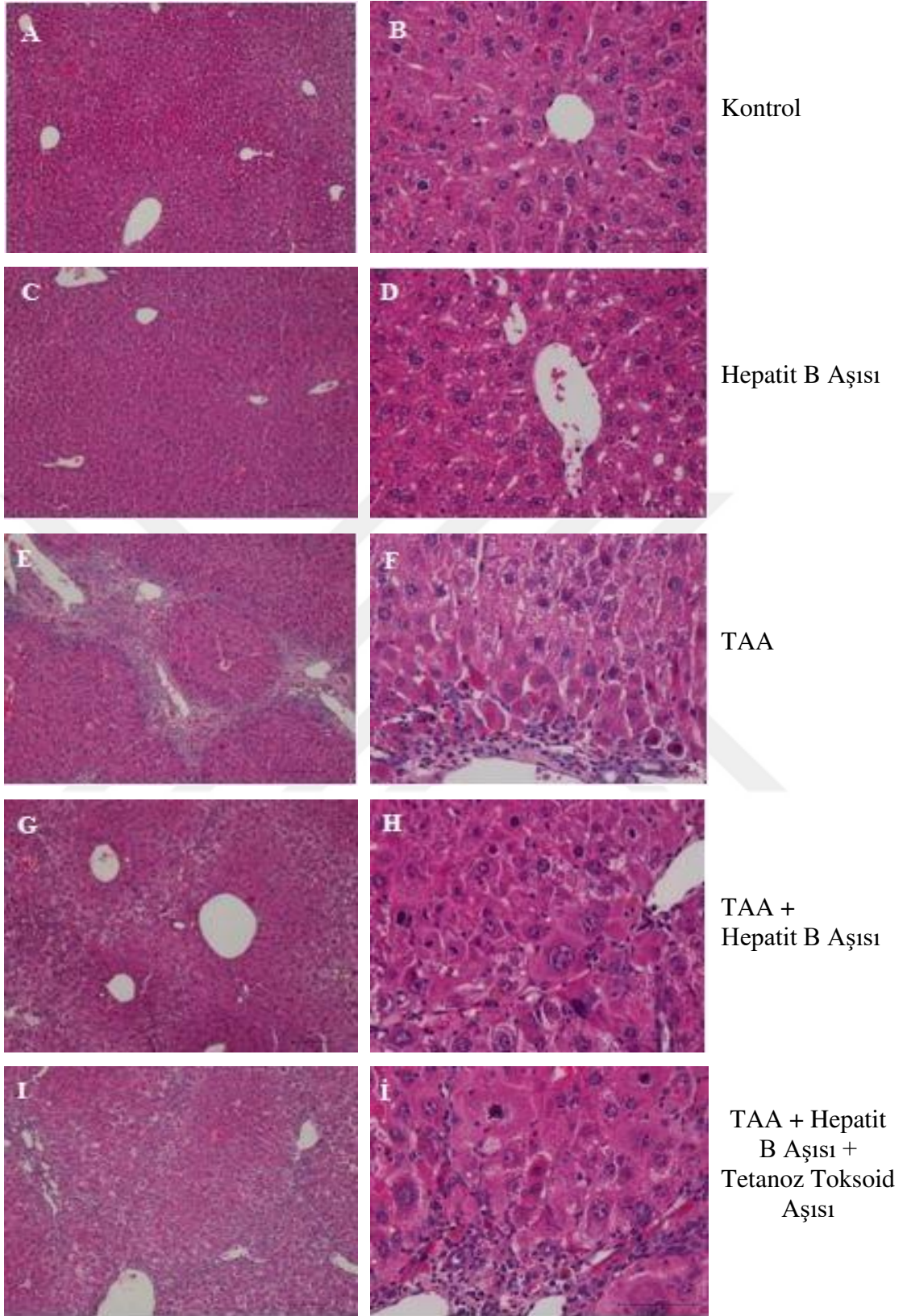
Şekil 4.4. Gruplara göre intralobular dejenerasyon ve fokal nekroz parametresinin histopatolojik karşılaştırmaları



Şekil 4.5. Gruplara göre fibroz parametresinin histopatolojik karşılaştırmaları

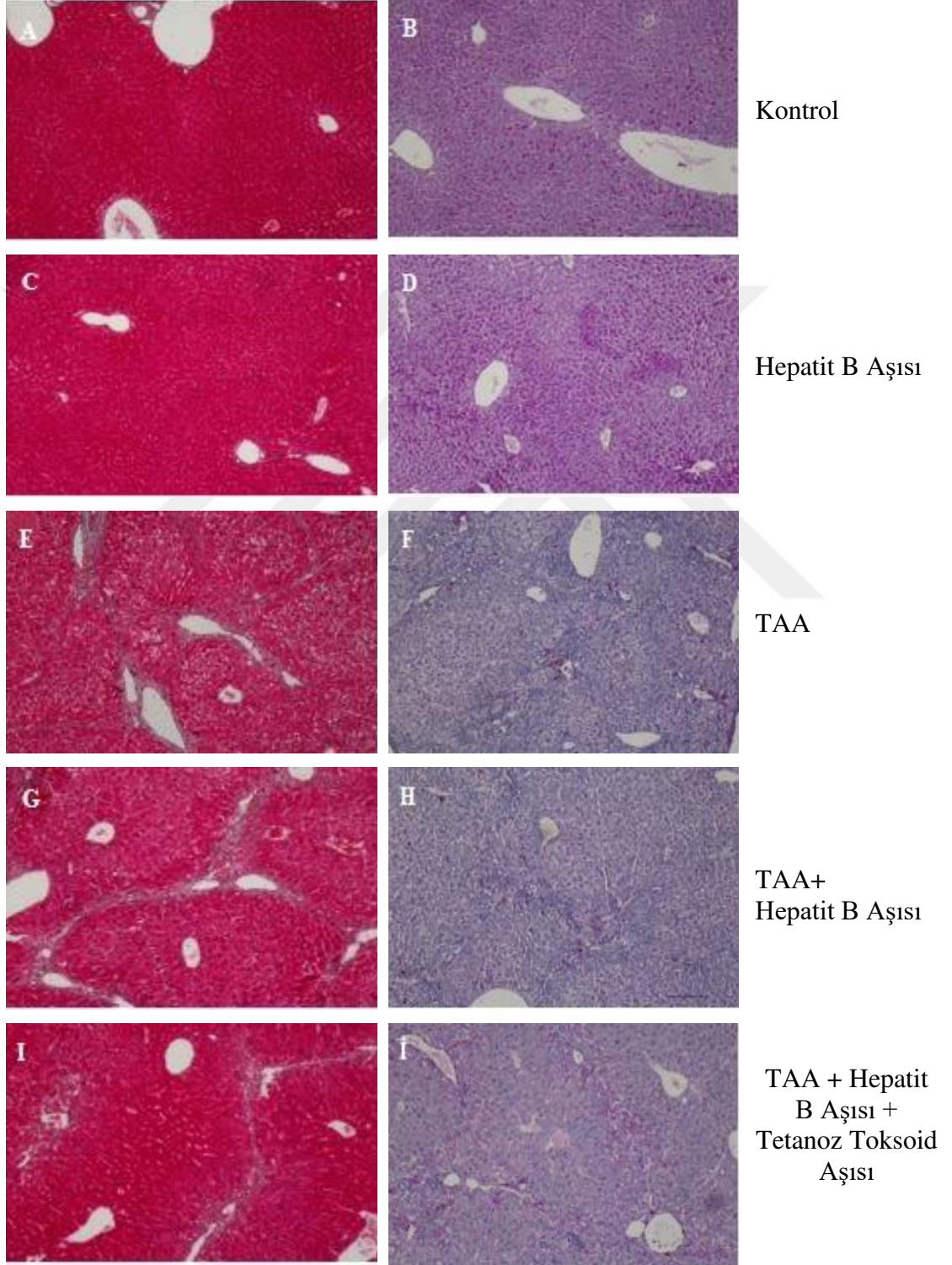


Şekil 4.6. Grupların histopatolojik karşılaştırmaları



Şekil 4.7. Karaciğer dokusunda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fibrotik bağ doku oluşumunun H&E boyama ile elde edilen histolojik görüntüleri.

