TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

163213

DENEYSEL KARACİĞER FİBROZİSİNDE PEGİNTERFERON ALFA2b VE TAURİN TEDAVİLERİNİN SPONTAN GERİLEMEYE KATKISININ İN-VİVO VE İN-VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Mehmet Refik MAS

DİSİPLİNLER ARASI TEMEL HEPATOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mithat BOZDAYI

2004 – ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Hepatoloji Anabilim Dalı
Temel Hepatoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir

Tez Savunma Tarihi: 30/06/2004

İmza
Prof.Dr.Ali ÖZDEN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Prof.Dr.Selim KARAYALÇIN
Ankara Üniversitesi

İmza
Prof.Dr.Hülya ÇETİNKAYA
Ankara Üniversitesi

İmza
Prof.Dr.Hakan BOZKAYA
Ankara Üniversitesi

İmza
Prof.Dr.A.Mithat BOZDAYI
Ankara Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay ii
İçindekiler iii
Önsöz vi
Simgeler ve Kısaltmalar vii
Şekiller ix
Çizelgeler xi

GİRİŞ
1.1. Karaciğer Makroskopik ve Mikroskopik Anatomisi 1
1.2. Karaciğer Fibrozisi 2
1.3. Karaciğerde Ekstrasellüler Matriks Yapımı 5
1.3.1. Parankimal Karaciğer Hücreleri 8
1.3.2. Hepatik Stellat Hücre Aktivasyonunda Kabul Gören Varsayım 14
1.4. Antifibrojenik Tedavinin Mevcut Durumu ve Geleceği 17
1.4.1. Antifibrojenik Tedavi Kavramı 17
1.4.2. Problemler 18
1.4.3. Potansiyel Antifibrojenik Ajanlar 19
1.4.4. Fibrozisin Kendiliğinden Gerilemesi 28
1.4.5. Oksidatif Stres ve Karaciğer Fibrozisi 36
1.5. Oksijen Türevi Serbest Radikaller 38
1.5.1. Süperoksid Radikali 39
1.5.2. Hidroksil Radikali 40
1.5.3. Hidrojen Peroksit 41
1.5.4. Hipokloröz Asid 42
1.5.5. Singlet Oksijen 42
1.6. Serbest Radikallere Karşı Koruyucu Sistemler 42
1.7. Deneysel Karaciğer Fibrozis Modelleri 45
1.7.1. Hepatotoksisiteye Bağlı Fibrozis Modeli 46
1.7.2. Nutrisyonel Fibrozis Modeli 47
1.7.3. İmmünolojik Fibrozis Modelieri 47
1.7.4. Biliyer Siroz 48
1.7.5. Alkolik Karaciğer Fibrozisi ve Sirozu 48

GEREÇ ve YÖNTEM
2.1. İn-Vivo Çalışma 50
2.1.1. Deney Grupları 50
2.2. İn-Vitro 51
2.2.1. Hepatik Stellat Hücre İzolasyonu 51
2.2.2. Hepatik Stellat Hücre Proliferasyonun Değerlendirilmesi 53
2.3. Laboratuar Testleri 56
2.3.1. Histopatolojik İnceleme 56
2.3.2 Apoptotik Hücrelerin Saptanması 60
2.3.3. Stellat Hücrelerinin Saptanması 60
2.3.4. Cu Zn SOD Aktivite Yöntemi ile Antioksidan Sistemin Belirlenmesi 61

2.3.5. MDA Ölçümü ile Oksidan Sistemin Değerlendirilmesi 62
Se GSH-PX Aktivite Yöntemi ile Antioksidan Sistemin Belirlenmesi 62
2.3.6. İstatistiksel Analiz 62

BULGULAR
3.1. Histopatolojik Bulgular 63
3.1.1. Histopatolojik Patern 63
3.1.2. Fibrozis 66
3.1.3. Alfa Düz Kas Antikor 66
3.1.4. Apoptoz 68
3.2. Biyokimyasal Bulgular 69
3.2.1. Doku MDA 69
3.2.2 GSHPx Doku 70
3.2.3. SOD Doku 70
3.3. Hepatik Stellat Hücre Poliferasyonu 72
3.3.1 Peg IFN 72
3.3.2. Taurin 72

TARTIŞMA 73
SONUÇ ve ÖNERİLER 80
ÖZET 81
SUMMARY 83
KAYNAKLAR 85
ÖZGEÇMİŞ 96

ÖNSÖZ

Bu tez konusu, Disiplinler arası Hepatoloji Ana Bilim Dalı Başkanlığınca 03 ŞUBAT 2002 Tarihinde verilmiş olup Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nce uygun görülmüştür. 02 EYLÜL 2002 tarihinde Hepatoloji Enstitüsü'nde başlanmış ve bitirilmiştir.

Kronik karaciğer hastalığının sürecinde önemli problemlerden birisi olan fibrozis, henüz etkili olarak tedavi yapılamayan bir bozukluktur. Günümüzde siroz gelişim sürecinde, bir dereceye kadar spontan gerileyebilen fibrozis döneminde hastalığın ilerlemesini durdurucu ve geriletici tedavi yöntemleri geliştirmeye yönelik birçok araştırma yapılmaktadır. Bu çalışmada taurin aminoasitinin ve peginterferon alfanın karaciğer fibrozisi üzerine olan etkinliklerini, spontan gerileme ile karşılaştırarak tespit etmeyi amaçladık.

Çalışmanın in-vitro basamağında yakın ilgisi ve tecrübelerinden yararlandığım Aachen Üniversitesinden Prof Dr. Axel Gressner'e teşekkür ederim.