A, C, E, G, I görüntüleri 10x objektif büyütmelerini; B, D, F, H, İ görüntüleri 40x objektif büyütmelerini göstermektedir. Kontrol grubu (A, B); Hepatit B aşısı grubu (C, D); TAA grubu (E,F); TAA + Hepatit B aşısı grubu (G,H); TAA + Hepatit B Aşısı + Tetanoz Toksoid Aşısı grubu (I,İ) olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Karaciğer dokusunda trikrom ve PAS boyama analizleri.

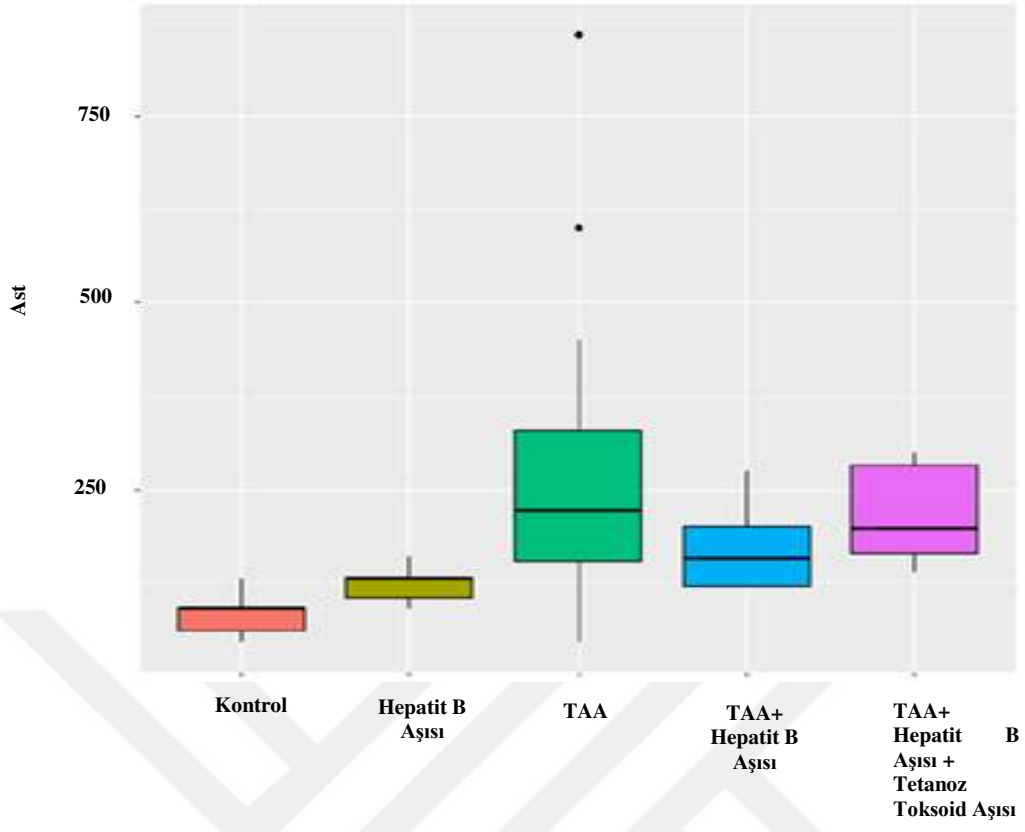
Karaciğer dokusunda fibrotik bağ doku ve destek doku oluşumu ile fibroz oluşumunun trikrom boyama ile elde edilen histolojik görüntüleri. A, C, E, G, I görüntüleri trikrom boyama ile 10x objektif büyütmelerini göstermektedir. B, D, F, H, İ görüntüleri karaciğer hücrelerinde depo edilen glikojen depolanma durumunu PAS boyama ile 10x objektif büyütmelerini göstermektedir. Kontrol grubu (A, B); Hepatit B aşısı grubu (C, D); TAA grubu (E,F); TAA + Hepatit B aşısı grubu (G, H); TAA + Hepatit B Aşısı + Tetanoz Toksoid Aşısı grubu (I, İ) olarak gösterilmiştir.

4.4. Biyokimyasal Bulgular

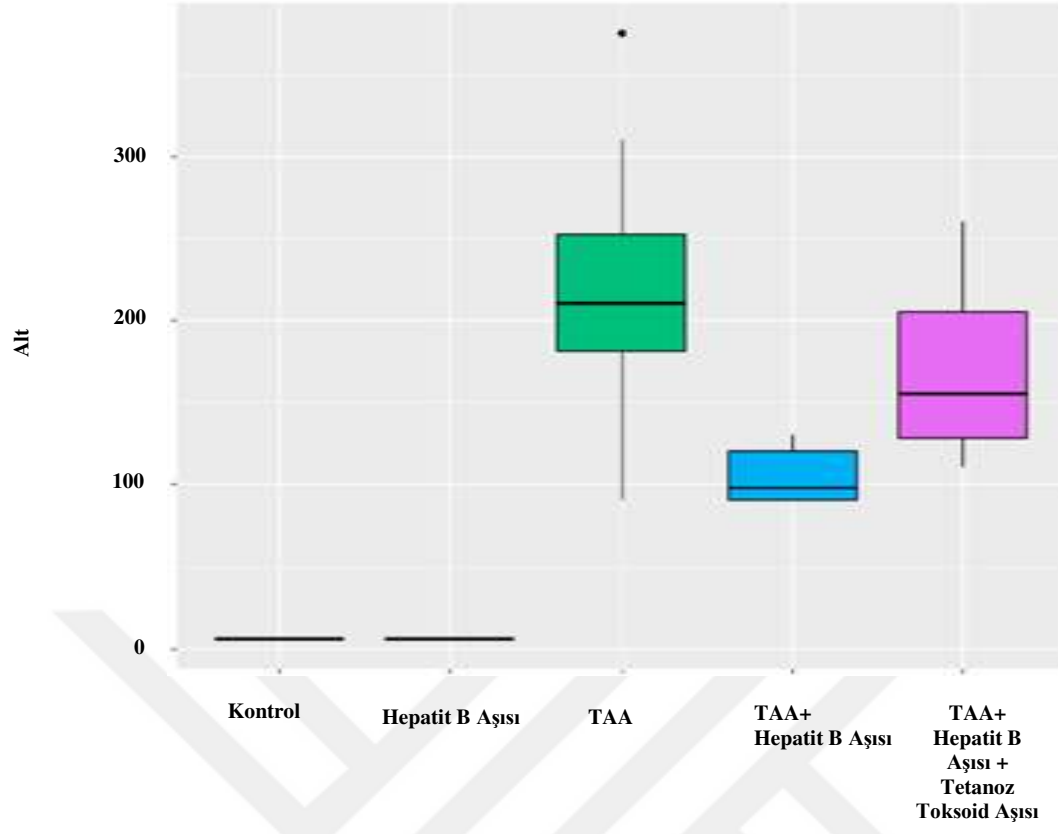
Mevcut çalışmamızda düzenli olarak TAA uygulaması ile oluşturulan hasarı sonrası gelişen karaciğer fibrozisinde; karaciğer fonksiyon enzimlerinin (AST, ALT, AP) serum konsantrasyonlarında belirgin düzeyde artış gözlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla serum seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olduğu TAA + Hepatit B aşısı grubu ve TAA + Hepatit B aşısı + Tetanoz Toksoid grubunda da artışların olduğu görülmüştür.

Tablo 4.3. Kontrol grubu, Hepatit B aşısı grubu, TAA grubu, TAA + Hepatit B aşısı grubu, TAA + Hepatit B aşısı + Tetanoz Toksoid gruplarında yer alan örneklerle ait biyokimyasal bulgular

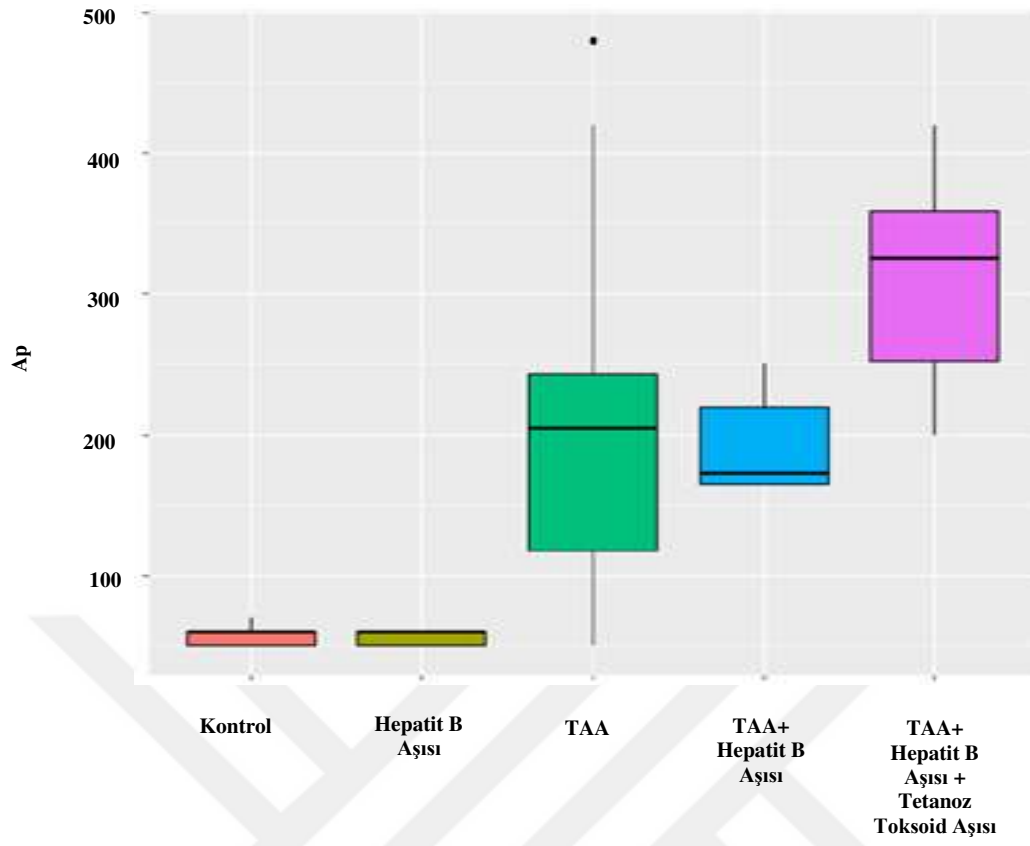
Değişkenler	Kontrol	Hepatit B aşısı	TAA	TAA + Hepatit B Aşısı	TAA + Hepatit B Aşısı + Tetanoz Toksoid Aşısı	p-değeri
AST (Ortanca (IQR))	90 ^{b,c,d} (30)	130 ^{b,d} (25)	222.5 (176.25)	157.5 (80)	197.5 (118.75)	0.0004
ALT (Ortanca (IQR))	6 ^{b,c,d} (0)	6 ^{b,c,d} (0)	210 ^c (71.25)	97.5 ^d (30)	155 (77.5)	<0.001
AP (Ortanca (IQR))	60 ^{b,c,d} (10)	60 ^{b,c,d} (10)	205 ^d (125)	172.5 ^d (55)	325 (107.5)	<0.001
a: Hepatit B' ye göre farklıdır, b: TAA' ya göre farklıdır, c: TAA + Hepatit B' ye göre farklıdır, d: TAA+ Hepatit B + Tetanoz Toksoid' e göre farklıdır.						



Şekil 4.9. Gruplara göre serum AST ölçümlerinin karşılaştırmaları



Şekil 4.10. Gruplara göre serum ALT ölçümlerinin karşılaştırmaları



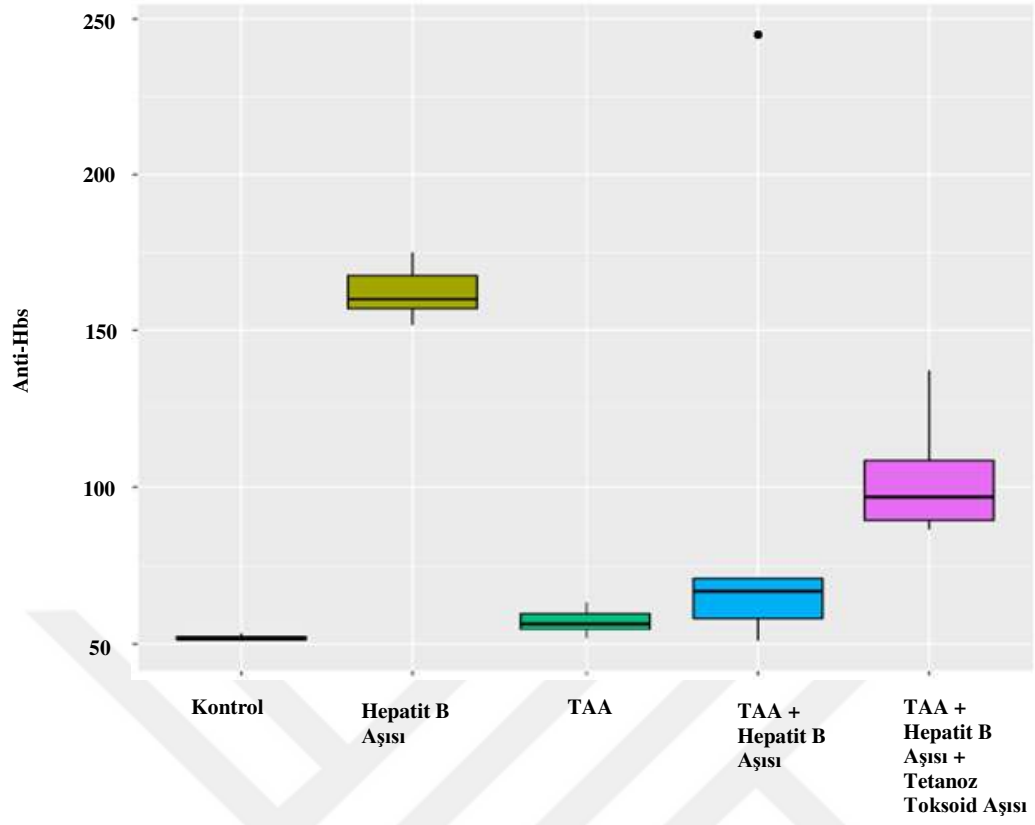
Şekil 4.11. Gruplara göre serum AP ölçümlerinin karşılaştırmaları