Öğrenimim sırasında hiçbir zaman ödenemeyecek katkıları olan daima yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Özden UZUNALİMOĞLU'na, Prof. Dr. Cihan YURDAYDIN'a, Prof. Dr. Ali ÖZDEN'e, Prof. Dr. Kadir BAHAR'a, Prof. Dr. Selim KARAYALÇIN'a ve Prof. Dr. Hakan BOZKAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yürüttüğüm bütün çalışmalarda bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım ve bu deneysel çalışmanın gerçekleştirilmesinde motivasyon ilgi ve yardımlarıyla büyük katkıları bulunan tez danışmanım Prof. Dr. Mithat BOZDAYI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmanın yapılmasında yardımlarını gördüğüm, Uzm. Dr. İlker TAŞÇI'ya, Prof. Dr. Günay ALÇIĞIR'a, Doç. Dr. S. Atalay VURAL'a, Yrd. Doç. Dr. Salih DEVECİ'ye, Doç. Dr. Bilgin CÖMERT'e, Uzm. Ecz. Dr. Cemal AKAY'a ve Uzm. Dr. A. Turan IŞIK'a teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

αSMA	Alfa Düz Kas Aktin
BMP – 1	Kemik morfogenetik protein
CCL4	Karbontetraklorit
DMNA	Dimetilnitrozamin
EGF	Edipermal büyüme faktörü
EHS	Engelbreth – Holm Swarm
ETAR	Endotelin A reseptör
ETBR	Endotelin B reseptör
FGF	Fibroblast büyüme faktör
G6PD	Glikoz 6 fosfat dehidrogenaz
GR	Glutatyon redüktaz
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GSH	İndirgenmiş glutatyon
H2O2	Hidrojen peroksit
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
HGF	Hepasit büyüme faktör
HO	Hidroksil radikali
HOCl	Hipokloröz asit
HSH	Hepatik stellat hücre
IFN	İnterferon
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktör
IL-1	İnterlökin 1
IL-6	İnterlökin 6
LAP	Latentlikle ilgili peptid
MCP	Monosit kemotaktik peptid
MF	Myofibroblast
MMP	Matriks metalloproteinaz
NFκB	Nükleer faktör kappa-B
NGF	Sinir büyüme faktör
NO	Nitrik oksid
O2	Süperoksit radikali
PAF	Platelet aktive edici faktör
PAI	Plazminojen aktivatör inhibitörü
PDGF	Platelet derive büyüme faktörü
PPAR	Peroksizom proliferatör aktive edici reseptörler
ROS	Reaktif oksijen ürünleri
Singlet O2	Singlet oksijen
SOD	Süperoksid dismutaz
TAA	Tiyoasetamid
TGF-β,α	Transforming büyüme faktörü α ve β
TIMP-1	Metalloproteinaz doku inhibitörü
TNF	Tümör nekrozis faktör

TNFR	Tümör nekrozis faktör reseptör süper ailesi
UPA	Urokinaz plazminojen aktivatör
VLDL	Çok düşük dansiteli lipoprotein

ŞEKİLLER

Şekil 1.2	Normal ve hasarlı karaciğerde sinuzoidal alanda hepatik stellat hücre
Şekil 1.3	Karaciğer hasarı sürecinde hepatik stellat hücrelerin fenotip özellikleri ve rezolüsyon
Şekil 1.3.2a	Preinflamatuar Faz
Şekil 1.3.2b	İnflamatuar Faz
Şekil 1.3.2c	Post İnflamatuar Faz
Şekil 2.3.1a(Patern 1)	Normal veya hafif genişleme gösteren portal alanlar, parankim azalma
Şekil 2.3.1b(Patern 2)	Portal genişleme ve parankime kısa fibroz uzantılar
Şekil 2.3.1c(Patern 3)	Belirgin portal fibrozis, portoportal az sayıda fibroz birleşmeler
Şekil 2.3.1(Patern 4)	Normal-hafif geniş portal alanlar, portoportal fibrozis, tam birleşmeyen nodüller.
Şekil 2.3.1e(Patern5)	Belirgin portal fibrozis, porto-portal fibrozis, yer yer az sayıda mikronodül oluşumu
Şekil 2.3.1f(Patern 6a)	Hafif orta genişlikte fibrozisli portal alanlar, kalın fibröz septumlu makro ve mikro nodül oluşumu sirotik süreç
Şekil 3.1.1a	Histopatolojik patern grafiği
Şekil 3.1.1b	Belirgin portal fibrozis, porto-portal fibrozis, yer yer az sayıda mikronodül oluşumu
Şekil 3.1.1c	Belirgin portal fibrozis, porta-portal az sayıda fibröz birleşmeler
Şekil 3.1.1d	Portal fibrozis, porta-portal az sayıda fibröz birleşmeler
Şekil 3.1.1.e	Portal genişleme ve parankime kısa fibröz uzantılar
Şekil 3.1.2	Fibrozis skor grafiği
Şekil 3.1.3a	αSMA(+) hücreler (okla işaretlenmiş)
Şekil 3.1.3b	αSMA(+) hücrelerin gruptaki dağılım grafiği
Şekil 3.1.4a	Hepatosit apoptozu (okla işaretlenmiştir)
Şekil 3.1.4b	Hepatosit ve stellat apoptozunun istatistiksel değerlendirilmesi
Şekil 3.2.2	Oksidatif stres parametrelerinin istatistiksel değerlendirilmesi

ÇİZELGELER

Çizelge 3.2.3 Çalışmanın sonuçlarının tablo halinde değerlendirilmesi

1.GİRİŞ

1.1. Karaciğer Makroskopik ve Mikroskopik Anatomisi

Karaciğer vücuttaki organların en büyüğü olup, karın boşluğunun sağ ve üst bölümünde bulunur. Regio hypochondriaca dextra'nın tamamını, regio epigastrica'nın büyük bir bölümünü ve regio hypochondriaca sinistra'nın üst sağ yarımını doldurur. Yetişkin bir erkekte 1,4-1,8 kg. yetişkin bir kadında ise 1,2-1,4 kg olup kırmızımsı kahve rengindedir (Montgomery ve ark., 1995).

Karaciğerin büyük bir kısmını viseral periton (tunica serosa) örter. Tunica serosa'nın altında organı saran elastik liflerden zengin bağ dokusundan yapılmış tunica fibrosa (Glisson kapsülü) bulunur. Tunica fibrosa karaciğer dokusunun iç kısımlarına girerek organı lobcuklara (lobuli hepatis) ayırır. Bu lobcukların birbirleriyle birleştikleri yerde (portal aralık, Glisson üçgeni, Kierman aralığı) arteria interlobularis, vena interlobularis ve ductulus interlobularis bulunur. Altıgen prizma şeklinde olan lobulus hepatis'lerin ortasında vena centralis yer alır. Kan, karaciğer sinüzoidleri içerisinde periferden vena centralis'e doğru ilerler. Lobus hepatis'ler birleşerek karaciğer segmentlerini oluşturur (Montgomery ve ark.,1995).

Karaciğerin klasik olarak bilinen yapısal ve fonksiyonel en küçük ünitesi lobuli hepatis'tir. Bir lobül polihedral prizma şeklinde olup 0.7x2.0 mm boyutlarındadır. Lobül, transvers kesitlerde poligon şeklinde görülür. Bazı hayvanlarda (örneğin; domuz) lobüller birbirinden bir bağ dokusu ile ayrılır. Fakat insanlarda böyle bir yapılanma söz konusu değildir ve bu nedenle de insanlarda lobüller arasındaki sınırı kesin olarak belirlemek mümkün değildir. Lobüllerin köşelerinde portal triad yer alır. Portal triad vena porta, arteria

hepatica ve safra kanalından oluşan üçlü bir yapıdır. Bu üç yapı ortak bir kılıfla sarılıdır. Bu kısımlarda lenfatikler de bulunur.

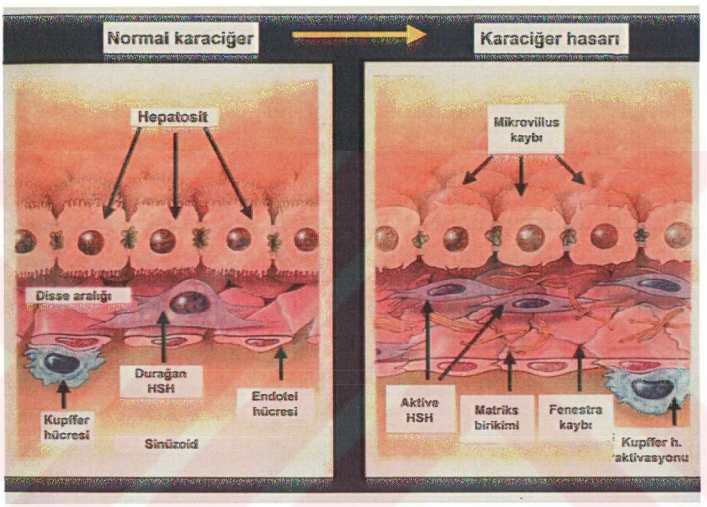
Bir karaciğer lobülünün merkezinde lobülün uzun ekseni boyunca vena centralis yer alır. Karaciğer hücreleri olarak tanımlanan hepatositler vena centralis'ten lobülün kenarına doğru ışınsal tarzda yerleşirler ve lobülün parankimasını oluştururlar. Hepatosit dizilerinin arasında ise vena centralis'e doğru uzanan ve hepatositler gibi ışınsal yerleşimli sinüzoid adı verilen kapiller ağ bulunur. Sinüzoidler, ışık mikroskobunda hepatosit dizileri arasında yer alan boşluklar şeklinde görülür.

Sinüzoidler, kan ile karaciğer parankimi arasında madde geçişini sağlayan ve çapı kapillerlerden daha geniş olan damarlardır. İki tip hücre ile çevrilidir. Bunlar endotel ve kupffer hücreleridir. Endotel hücreleri'nin organelleri oldukça azdır. Pinositotik veziküller bulunur ve diğer endotel hücreleri gibi pinositolik aktivite gösterirler. Endotel hücrelerinin nükleusları ışık mikroskobunda küçük, ince ve uzun görünür. Bu görünümünden dolayı fibroblast nukleusu ile karışabilir. Endotel hücresinin yüzeyi oldukça düzgündür. Mononükleer fagositik sistemin bir üyesi olan Kupffer (yıldız) hücreleri ise monositlerden gelişirler. Bu hücreler ışık mikroskobik olarak nükleuslarının şeklinden tanınırlar. Bu nükleuslar genelde büyük, oval şekillidir ve lümene doğru yönlenmiştir. Çok geniş bir sitoplazması ve fagositik hücrelerde de bulunan organelleri vardır. Kupffer hücresinin yüzeyi çok düzensiz bir görünüme sahiptir. Bu düzensiz ve çentikli görünüm, hücrenin yüzey alanını arttırmak için oluşan uzantılardan dolayıdır.

1.2. Karaciğer Fibrozisi

Kronik olarak hasar gören karaciğerde, fibrogenez (matriks formasyonu ve depozisyonu) ile fibroliz (matriks degradasyonu ve ortadan kaldırılması)

arasındaki homeostaz bozulmaktadır. Bu denge fibrozis (aşırı konnektif doku birikimi) lehine sonuçlanmaktadır. Günümüzdeki veriler, aşırı matriks birikimindeki temel mekanizmanın, matriks üretiminin stimülasyonu olduğunu göstermektedir (Bernard ve ark., 1996;). Matriks yıkımının inhibisyonu, belli matriks moleküllerinin birikimini destekleyebilir ve kollajen olmayan komponentlerin dağılım profilindeki değişikliklere katkıda bulunabilir (Schuppan ve ark., 1990).



Şekil 1.2 Normal ve hasarlı karaciğerde sinuzoidal alanda hepatik stellat hücre

Karaciğer fibrozisinin patogenezi, son yıllarda genel olarak organ fibrozisi için bir prototipik model olarak kabul görmektedir. Karaciğer fibrozisi için mutlaka gerekli ve birbirleriyle ilişkili reaksiyonların oluşması için

- Parankimal hücre hasarı
- İnflamasyon
- Hepatosellüler rejenerasyon
- Ekstrasellüler matriks üretimi

- Tüm karaciğerde, psödolobül oluşumuna neden olan lobüler ve damarsal yapının bozulmasının gerekli olduğu kabul edilmektedir (Gressner ve ark., 1999).

Fibrozis karaciğer ekstrasellüler matriks değişikliklerinin tüm karmaşıklığını içermektedir. Bu değişimi şu şekilde özetleyebiliriz.

- Ekstrasellüler matriks moleküllerinin büyük bir kısmında 3-10 kat düzeyinde artış,
- Tek bir ekstrasellüler matriks molekülünün belirli subtipinde orantısız artış
- Ekstrasellüler matriks moleküllerinin belirli tiplerinin mikrokompozisyonundaki çok küçük değişiklikler [örneğin kollajen alfa zincirlerinin hidroksilasyon derecesi ve proteoglikanların kor proteinlerini kaplayan glikozaminoglikanların sayısı, uzunluğu ve sülfasyon derecesinde (şarj dansitesi) oluşan değişiklikler
- Fibrozise neden olan hasarlı karaciğerde ekstrasellüler matriksin topografik olarak yeniden yapılanması

Bütün vücuttaki proteinlerin üçte birini oluşturan kollajenin karaciğerdeki oranı yaklaşık %5-10'dur.Siroz geliştiğinde bu oran %50 düzeyine çıkmaktadır. Bugüne kadar tespit edilmiş 12 kollajen tipi vardır. Kollajen I, II, III, IV, V ve VI karaciğerde birikirken kollajen tip II ve VII-XII'nin karaciğerde biriktiği gösterilememiştir. Siroz gelişmiş bir karaciğerdeki kollajenin yaklaşık %60-70'i tip I, %20-30 tip III kollajen olup tip IV, V ve VI çok düşük miktardadır (Schuppan ve ark., 1990).