4.5. İmmünolojik Bulgular

Mevcut çalışmamızda karaciğer fibrozu esnasında uygulanan Hepatit B aşısının etkinliği ve bu aşıya karşı gelişen immün yanıtı arttırmak için kullanılan tetavax toksoidi uygulaması sonrası Anti-HBs düzeyleri araştırılmıştır. Sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece Hepatit aşısı uygulanan grubun Anti-HBs düzeyi belirgin olarak artış göstermiştir. Buna göre uygulanan hepatit aşısına karşı gelişen antikor yanıtı, sağlıklı fareler üzerinde başarılı bir immünizasyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Fibroz oluşturulmuş hepatit aşısı uygulanan grup ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında TAA+ Hepatit B grubunda düşük seviyede olmasına rağmen humoral immün yanıt gelişimi görülmüştür. Hepatit B aşısı uygulanan grupla karşılaştırıldığında fibroz oluşturulup hepatit aşısı uygulanmış grubun Anti-HBs düzeyi arasında belirgin bir azalma olduğu saptanmıştır. Tetavax uygulanan TAA + Hepatit B + Tetanoz toksoid grubu TAA + Hepatit B aşı grubuyla kıyaslandığında Anti-HBs düzeylerinde belirgin düzeyde artış görülmüştür.

Tablo 4.4. Kontrol grubu, Hepatit B aşı grubu, TAA grubu, TAA + Hepatit B aşı grubu, TAA + Hepatit B aşısı + Tetanoz Toksoid gruplarında yer alan örneklerle ait immünolojik bulgular

	Kontrol	Hepatit B aşısı	TAA	TAA + Hepatit B Aşısı	TAA + Hepatit B Aşısı + Tetanoz Toksoid Aşısı	P
Değişkenler						
AntiHBs (Ortanca (IQR))	1.6 ^{a,b,c,d} (0.9)	110 ^{b,c,d} (10.5)	6.55 ^{c,d} (5.04)	16.95 ^d (12.64)	46.55 (19.54)	<0.001
a: Hepatit B' ye göre farklıdır, b: TAA' ya göre farklıdır, c: TAA + Hepatit B' ye göre farklıdır, d: TAA+ Hepatit B + Tetanoz Toksoid' e göre farklıdır.						



Şekil 4.12. Gruplara göre Anti-HBs ölçümlerinin karşılaştırmaları

5. TARTIŞMA

Karaciğer fibrozu kronik karaciğer hasarlı hastaların neredeyse tamamında ortaya çıkabilen geri çözülebilir yara iyileşme yanıtı olup tedavi edilmediği takdirde hepatik fibroz, nodül oluşumu ile ilişkili olarak fibrozun son aşaması olan siroza ilerleyebilmektedir (88). Sirozu takiben karaciğer yetmezliği, portal hipertansiyon, hepatoselüler karsinoma (HCC) gibi daha ağır sonuçlara yol açabilir. Hepatoselüler karsinomaya ilerleyişi önlemek adına hepatik fibrozu durdurmak veya geri döndürmek önemli bir adım olabilir. Günümüze kadar tanı ve tedavide önemli gelişmeler olmasına rağmen, karaciğer fibrozunu geri döndürmek için etkili bir tedavi belirlenmemiştir ancak daha etkili antifibrotik ilaçların geliştirilmesiyle çözülmeyi bekleyen bir konu olarak hala üzerinde çalışmalar sürdürülmektedir (89). Son yıllarda karaciğer yaralanması, inflamasyonu ve fibrozun moleküler mekanizmasını anlamak üzere sitokinlerin ve kan hücrelerinin etkileşimini kapsayan çalışmalara odaklanılmıştır (3). İnflamasyon konak savunmasında etkili bir süreç olup mikrobiyal invazyon ve doku yaralanması sırasında gelişen önemli bir yanıttır. İnflamasyon lökosit aktivasyonu ve bölgeye spesifik lökosit göçünün gerçekleşmesi ile karakterize edilir. İnflamatuar yanıtın çözülmesi doku yaralanmasının sınırlandırılması ve kronik inflamasyonun gelişimini azaltan homeostasisin tekrar kurulması için gereklidir (90). Bilindiği üzere karaciğer fibrozu da temelde kronik inflamasyonun bir sonucu olarak gelişir. Bu yüzden inflamasyonu çözmek, karaciğer fibrozunun ortaya çıkışını ve gelişimini inhibe etme konusunda önemlidir (89).

Vücudumuzda immün sistem uyarımı ve işleyişi farklı etmenler tarafından yönlendirilebilmektedir. Herhangi bir organımızda meydana gelen hasar sonrası immün sistemin işleyişi değişmekte olup immün yanıtın yeterli düzeyde gelişmediği bilinmektedir oluşan rahatsızlık halinde kronik böbrek rahatsızlığı olan bireylerin immünizasyonunda yaşanan sıkıntılar, kronik karaciğer hastalığı olan bireylerin HBV immünizasyonuna zayıf immün yanıt göstermeleri ve böyle bireylerde immün yanıt gelişiminin yeterli düzeyde gerçekleşmediği bilinmektedir (7, 91). Ancak fetal dönemde immün sistem hücrelerinin gelişiminden sorumlu olan karaciğerde hasarın immün yanıt üzerindeki etkisi ayrıntılı olarak bilinmemektedir. Kronik karaciğer hastalığına sahip insanlar hastalık etmenlerine karşı daha savunmasızdırlar. Böyle bireylerde enfeksiyonun etkin bir şekilde kontrolünü sağlamak ve viral bulaşı engellemek üzere aşılama yapılmaktadır (67). Sağlıklı bireylerde olduğu gibi kronik karaciğer rahatsızlığı olan

bireylerin de immünizasyonunda sıkıntı olabilir. Karaciğer fibrozunda oluşan hasarın immün yanıt gelişimi üzerine etkisi ayrıntılı olarak bilinmemekle beraber siroz gibi ileri düzey karaciğer hasarı olan bireylerde immünizasyon etkinliğinde sıkıntı olduğu görülmüştür (7). Sirozun başlangıcı olan fibroz döneminde bu yönde bir literatür bilgisi bulunmamaktadır.