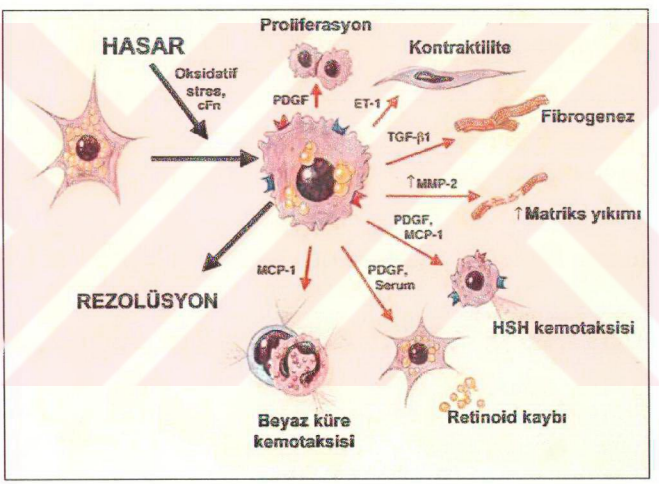
Subendotelyal bazal membran oluşumu ile birlikte perisinüzoidal fibrozis, sinüzoidlerin kapillarizasyonuna neden olur. Böylece diffüzyon bariyerlerinin gelişmesiyle hepatositlerin ve nonparankimal hücrelerin sistemik fonksiyonlarına engel olmakta ve/veya intrasinüzoidal kan akımının güçleşmesi ve hepatik mikrosirkülasyonun diğer bozukluklarından dolayı

portal hemodinamikleri bozarak fibrozisin birçok klinik sonuçlarına neden olmaktadır (Schafer ve ark., 1963). Hepatositlere yeterli oksijen ve besin maddelerinin sağlanamaması sonucu hepatosellüler hasar (nekroz) gelişimi ve böylece başlatıcı olayın devamlılığı sonucu kısır döngü oluşabilmektedir. İlginç olarak birçok dokunun aksine karaciğerde hasarın tamamen iyileşmesi için aşırı fibrojenik cevaba gerek yoktur, çünkü hepatositlerin yüksek rejenerasyon kapasiteleri nekrotik parankim kaybını tamamen ve çabuk bir şekilde düzelterek eski haline geri döndürebilmektedir (Schuppan ve ark., 1990; Poli ve ark., 2000).

1.3. Karaciğerde Ekstraselülüer Matriks Yapımı

Karaciğer orijini, lobüler lokalizasyonu ve fonksiyonları çok farklı olan birçok epitelyal ve mezenşimal hücrelerden oluştuğu bilinmektedir. Her bir matriks bileşeninin hücresel kaynakları in situ ve in vitro tekniklerle belirlenmesi gelişen tekniklere rağmen oldukça problem oluşturmaktadır. Günümüzde birçok metodun avantaj ve dezavantajları ortaya konmuştur (Bissell ve ark., 1990;Schuppan ve ark., 1990). İnsan-hayvan orijinli parankimal ve nonparankimal karaciğer hücrelerinin saflığının sağlanması, izolasyon kültürlerindeki gelişmeler son zamanlardaki hücre kültürü çalışmaları sonuçlarını güvenilir hale getirmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda hasarlı karaciğerde konnektif doku üreten hücre tipinin perisinüzoidal hepatik stellat hücreler olduğunu açıkça ortaya koymuştur (Freidman ve ark., 1985;Mcgee ve ark., 1982;Weiner ve ark., 1990). Bu hücreler disse aralığında lokalizedirler. Normal olarak bu hücrelerin mitotik aktiviteleri düşüktür. Tüm karaciğer hücrelerinin yaklaşık % 15'ini oluştururlar. Karmaşık bir embriyonel gelişimleri vardır. Glial fibriller asidik protein ve nestin eksprese etmeleri nöral krest kaynaklı olduklarını düşündürmektedir (Freidman ve ark., 2000). Uzun stoplazmik uzantılar ile hepatik sinirlerle ilişki içindedirler ve böylece α-adrenerjik uyarılara cevap verirler (Vom ve ark, 1999). Retinoidlerin depolanması ve metabolizmasından sorumludurlar.

Bu hücreler parankimal karaciğer hücrelerine göre yaklaşık 50 kat daha fazla retinol içerirler ve tüm karaciğerdeki retinolün %80-90'ının bu hücre tipinde bulunduğu hesaplanmaktadır. İlginç olarak periportal/perivenöz desmin gradiyenti, vitamin A içeriği, lipid damlacıklarının boyutları ve dendritik oluşumların arborizasyonu stellat hücrelerde intralobüler heterojenite olduğuna işaret etmektedir (Gressner ve ark., 2000). Yapılan çalışmalarda kültürdeki stellat hücrelerde fonksiyonel heterojenite olduğu da gösterilmiştir (Freidman ve ark., 1989). Bu durum stellat hücrelerin fibrojenik uyarılara karşı farklı sensitiviteleri olduğunu göstermesi açısından önemli olabilir.



Şekil 1.3 Karaciğer hasarı sürecinde hepatik stellat hücrelerin fenotipik özellikleri ve rezolüsyon

Hepatik stellat hücreler, nekroinflamatuar stimulanlarla in situ olarak kültür esnasında spontan olarak aktive olma yeteneğine sahiptirler (Gressner ve ark., 1995).

Fibrogenez için anahtar patogenetik olay olarak tanımlanan aktivasyon süreci şu gelişmeleri içermektedir.

Hepatik stellat hücrelerin;

- Proliferasyonun stimulasyonu,
- Retinoid depolayan hücrelerde volüm dansitesi düşük vitamin A dolu lipid damlacıkları, hipertrofik endoplazmik retikulum içeren yoğun desmin, gelsolin ve düz kas alfa aktin flamentlerine karşın azalmış glial fibriler asidik protein ekspresyonu ile karakterize 'sentetik' fenotipe transformasyon,
- Birçok matriks proteinin, glikokonjugatların ve glikozaminoglikanların gen ekspresyonu, sentezi ve sekresyonu,
- Hasarlı karaciğerdeki aktive hepatik stellat hücrelerin vazoregulatuvar fonksiyonları olduğunu düşündüren kontraktilite fonksiyonu kazanması (Gressner ve ark., 1994) (Şekil 1.3).

Transforme hepatik stellat hücreler kollajenler, proteoglikanlar, plazma ve sellüler fibronektin, laminin, nidojen/entaktin, tenaskin, undulin, hyaluronan gibi ekstrasellüler matriks komponentlerinden başka, transforme hepatik stellat hücreler, Transforme eden büyüme faktör-α ve β (TGFβ ve TGFα), fibroblast büyüme faktör (FGF), monosit kemotaktik peptid (MCP)-1, platelet aktive eden faktör (PAF), endotelin-1, insülin benzeri büyüme faktör (IGF)-1, interlökin-6 gibi birçok proinflamatuar sitokin, kemokin ve büyüme faktörleri sentez edebilmektedirler (Biessell ve ark., 1990; Gressner ve ark., 1994; Gressner ve ark., 1994;Halliwell ve ark., 1989;Kenneth ve ark., 1999;LaMarre ve ark.1991;Schafer ve ark., 1987). Dahası, aktive hepatik stellat hücreler, yeni oluşmuş kollajenlerin belirli tiplerinin degradasyonunu azaltma imkanı sağlayan metalloproteinaz doku inhibitörü (TIMP)-1 sekrete etme yeteneğine sahiptirler (Micheal ve ark.1989;Okazaki ve ark., 2000). Myofibroblastlara transformasyon esnasında kültür edilmiş hepatik stellat hücreler devamlı olarak birçok matriks proteininin sentez ve sekresyonunu arttırırlar, büyüme faktörleri, kemokin ve sitokinlerin ekspresyonunu değiştirirler ve birçok sitokin reseptörünün ekspresyonunu düzenlerler. Diğer yandan stellat hücrelerdeki hepatosit büyüme faktörü (HGF) ekspresyonu myofibroblastlara

transformasyon esnasında güçlü bir şekilde down-regüle edilir (Yasunobo ve ark., 1997).

Diğer tip non-parankimal hücrelerin ekstrasellüler matriks üretimine katkıları oldukça az olup, komponentlerin belli tipleriyle kısıtlı ve düşük düzeydedir. Elde edilen bu veriler daha çok invitro çalışmalara dayanmaktadır, hücrelerin insitu fonksiyonlarını yansıtmayabileceği göz önünde tutulmalıdır (Weiner ve ark., 1990).

1.3.1. Parankimal Karaciğer Hücreleri

Hepatositlerin normal ve patolojik durumlarda ekstrasellüler matriks üretimine katkı potansiyelleri olup olmadığı tartışmalıdır. Normal ve fibrotik rat karaciğerlerinde invivo olarak hepatosit-spesifik kollajen sentezini ölçmek için tasarlanmış "dual-label" metodu ile pürifiye karaciğer hücrelerinden, Northern blot yöntemiyle mRNA ölçümü, insitu hibridizasyon ve ilk çalışmalardan elde edilen deneysel veriler karaciğer kollajen üretiminde hepatositlerin büyük rolleri olduğunu öne sürmekteyken, normal ve hastalıklı, insan-rat hepatositlerinde prokollajen mRNA'yı saptayamayan diğer bazı insitu hibridizasyon çalışmaları bu durumu desteklememektedir. Bu konuda daha ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Ancak kabul edilen görüş ekstrasellüler matriks proteoglikan üretimine hepatositlerin katkısı eğer varsa bile çok az olduğu yönündedir (Schuppan ve ark., 1990).

Hepatik stellat hücre aktivasyonunu stimüle ederek hastalıklı karaciğerde ekstrasellüler matriks yapımını arttıran fibrojenik mediyatörlerin orijin ve özelliklerini belirleyerek, fibrojenez mekanizmalarını ortaya koyabilmek için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Fibrojenik süreç esnasında stellat hücreler myofibroblast benzeri transformasyona dönüşürler. Bu fenotipik değişim sayesinde stellat hücreler aşırı miktarda matriks proteinleri sentezleme ardından yıkımı inhibe edebilme özelliği kazanırlar (Freidman ve ark., 1985;Gressner ve ark., 1999;Scoot ve ark., 1993).

Ekstrasellüler matriks ve hücresel kompozisyonun büyük oranda değişmesi ile hepatik stellat hücrelerin mikroçevrelerindeki değişiklikler sadece hasarlı hepatositlerin değil endotel hücreleri, kupfer hücreleri ve ortama gelmiş plateletlerinde parakrin yolla mediyatörleri ile stellat hücreleri ve myofibroblastları stimüle etme yeteneğine sahip majör efektör hücreler olduğunu düşündürmektedir (Friedman ve ark., 1989;Jacquelyn ve ark., 1990). Buradan çıkan sonuçlarla fibrogenez sadece hücresel değil aynı zamanda etkin olarak hücre-hücre ve hücre matriks etkileşimleri olan doku fenomeni olduğu gerçeği kavramına götürmektedir.

Hasar sırasında sinüzoidal epitelyal hücrelerin tipik fenestrasyonu azalmakta, hatta kaybolmaktadır, böylece inkomplet subendotelyal bazal membran benzeri yapı gelişmektedir. Sinüzoidlerin kapillarizasyonu adı verilen bu değişim esnasında endotelyal hücre volümü artmakta ve hücresel balonlaşma oluşmaktadır (Schaffer ve ark., 1963). Endotelyal hücreler belli koşullar altında İnterlökin-1 (IL-1), FGF, platelet derive büyüme faktörü (PDGF), hidrojen peroksid, plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI)-1 ve monosit kemotaktik peptid (MCP)-1 gibi birçok mediyatör sentezler ve salgılarlar (Ankonello ve ark., 1996;Halliwell ve ark., 1989). Endotelyal hücreler PDGF ve FGF aracılığıyla myofibroblast proliferasyonunu stimüle ederler (Massaque ve ark., 1990). PAI-1 senteziyle ise matriks degradasyonunu indirekt olarak azaltırlar, PAF ve MCP-1 üreterek inflamatuar hücreleri hasar bölgesine çekerler. Endotelyal hücrelerin diğer önemli bir özelliği, TGF-β aktivasyonunda diğer hücre tipleriyle olan yakın ilişkisidir. TGF-β birçok hücre tarafından latent formda salınır, aktif TGF-β oluşumu için latentlikle ilgili peptidin (LAP) ayrılması gerekmektedir. Sadece aktif TGF-β, reseptörlerine bağlanarak hücresel cevapları indüklemektedir. Myofibroblast ve kupfer hücreleri içeren ortamın (latent TGF-β mevcuttur) endotel hücreleri ile inkübasyonu sonucu latent TGF-β yeterli düzeyde aktive edildiği gösterilmiştir. Endotelyal hücrelerin myofibroblast veya kupfer hücreleri ile aynı anda kültürü sırasında daha yüksek oranda latent TGF-β aktive edilmektedir. Bu gözlemler, TGF-β aktivasyonu için hücre-hücre ilişkisi