Araştırmamızda karaciğer fonksiyon bozukluğu olan deneklerde immünizasyonun etkinliği TAA ile uyarılan fareler üzerinde araştırılmıştır. TAA, karaciğer fibrozunun altta yatan mekanizmasını anlayabilmek için deney hayvanlarında fibroz modeli oluşturmada sıkça kullanılan kimyasaldır. TAA ile deney hayvanlarında oluşturulan karaciğer fibrozu ile insanlarda görülen karaciğer fibrozu arasında benzer patolojik bulgular saptanmaktadır (92). TAA ile oluşturulan fibroz modeli diğer kimyasallarla oluşturulan modellere kıyasla daha fazla geçerliliği ve kolay uygulanabilir olduğundan tercih edilmektedir. Böylece çalışmamızda uygulamış olduğumuz TAA ile uyarılmış fibroz modeli etik ve de bilimsel anlamda uygun olması elde ettiğimiz sonuçların kıymetli olduğunu göstermektedir. Sağlıklı kontrol grubunda, hepatit B aşısı grubunda, TAA uygulaması ile oluşturulan fibroz grubunda, fibroz grubuna ek olarak TAA + Hepatit B aşısı uygulanmış fibrozlu aşısı grubunda ve TAA + Hepatit B aşısı + Tetanoz toksoidi uygulanmış toksoid grubunda karaciğer fonksiyonu hakkında bilgi veren AST, ALT, AP gibi biyokimyasal parametrelerin düzeyleri ölçülmüştür. Karaciğer enzimlerinden AST ve ALT hepatositlerde, iskelet kası ve kalp kasında sentezlenirken, AP safra kanalı ve barsak epitel hücrelerinde sentezlenir (93). Hücre içi enzim olan AST ve ALT hepatosellüler hasarı takiben kanda hepatosit yıkımının artması ile artan geçirgenlik sonucu hücre zarı dışına çıkarlar ve serum seviyelerinde artış görülür (94). Normalde bu enzimler serumda düşük seviyededirler (95). Karaciğerde meydana gelen hasar bu enzimlerin serum seviyelerindeki değişiklikler ile tespit edilebilmektedir (90). Çalışmamızda AST, ALT, AP değerlerinde; TAA uygulanan grupta, TAA + Hepatit B aşısı uygulanan grupta ve TAA + Hepatit B aşısı + Tetanoz toksoidi uygulanan grupta sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel verilerde anlamlı oranda artış tespit edilmiştir ($p<0,05$). Elde ettiğimiz bu veriler ışığında düzenli olarak TAA uygulaması ile karaciğerde hasarın oluşması ve meydana gelen hasar sonrası karaciğer fonksiyon enzimlerinin (AST, ALT, AP) serum konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak başarılı bir şekilde karaciğer fibrozunun oluşturulduğu düşünülmektedir. TAA ile oluşturulan fibroz grubuna uygulanan hepatit B aşısı karaciğer fonksiyon enzimleri üzerinde belirgin

düşüş göstermiştir. TAA + Hepatit B aşısı + Tetanoz toksoid uygulaması yapılan grupta ise karaciğer fonksiyon enzimlerinde anlamlı artış görülmüştür.

Daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir ki; TAA ile oluşturulan fibrozis modelindeki farelerin vücut ağırlıklarında azalma meydana gelirken; kollajen ve ESM birikimi sonucunda fare karaciğer ağırlıklarında bir artış meydana geldiği görülmektedir (91, 96). Mevcut çalışmamızda ise; deney sonuna kadar tartımları yapılan farelerin vücut ağırlık ortalamasının karaciğer ağırlığına oranı analizine göre; karaciğer fibrozu oluşturduğumuz farelerde kontrol grubuna göre canlı vücut ağırlığı / karaciğer ağırlığı oranında belirgin düzeyde azalma görülürken, TAA + Hepatit B aşısı uygulanan grupta ve TAA + Hepatit B aşısı + Tetanoz toksoidi uygulanan diğer gruplarda da görülen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Araştırmamızda karaciğer dokusu histolojik olarak incelendiğinde TAA uygulamasının inflamasyon, erezyonal nekroz, lobular dejenerasyon ve fokal nekroz, fibroz oluşumuna neden olduğu görülmektedir. Deney gruplarımızdan TAA uyguladığımız; TAA grubu, TAA + Hepatit B aşısı grubu ve TAA + Hepatit B aşısı + Tetanoz toksoidi uygulanan her 3 guruba ait histolojik kesitlerde yaygın olarak inflamatuvar hücre infiltrasyonu görülmüştür. Bazı alanlarda kordonlar şeklinde hepatosit nekrozu izlenmekle birlikte nekrotik alanlarda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fibrotik bağ dokusu oluşumu dikkatleri çekmektedir. TAA + Hepatit B aşısı uygulamasının karaciğer fibrozunda nekrotik alanlarda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve dejenerasyona bağlı nekrotik alanların oluşumunu azalttığı ancak sağlıklı kontrol grubu düzeyine indirgediği saptanmıştır.

Karaciğer hastalığı olan bireylerde hastalık ilerledikçe, çoğu bağışıklamanın etkinliğini kaybettiği rapor edilmiştir (63). Kronik karaciğer hastalıklarında ve karaciğer transplant hastalarında da aşıya yanıt azalmaktadır ve kronik karaciğer hastalığı olan bireylerin HBV immünizasyonuna sağlıklı bireylere göre daha zayıf bir yanıt gösterdikleri bilinmektedir (97). Genel olarak, kronik karaciğer hastalığı olan bireylerde bağışıklama ihtiyaçlarının; immünizasyonun en etkili olduğu zaman diliminde ele almanın önemli oluşu bilinmektedir. Kronik karaciğer hastalığı olan bireylere uygulanan aşı yanıtlarında hepatit B aşısının daha yüksek yanıt vermeyen oranlara yol açtığı görülmüştür (63). Literatüre göre karaciğer hasarına sahip bireylerde aşıya yanıtı artırmanın yollarından biri olarak enjeksiyonun verilmiş yolu, çifte doz uygulaması, bir diğeri ise aşının adjuvan ile birlikte verilmesi olduğu görülmüştür.

Dhillion ve arkadaşları kronik karaciğer hastalığı olan bireylerde hepatit aşısının gerekli olduğunu ve belirgin sayıda bu aşıya yanıt vermeyen hasta olduğunu belirtmiştir. Zayıf immün yanıt veren bu bireylere i.m. hepatit aşısı uygulamasının sınırlı başarı sağladığı gösterilmiştir. Çalışmada i.m. hepatit aşısı uygulanan kronik karaciğer rahatsızlığı olan bireylere intradermal aşısı uygulaması yapılmış; intradermal hepatit aşısı uygulamasının etkili ve güvenilir olduğunu belirtmişlerdir (98).

Hepatit B aşısının sirozlu hastalarda immünojenisitesi, aşının iki doz uygulanmasıyla geliştirilirken, standart dozlar için yanıt oranları düşük gözlenmiştir (% 16-20). Michael ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada transplantasyon listesinde beklemede olan hastalara uygulanan iki doz aşısı uygulaması ile aşıya yanıt oranı %68 olarak belirlenmiş (63).

Sönmez ve arkadaşları HBsAg karşı antikor üretimini indükleyen ve yetişkinler için oldukça immünojenik bir aşısı olan S2SRHB aşısını (rekombinant DNA aşısı, Genhevac, Pasteur) bazı sağlıklı bireyler, diyaliz hastaları ve hamileler üzerinde uygulamışlardır. Çalışmaya dahil edilen bireyler önceden 3 defa S2SRHB aşısı uygulanmış ancak hala düşük seviyede anti-HBs antikor seviyelerine (anti-HBs < 10 IU/l) sahip HBV negatif bireylerdir. Sağlıklı bireyler grup I, diyaliz hastaları grup II ve hamileler grup III olarak gruplandırılmış ve bu üç grubu kendi arasında S2SRHB aşısı + tetanoz toksoidi uygulanan grup A ve sadece S2SRHB aşısı uygulanan grup B alt gruplarını oluşturup bu gruplardaki antikor düzeylerini araştırmışlardır. A grubundaki bireylere S2SRHB aşısı; i.m. olarak 20 µg birer ay aralıklarla üç doz şeklinde ve 1 ml tetanoz toksoidi uygulanmıştır. Gerçekleştirilen immünizasyon sonunda yanıt oranları; grup IA 60%, grup IIA 43%, grup IIIA 23% şeklinde iken grup IB 26.6%, grup IIB 20%, grup IIIB 9% şeklinde saptanmıştır. S2SRHB + tetanoz toksoidi ile uyarılan grupta 47% oranında, sadece S2SRHB aşısı uygulanan grupta 19% oranında yanıt olduğu saptanmıştır. S2SRHB aşısının tetanoz toksoidi ile beraber uygulanmasının tek başına S2SRHB aşısı uygulamasına göre daha etkin olduğu gösterilmiştir (7).