veya iki farklı hücrenin yakın bağlantılı olması gerektiğini göstermektedir. Günümüzde TGF-β'nın hem invitro hem de invivo olarak ekstrasellüler matriks proteinlerinin üretimininde rolünün olduğu net olarak anlaşılmıştır (Massaque ve ark., 1990; Max ve ark., 1992). Ayrıca TGF-β matriks degradasyonunun inhibisyonu ile hücre membranındaki integrin reseptörleri aracılığıyla matriks-hücre etkileşmesinde rol almaktadır. Kronik olarak TGF-β yükselmesi aktive lipositlerin indüksiyonunu devam ettirmektedir (Border ve ark.1994, De Blesser ve ark., 1999). TGF-β'nın normalde beş alt grubu olup, karaciğerde TGF-β1, β2 ve β3 bulunmaktadır (Valerie ve ark.,1999). Deneysel karaciğer fibrozis modellerinde TGF-β1 mRNA seviyesi belirgin olarak arttığı gösterilmiştir (Harushige ve ark.1990). Latent formda salgılanan TGF-β1'in aktivasyon mekanizmasının muhtemelen insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)-II reseptörüne bağlanması ve endotelden salgılanan plazmin veya ürokinazın ortamda bulunması olduğu ileri sürülmektedir (Max ve ark.1992; Montgomery ve ark.,1995).

TGF-β' nın fibrogenezdeki rolünün deneysel kanıtları şu şekilde özetlenebilir (Border ve ark., 1994).

- CCL_4 kaynaklı akut karaciğer hasarında TGF-β m-RNA düzeyi hızla artar (Czaja ve ark., 1989),
- Kültür ortamında hepatik stellat hücreler TGF-β geni eksprese ederler (Gressner ve ark., 1999),
- Streptokok hücre duvarı ile oluşturulan inflamasyonda TGF-β gen ekspresyonu anlamlı düzeyde artar. Ayrıca, insanlarda da aktif fibrogenezde TGF-β gen ekspresyonu artmaktadır,
- TGF-β ekspresyonu artırılmış transgenik farelerde şiddetli fibrozis gelişmektedir.

Kupfer hücreleri ve myofibroblastlarla yapılan çalışmalarda, hepatik stellat hücre morfolojisini depolayıcı tipten sekretuvar tipe değişimlerini sağladıkları

gösterilmiştir. Kupfer hücreleri, stellat hücreler üzerinde yoğun stimüle eden aktiviteleri ile bu hücreleride; belirgin nükleer genişleme, retinoid veziküllerin kaybı, protein sentezinde 3 kat, kollajen sentezinde 2.5 kat ve proliferasyon artışı ile PDGF'ye yanıt şeklinde fenotipe transformasyona neden oldukları gösterilmiştir (Freidman ve ark., 1989). PDGF'ye cevaplılık, aktivasyon sırasında B-tip PDGF reseptörünün de novo ekspresyonuna bağlıdır. Günümüzde PDGF reseptör indüksiyonuna neden olan faktörler ve regülatuvar olaylar bilinmemektedir. Fakat TGF-β'nın sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir. TGF-β, PDGF-AA ve PDGF-AB aksine, PDGF-BB'nin mitojenik etkisinde önemli bir artış sağlar, bu durum insan hepatik stellat hücrelerindeki PDGF reseptörünün beta subünitinde selektif bir etkisi olduğunu düşündürmektedir. Bu mekanizmanın, hepatik steilat hücre proliferasyonunu, PDGF-beta reseptör ekspresyonunu arttırarak indirek olarak katkı sağladığını göstermesi yönüyle önemlidir (Gressner ve ark.1999; Marra ve ark.1994;Massimo ve ark., 1994).

Plateletlerdeki alfa granüllerinde depolanan ve salınan başlıca büyüme faktörleri; TGF-β, epidermal büyüme faktörü (EGF), PDGF ve insülin benzeri büyüme faktör (IGF)-1'dir. İntegrasyonu bozulmuş plateletlerin, hepatik stellat hücrelerinin büyüme, transformasyon ve ekstrasellüler matriks sentezini stimüle ederek karaciğer fibrogenezinde önemli rol oynayabileceği şu bulgularla desteklemektedir (Massimo ve ark., 1989;Scott ve ark., 1993).

- Nekrotik alanların çevresinde, nötrofil ve makrofajlarla birlikte platelet havuzunda artış gözlenmektedir
- Plateletler zengin TGF-β kaynağıdır. Bu sitokini hasar sahasında aktivasyon, adezyon ve agregasyonu takiben çevre dokuya salgılama kapasitesine sahiptirler.
- Platelet aktivasyonunu takiben alfa granüllerinden PDGF, iGF-1 ve FGF gibi ek fibrojenik mediatörlerde salgılanmaktadır.

Yapılan çalışmalar sonucu insan plateletlerinden elde edilen lizatın, doza bağımlı şekilde primer kültürde saklanan rat karaciğer hepatik stellat hücrelerinin hem proliferasyonunu hem de proteoglikan sentezini uyardığını göstermiştir.