Kronik karaciğer hastalarında olduğu gibi (63) çalışmamızda da TAA uygulaması ile oluşturulan fibrozlu farelere uygulanan recombinant hepatit aşısı (Engerix B™) ile immünizasyonu gerçekleştirilen farelerdeki koruyucu Anti-HBs düzeyi sağlıklı kontrol grubuna göre düşük seviyede saptanmıştır. Deneklerimizde gelişen yetersiz immünizasyon girişimini takiben; tekrar eden immünizasyonların farelere zarar vereceği düşünülerek çalışmamıza TAA+ Hepatit B aşısı + Tetanoz toksoid grubu dahil edilmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİ

Günümüzde vücudumuzda meydana gelen bazı rahatsızlıklar (kronik böbrek yetmezliği, siroz gibi) sağlıklı immün yanıt gelişimini engellemektedir. Benzer sorun ile viral kaynaklı ve viral kaynaklı olmayan karaciğer rahatsızlıklarında da karşılaşılmaktadır.

Mevcut çalışma deneysel kronik karaciğer fibroz modeli üzerine kuruludur ve kronik karaciğer fibroz modeli TAA ile uyarılarak oluşturulmuştur. Fibroz döneminde uygulanan Hepatit B aşısının etkinliğinin ne düzeyde gerçekleştiğini ve gelişen zayıf özgül antikor yanıtının bir immün stimülatör olarak kullanılan tetanoz toksoidi ile artırılıp artırılamayacağı araştırılmıştır.

Çalışma sonunda elde edilen sonuçlar; gruplar arasında tespit edilebilir veya belirgin farklılıklar içeren karaciğer enzim değerlerinin varlığını biyokimyasal yöntemlerle, fibrotik karaciğerin deneysel modelini histopatolojik değerlendirme ile göstermiştir ve karaciğer fibrozu sırasında Hepatit B aşısına karşı gelişen zayıf özgül immün yanıtın tetanoz toksoidi ile arttırılabilir olduğu immünolojik yöntemlerle gösterilmiştir.

Kronik karaciğer hastalıklarında zayıf immün yanıt gelişimini arttırmak için ileri düzey çalışmaların yapılmasıyla bu sürecin daha iyi anlaşılmasını sağlayıp hastaların daha güçlü immün yanıt geliştirebilmeleri için çalışmaların yapılması önerilebilir.

KAYNAKLAR

1. Sánchez-Valle V, C Chavez-Tapia N, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Current medicinal chemistry*, 2012, 19(28), 4850-4860.
2. Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, Scholten D, Streetz K, Tacke F, Weiskirchen R. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis & tissue repair*, 2013, 6(1), 19.
3. Henderson NC, Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clinical Science*, 2007, 112(5), 265-280.
4. Duval F, Moreno-Cuevas JE, Gonzalez-Garza MT, Maldonado-Bernal C, Cruz-Vega DE. Liver fibrosis and mechanisms of the protective action of medicinal plants targeting inflammation and the immune response. *Int J Inflam* 2015.
5. Abbas A. *Lymphoid System and Organs Molecular and Cellular Immunology*. ve 2015.
6. Taşova Y. Kronik Karaciğer Hastalarında İmmünizasyon. *Türkiye Klinikleri Journal of Infectious Diseases Special Topics*, 2008, 1(1), 65-73.
7. Sönmez E, Sönmez AS, Bayindir Y, Coskun D, Aritürk S. Antihepatitis B response to hepatitis B vaccine administered simultaneously with tetanus toxoid in nonresponder individuals. *Vaccine*, 2002, 21(3-4), 243-246.
8. Dhillon S, Moore C, Li SD, Aziz A, Kakar A, Dosanjh A, Van Thiel DH. Efficacy of high-dose intra-dermal hepatitis B virus vaccine in previous vaccination non-responders with chronic liver disease. *Digestive diseases and sciences*, 2012, 57(1), 215-220.
9. Gönültaş E. Karaciğer sirozunda safra kesesi taşı sıklığı. Yüksek lisans yeterlik tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Van, 2014.
10. Guyton AC, J.E. Hall Textbook of Medical Physiology. 11. Basım ed2007.

11. Özgüven M. Karaciğer hastalığı yönünden normal'ler ile kronik karaciğer parenkimal hastalıklarında kantitatif dinamik karaciğer perfüzyon sintigrafisi. Uzmanlık Tezi, Diyarbakır, 1987.
12. Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mechanisms of development*, 2003, 120(1), 117-130.
13. Jenne C.N, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nature immunology*, 2013, 14(10), 996.
14. Duval F, Moreno-Cuevas JE, González-Garza MT, Rodríguez-Montalvo C, Cruz-Vega DE. Liver fibrosis and protection mechanisms action of medicinal plants targeting apoptosis of hepatocytes and hepatic stellate cells. *Advances in pharmacological sciences*, 2014.
15. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews*, 2008, 88(1), 125-172.
16. Hernandez-Gea V, Friedman S.L. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual review of pathology: mechanisms of disease*, 2011, 6: 425-456.
17. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 2005, 115(2), 209-218.
18. Wang BB, Cheng JY, Gao HH, Zhang Y, Chen ZN, Bian H. Hepatic Stellate Cells in Inflammation-Fibrosis-Carcinoma Axis. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 2010, 293(9), 1492-1496.
19. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis Scott L. Friedman Division of Liver Diseases, Mount Sinai School of Medicine, New York.
20. Gene Profile of Chemokines on Hepatic Stellate Cells of Schistosome-Infected Mice and Antifibrotic Roles of CXCL9/10 on Liver Non-Parenchymal Cells Yue-jin Liang¹, Jie Luo, Qiao Lu, Ying Zhou, Hai-wei Wu, Dan Zheng, Yong-ya Ren, Ke-yi Sun, Yong Wang, Zhao.
21. Establishment of an early liver fibrosis model by the hydrodynamics-based transfer of TGF- β 1 gene Kun-Lin Yang, Kuo-Chen Hung, Wen-Teng Chang and Eric IC Li.

22. Liver Sinusoidal Endothelial Cells Karen Kristine Sørensen, Jaione Simon-Santamaria, Robert S. McCuskey, and Bård Smedsrød.
23. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver International*, 2006, 26(10), 1175-1186.
24. Wu J, Zern MA. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *J gastroenterol* 2000, 35(9), 665-672.
25. Ahmad A, Ahmad R. Understanding the mechanism of hepatic fibrosis and potential therapeutic approaches. *Saudi J Gastroenterol* 2012, May-Jun, 18(3):155-67.
26. Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, Scholten D, Streetz K, Tacke F, Tolba R, Trautwein C, Trebicka J, Weiskirchen R. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis tissurepair* 2013, 6 (1).
27. de Torres M, Poynard T. Risk factors for liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Ann Hepatol* 2003 Jan-Mar, 2 (1): 5-11.
28. Palacios RS, Roderfeld M, Hemmann S, Rath T, Atanasova S, Tschuschner A, Roeb E. Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Laboratory investigation*, 2008, 88(11), 1192.
29. Savaş C. Hepatik Fibrozisin Patogenezi. *J Int Med Sci* 2005, 1(16), 5-10.
30. Yükselen V. Karaciğer Fibrozisi: Tanım ve Etiyoloji. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2005, 1(16), 1-4.
31. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, 2008, 134(6), 1655-1669.
32. Mann DA, Marra F. Fibrogenic signalling in hepatic stellate cells. *Journal of hepatology*, 2010, 52(6), 949-950.
33. Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 2007, 22: S79-S84.