Dokuda hepatositler hepatik stellat hücrelerle yakın bağlantı içersindedirler. Bu durum, hepatik stellat hücre aktivasyonu mekanizmasında hem solubl mediyatörler hem de direkt membran ilişkisi için fırsat sağlamaktadır. Hasarlı hepatositlerin stellat hücrelerin aktivasyonunda doğrudan rol alabileceğini düşündüren birçok gözlem bildirilmiştir. Karaciğer fibrogenezini başlatan primer olay sıklıkla hepatoselülüer hasar olduğundan, membran kontakt inhibisyonunun ortadan kaybolması, sitozolik depo yerlerinden mitojenik faktörlerin salınımı ve normal olarak hepatositlerce üretildiği varsayılan hepatik stellat hücre proliferasyon inhibitörünün kaybı, hasarlı hepatositlerin stellat hücre proliferasyonuna katkıda bulunabilecekleri potansiyel yollar olarak kabul edilmektedir (Gressner ve ark., 1999).

Normal rat hepatositlerinin primer kültürlerinden oluşan ortam, erken kültüre edilmiş (transforme olmamış) hepatik stellat hücrelerin proliferasyonunu stimüle edebilmektedir. Bu etki, hepatositlerin hepatik stellat hücrelerle beraber kültüre edilmeleri ile gösterilmiştir (Freidman ve ark., 1989). Hepatositlerce eksprese edilen ve salgılanan birçok sitokin bildirilmektedir, fakat bunların stellat hücre aktivasyonuna etkileri bilinmemektedir (Gressner ve ark., 1999). Ortamdaki mitojenik aktivite de-nova senteze bağımlı değildir, aksine hasarlı durumlarda kültür edilen hepatosit ortamı, hepatik stellat hücre proliferasyonunu sağlama da çok aktiftir. Muhtemelen IGF-1 ve IGF bağlayan proteinlerle ilişkili hepatosit kaynaklı mitojenler, kupfer hücrelerinden salgılanan büyüme faktörleri ile uyum içinde (aditif etki) davranırlar. Normal olarak hepatositlerden salgılanan inhibitör sinyallerin hasara bağlı kaybı (bu inhibitör sinyaller normal dokuda matriks üreten hücrelerin proliferasyonunu sınırlarlar), kanıtlanmamasına rağmen ek bir fibrojenik mekanizma olabilir. Önceki yıllarda karaciğer hücre membranlarının dış yüzeyinde yerleşmiş

arjinaz, kültürde matriks üretiminin hepatik stellat hücre proliferasyonunun ve protein sentezinin potent inhibitörü olarak tanımlanmıştır (Gressner ve ark., 1994). Ortamdaki arjinin seviyesindeki önemli azalmaya bağlı olan bu etki, eğer enzim hepatik stellat hücreler için arjininden fakir bir mikroçevre sağlarsa, in situ olarak potansiyel önem taşıyabilmektedir. Hepatosit hasarı söz konusu olduğunda enzim aktivitesi düşecek, hepatik stellat hücre proliferasyonuna imkan sağlayacaktır (Bernard ve ark., 1996;Gianluca ve ark., 1998).

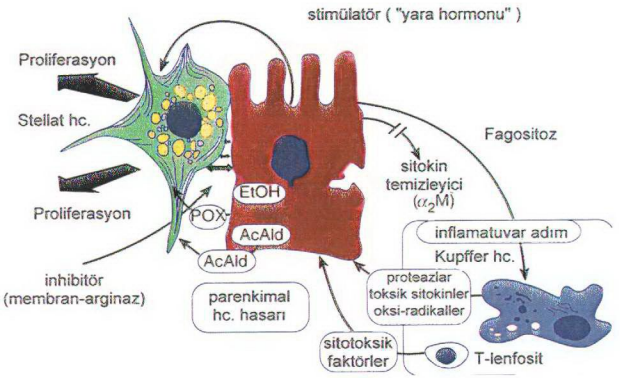
Potansiyel olarak diğer bir hücre ilişkisi, hepatositlerin bazı profibrojenik ksenobiyotikleri hepatik stellat hücrelerin myofibroblastlara doğru transformasyonunu aktive eden ve/veya matriks gen ekspresyonunu stimüle eden fibrojenik maddelere metabolize etmesidir. Bunun örneği kendisinin fibrojenik olduğu düşünülmeyen etanoldür (Hidekazu ve ark., 1995). Etanolün oksidasyon ürünü olan ve hepatositlerde oluşturulan asetaldehit ve laktat, belli kollajen tipleri ve fibronektin ekspresyonunu etkili şekilde stimüle etmektedir (Lieber ve ark., 1990). Bununla birlikte, proteoglikan metabolizması etkilenmez. Undulin' in mRNA ve protein ekspresyonu asetaldehit tarafından azaltılmaktadır. Bu durum, bu metabolitin matriks gen ekspresyonunda uniformdan ziyade spesifik etkileri olduğunu düşündürmektedir. Dahası etanol veya kimyasal olarak indüklenen lipit peroksidasyonu, fibroblastlarda ve aynı zamanda beraber kültüre edilmiş insan ve rat hepatik stellat hücrelerinde kollajen gen ekspresyonunu stimüle etmektedir. Alkolle ilişkili bu peptid olmayan fibrojenik mediyatörler alkolle ilişkili karaciğer hastalıklarının patogenezinde etanolün (ve metabolitlerinin) spesifik fibrojenik rolü olduğunu düşündürmektedir (Lieber ve ark., 1990).

Hepatik stellat hücreler ve hepatositler, direk hücre-hücre ilişkisi yoluyla da birlikte çalışabilirler. Hepatik stellat hücreler ve parankimal karaciğer hücrelerindeki perisellüler matriks komponentleri ve diğer hücre yüzey ilişkili bağlanma yerleri, her iki hücre tipi arasındaki intersellüler haberleşmeleri sağlayabilecek potansiyel adaylardır. Karaciğer dışı dokularda yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular, normal karaciğerdeki hepatik stellat

hücrelerin mitotik aktivitelerinin, önemli fizyolojik düzenleyicisinin karaciğer hücre membranı ile ilişkili proteoheparan sülfat olduğunu düşündürmektedir (La Marre ve ark., 1991;Schafer ve ark., 1987). Perisellüler heparan sülfat sentezi ileri derecede bozulmuş olan hasarlı hepatositler, hepatik stellat hücreler ile ilişki kurup, inhibe edemeyeceği için hepatik stellat hücrelerin mevcut veya sonradan toplanmış inflamatuvar hücrelerden salgılanan büyüme faktörlerinin etkisine maruz kalmasına neden olmaktadırlar. Bu hipoteze dayanarak, hepatosit ve hepatik stellat hücre ilişkisinin kaybolmasıyla birlikte mitojenlerin salınımı, stellat hücrelerin aktivasyonunda başlatıcı olaylardan birisini teşkil ettiği düşünülmektedir.