34. Yu MC, Chen CH, Liang X, Wang L, Gandhi CR, Fung JJ, Qian S. Inhibition of T-cell responses by hepatic stellate cells via B7-H1-mediated T-cell apoptosis in mice. *Hepatology*, 2004, 40(6), 1312-1321.
35. Unanue ER. Ito cells, stellate cells, and myofibroblasts: new actors in antigen presentation. *Immunity*, 2007, 26(1), 9-10.
36. Viñas O, Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Berenguer C, Enrich C, Arroyo V. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology*, 2003, 38(4), 919-929.
37. Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, Russo MP, Jobin C, Brenner DA. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 2003, 37(5), 1043-1055.
38. Erol, A. Böbrek nakilli hastaların immün yanıtlarında th17 ve th1 profilinin değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 2015.
39. Bannenberg, GL. Therapeutic applicability of anti-inflammatory and proresolving polyunsaturated fatty acid-derived lipid mediators. *The Scientific World Journal*, 2010, 10, 676-712.
40. Noor MT, Manoria P. Immune dysfunction in cirrhosis. *Journal of clinical and translational hepatology*, 2017, 5(1), 50.
41. Fibrotic disease and the th1/th2 paradigm Thomas A. Wynn.
42. Lisman, TP, Robert J. The role of platelets in liver inflammation and regeneration. In: *Seminars in thrombosis and hemostasis*. © Thieme Medical Publishers, 2010. 170-174.
43. Sugihara A, Tsujimura T, Fujita Y, Nakata Y, Terada N. Evaluation of role of mast cells in the development of liver fibrosis using mast cell-deficient rats and mice. *Journal of hepatology*, 1999, 30(5), 859-867.
44. Hudspeth K, Pontarini E, Tentorio P, Cimino M, Donadon M, Torzilli G, Mavilio, D. The role of natural killer cells in autoimmune liver disease: a comprehensive review. *Journal of autoimmunity*, 2013, 46, 55-65.

45. Gao B, Radaeva S, Park, O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *Journal of leukocyte biology*, 2009, 86(3), 513-528.
46. Ramachandran P, Iredale JP. Liver fibrosis: a bidirectional model of fibrogenesis and resolution. *QJM: An International Journal of Medicine*, 2012, 105(9), 813-817.
47. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011 Apr, 25(2): 195-206.
48. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA, Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol* 2014 Mar, 14(3): 181-94.
49. Muhanna N, Horani A, Doron S, Safadi R. Lymphocyte–hepatic stellate cell proximity suggests a direct interaction. *Clinical & Experimental Immunology*, 2007, 148(2), 338-347.
50. Gressner AM, Bachem MG. Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat-storing cells in fibrogenesis. In: *Seminars in liver disease*. © 1990 by Thieme Medical Publishers, Inc., 1990. 10(1), 30-46.
51. Yi HS, Jeong WI. Interaction of hepatic stellate cells with diverse types of immune cells: foe or friend?. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 2013, 28, 99-104.
52. Aşı rehberi.
53. Kaushik H, Dıxıt A, Garg LC. Synthesis of peptide based epsilon toxin vaccine by covalent anchoring to tetanus toxoid. *Anaerobe*, 2018.
54. Plotkın S. History of vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(34), 12283-12287.
55. Hatipoğlu, İ. Hepatit b aşısı geliştirme ve hepatit b aşılarının etkinliğini artırmaya yönelik yaklaşımlar, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, 2012.
56. Riedel, S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. In: *Baylor University Medical Center Proceedings*. Taylor & Francis, 2005. 18(1), 21-25.

57. Salisbury D, Ramsay M, Noakes K. (ed.). Immunisation against infectious diseases. The Stationery Office, 2006.
58. Furman D, Davis MM. New approaches to understanding the immune response to vaccination and infection. *Vaccine*, 2015, 33(40), 5271-5281.
59. Baxter D. Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occupational Medicine*, 2007, 57(8), 552-556.
60. Furman D, Jojic V, Kidd B, Shen-Orr S, Price J, Jarrell J, Utz PJ. Apoptosis and other immune biomarkers predict influenza vaccine responsiveness. *Molecular systems biology*. 2013 ve 9(1), 659.
61. Fak AS. Kronik Hemodiyaliz Hastalarında Kısa Aralıklı İntradermal Hepatit-B Aşısının Etkinliği. Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Marmara Üniversitesi, İstanbul, 1992.
62. Kaushik H, Deshmukh S, Mathur DD, Tiwari A, Garg LC. Recombinant expression of in silico identified Bcell epitope of epsilon toxin of *Clostridium perfringens* in translational fusion with a carrier protein. *Bioinformation*, 2013, 9(12), 617.
63. Leise, MD, Talwalkar JA. Immunizations in chronic liver disease: what should be done and what is the evidence. *Current gastroenterology reports*, 2013, 15(1), 300.
64. Roni DA, Pathapati RM, Kumar AS, Nihal L, Sridhar K, Tumkur Rajashekar S. Safety and efficacy of hepatitis B vaccination in cirrhosis of liver. *Advances in virology*, 2013.
65. Aggeletopoulou I, Davoulou P, Konstantakis C, Thomopoulos K, Triantos C. Response to hepatitis B vaccination in patients with liver cirrhosis. *Reviews in medical virology*, 2017, 27(6), doi: 10.1002/rmv.1942.
66. Behzad E. Immune response to hepatitis B vaccine in patients with chronic kidney disease. *Hepatitis monthly*, 2011, (10 Oct), 781-782.
67. Coates, T., Wilson, R., Patrick, G., André, F., & Watson, V. (2001). Hepatitis B vaccines: assessment of the seroprotective efficacy of two recombinant DNA vaccines. *Clinical therapeutics*, 23(3), 392-403.

68. Zanetti AR, Van Damme P, Shouval D, Vaccine. The global impact of vaccination against hepatitis B: a historical overview. *Vaccine*. 2008, 26, 6266–6273.
69. Shokrgozar, MA, Shokri F. Enumeration of hepatitis B surface antigen-specific B lymphocytes in responder and non-responder normal individuals vaccinated with recombinant hepatitis B surface antigen. *Immunology*, 2001, 104(1), 75-79.
70. Lankarani KB, Talebzadeh M, Eshraghian A, Malek-Hosseini SA. Granulocyte colony stimulating factor adjuvant role on the immunological response to hepatitis B vaccine in patients with cirrhosis: a double blind randomized placebo controlled trial. *Hepatitis*.
71. Arslan M, Wiesner RH, Sievers C, Egan K, Zein NN. Double-dose accelerated hepatitis B vaccine in patients with end-stage liver disease. *Liver Transplantation*, 2001, 7(4), 314-320.
72. Starkel P, Leclercq, IA. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 2011, 25.2: 319-333.
73. Iredale, JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *The Journal of clinical investigation*, 2007, 117(3), 539-548.
74. Weiler-Normann C, Herkel J, Lohse AW. Mouse models of liver fibrosis. *Z Gastroenterol*, 2007, 45(1), 43-50.
75. Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2014, 20(23), 7312.
76. Wang JY, Guo JS, Li H, Liu SL, Zern MA. Inhibitory effect of glycyrrhizin on NF- κ B binding activity in CC14-plus ethanol-induced liver cirrhosis in rats. *Liver*, 1998, 18(3), 180-185.
77. Karantonis HC, Gribilas G, Stamoulis I, Giaginis C, Spiliopoulou C, Kouraklis G, Theocharis SE. Platelet-activating factor involvement in thioacetamide-induced experimental liver fibrosis and cirrhosis. *Digestive diseases and sciences*, 2010, 55(2), 276-28.

78. Lee MF, Liu ML, Cheng AC, Tsai ML, Ho, CT, Liou WS, Pan MH. Pterostilbene inhibits dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *Food chemistry*, 2013, 138(2-3), 802-807.
79. Pierre S, Chevallier A, Teixeira-Clerc F, Ambolet-Camoit A, Bui LC, Bats AS, Barouki R. Aryl hydrocarbon receptor–dependent induction of liver fibrosis by dioxin. *toxicological sciences*, 2013, 137(1), 114-124.
80. Akın FE. Ratlarda Tiosatemid ile Oluşturulan Toksik Hepatit Modelinde L-Karnitin ve Melatoninin Koruyucu Rolü. Tıp Fakültesi, İç hastalıkları Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Başkent Üniversitesi, Ankara, 2003.
81. Hajovsky H, Hu G, Koen Y, Sarma D, Cui W, Moore DS, Staudinger JL, Hanzlik RP. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol* 2012 Sep 17, 25 (9): 1955-63.
82. Aycan S. Ratlarda Tiyoasetamidle Oluşturulan Karaciğer Toksisitesi Üzerine Üzüm Çekirdeği Ekstraktının Etkileri. Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ, 2015.
83. Hung KS, Lee TH, Chou WY, Wu CL, Cho CL, Lu CN, Wang CH. Interleukin-10 gene therapy reverses thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 2005, 336(1), 324-331.
84. Jang JH, Kang KJ, Kim YH, Kang YN, Lee IS. Reevaluation of experimental model of hepatic fibrosis induced by hepatotoxic drugs: an easy, applicable, and reproducible model. *Transplant Proc* 2008 Oct, 40(8): 2700-3.
85. Liang J, Zhang B, Shen RW, Liu JB, Gao MH, Li Y, Zhang W. Preventive effect of halofuginone on concanavalin A-induced liver fibrosis. *PLoS One*, 2013, 8(12), e82232.
86. Bian G, Cheng Y, Wang Z, Hu Y, Zhang X, Wu M, jia Chen E. Whole recombinant *Hansenula polymorpha* expressing hepatitis B virus surface antigen (yeast-HBsAg) induces potent HBsAg-specific Th1 and Th2 immune responses. *Vaccine*, 2009, 28(1), 187-194.
87. <http://biostatapps.inonu.edu.tr/kruskalwallis/>.

88. Friedman SL. Hepatic fibrosis-Overview. *Toxicology* 2008, 254 (3),120-9.
89. Zhou XY, Yu ZJ, Yan D, Wang HM, Huang YH, Sha J, Xu FY, Cai ZY, Min WP. BML-11, a lipoxin receptor agonist, protected carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Inflammation* 2013 Oct, 36(5), 1101-6.
90. Maderna P, Godson C. Lipoxins: resolutionary road. *Br J Pharmacol* 2009, 158 (4): 947-59.
91. Chen IS, Chen YC, Chou CH, Chuang RF, Sheen LY, Chiu CH. Hepatoprotection of silymarin against thioacetamide-induced chronic liver fibrosis. *J Sci Food Agric*, 2012 May, 92 (7):1441-7.
92. Salguero Palacios R, Roderfeld M, Hemmann S, Rath T, Atanasova S, Tschuschner A, Gressner OA, Weiskirchen R, Graf J. Activation of hepatic stellate cell is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Laboratory I*.
93. Ersoy O. Karaciğer Enzim Yüksekliğinin Değerlendirilmesi. *Ankara Medical Journal*, 2012, 12.3.
94. Savaş N. Karaciğer Fonksiyon Testi Bozukluğuna Yaklaşım. *Turkish Family Physician* 2014, 5(3): 1-7.
95. Uygun A, Polat Z. Viral hepatit dışı serum transaminaz düzeyinde artışa neden olan hastalıklar. *Güncel gastroenteroloji*, 2009, 13(4), 211-223.
96. Ramadan A. Saad MFE-B, Abir A. Shalaby. Attenuation of acute and chronic liver injury by melatonin in rats. *Journal of Taibah University for Science* 2013, 7 (2): 88-96.
97. Chlabicz S, Grzeszczuk A, Łapiński TW. Hepatitis B vaccine immunogenicity in patients with chronic HCV infection at one year follow-up: the effect of interferon-alpha therapy. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clin*.
98. Dhillion S., MooreC., Li SD., Aziz A., Kakar A., Dosanj A., Beesla A., Murphy L., Van Thiel DH. Efficay of High-Dose Intra-dermal Hepatitis B Virus Vaccine in

Previous Vaccination Non-responders with Chronic Liver Disease. Digestive Disease and Science.



EKLER

EK 1. ÖZGEÇMİŞ

GENEL

Adı Soyadı:	Esra CANPOLAT
Doğum Yeri:	Malatya
Doğum Yılı:	1988
E-posta:	esracan-polat@hotmail.com

EĞİTİM

Eğitim Düzeyi	Mezun Olduğu Kurum	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı	2016-2019
Lisans	İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji	2008-2012
Pedagojik Formasyon	İnönü Üniversitesi, Eğitim Fakültesi	2009-2010

İŞ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre
Biyolog	İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Doku Tipleme Laboratuvarı	2016-2017

KATILDIĞI KONGRELER, KURSLAR VE SEMPOZYUMLAR

	Yer	Tarih
2. Ulusal Gastrointestinal Araştırma Kongresi	İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi	21-22 Eylül 2018
Scientific Research in Liver Trnsplantation 5th Inonu&Giessen Transplantation Days	İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi	26-28 Haziran 2018
LTLTD Surgey Workshop	İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi	26-28 Haziran 2018
Transplantasyon İmmünolojisi ve İmmün Süpresif Protokolleri Kursu	İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi	17-18 Kasım 2017
3.Türk&Alman Transplantasyon Sempozyumu	İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi	11-12 Eylül 2015

BİLİMSEL ÇALIŞMALAR

Canpolat E, Karaca M, Kayhan B, Bayındır Y, Kayhan B, Yılmaz S. Attenuation of Antibody Response and Elevation of CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg Cell Frequency During Chronic Liver Fibrosis. Hepatology Congress. 20-24 October 2017, Washington, ABD.

EK 2. DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL İZİNİ



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 07-06-2016
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2016/A-81
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Fare
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyadı : BALB/c
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : ☒E ☐D ☐Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 45 Adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 8-10 hafta

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Başak Kayhan'ın yürütücüsü olduğu "Karaciğer Fibrozunda Sistemik İritin Yanıtın Yönlendirilmesi" isimli 2016/A-81 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Ada geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

 Doç.Dr. M. Arif ALADAĞ Başkan	 Prof. Dr. Nigar VARDI Üye	 Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ Üye
 Vet.Hes. M. Züfer BOZBAĞ Üye	 Yrd.Doç.Dr. Mehmet KARATAŞ Üye	 Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Üye
 Salih AVECİ Sivil Üye	 Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU Sivil Üye	