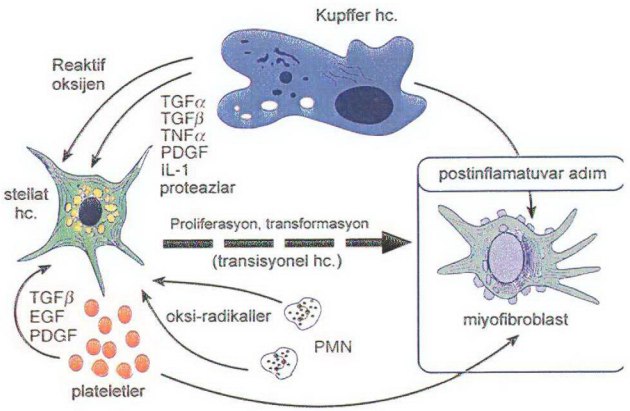
1.3.2. Hepatik Stellat Hücre Aktivasyonunda Kabul Gören Varsayım (Kaskad Modeli):

Hepatik stellat hücre aktivasyonunda 3 basamaklı kaskad modeli ileri sürülmektedir. Bu modele göre, preinflamatuar, inflamatuar ve postinflamatuar dönemler mevcuttur. Preinflamatuar fazda (faz I), membran sızıntısına yol açan komplet veya belli belirsiz hepatosellüler hasar, hepatik stellat hücrelerin proliferasyonunu başlatan 'yara hormonu` benzeri parakrin etkili mitojenlerin salınımını kolaylaştırır. Ek olarak etanol metabolize eden hepatositler, inflamatuar mediyatörler etkili olmadan önce yakındaki hepatik stellat hücrelerde matriks gen ekspresyonunu stimüle eden asetaldehit, reaktif oksijen ürünleri ve lipid peroksidleri üretirler (Şekil 1.3.2a).



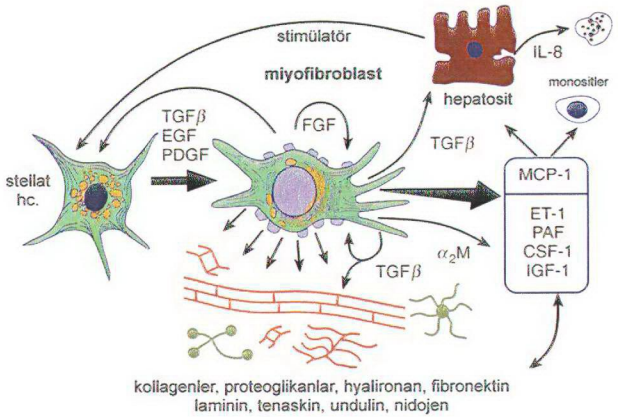
Şekil 1.3.2a Preinflamatuar Faz (Gressner, 1999)

Takip eden inflamatuar fazda (faz II), aktive olmuş kupfer hücreleri ve plateletlerden salınan sitokinler, hepatik stellat hücreleri prolifere olmaları ve myofibroblastlara transforme olmaları için stimüle ederler. Kupfer hücrelerinin ve ortama çekilmiş monositlerin aktivasyonu, immünolojik olarak ve nekroz merkezinde hücre debrislerinin fagositozu ile başlatılır. Bu aktive hücreler, proteazlar, toksik sitokinler tümör nekrozis faktörα (TNF-α) ve reaktif oksijen ürünleri salgılayarak hepatosellüler hasarı başlatıp, devam ettiriyor olabilirler. IL-8 üreten etanol metabolize eden hepatositler tarafından ortama çekilen ve aktive edilen PMNL'lerden salgılanan toksik oksijen metabolitleri, en azından alkolik karaciğer hasarında patogenetik kısır döngüye katkıda bulunabilmektedirler. İnflamatuar fazda, multifonksiyonel fibrojenik sitokinlerin prototipi olan TGF-β,



Şekil 1.3.2b İnflamatuar Faz (Gressner, 1999)

hepatik stellat hücrelerin ara evrelerden geçerek (transizyonel hücreler) myofibroblastlara transformasyonunu potent bir şekilde hızlandırır (Şekil 1.3.2b). Postinflamatuar fazda (faz III) myofibroblastlar kendilerinin eksprese ettiği ve salgıladığı, ayrıca üzerlerinde reseptörlerini taşıdıkları TNF-α, TGF-β, endotelin (ET)-1, PDGF ve FGF tarafından oluşturulan otokrin etki ile stimüle edilirler. Henüz transforme olmamış hepatik stellat hücrelerin myofibroblastlar tarafından parakrin stimülasyonu, başlatıcı olay ortadan kaldırılsa dahi fibrozisin ilerlemesini sağlar (Gressner ve ark., 1999). Myofibroblastlar tarafından salgılanan TGF-β, ekstrasellüler aktivasyonu takiben, parakrin yolla apopitozisi indükleyerek hepatosit ölümüne neden olabilir. Hepatositlerde TGF-β'nın otokrin üretimi, hepatik stellat hücre proliferasyonunu stimüle eden reaktif oksijen ürünlerini de içeren mitojenik faktörlerin ortama salınımıyla, apoptotik hücre ölümüne katkıda bulunabilecekleri düşünülür (Şekil 1.3.2c).



Şekil 1.3.2c Post inflamatuar faz (Gressner, 1999)

1.4. Antifibrojenik Tedavinin Mevcut Durumu Ve Geleceği

1.4.1. Antifibrojenik Tedavi Kavramı

Antifibrojenik tedaviler, karaciğerde matriks proteinlerini sentezleyen ve yara iyileşmesindeki myofibroblastlara benzeyen aktive mezenşimal hücreleri hedef alan tedavilerdir. Hepatik Stellat Hücre (HSH)/Myofibroblast (MF) proliferasyonu ve kollajen sentezini in vitro olarak birçok ajan inhibe ederken, bu maddelerden çok azının invivo uygun hayvan modellerinde tolere edilebildiği ve etkili olduğu saptanmıştır. Antifibrojenik etkisi gösterilen ajanlar: Bir flavonoid karışımı olan silymarin, baicalein bileşiği içeren sho-saiko-to, diğer bir bitkisel kaynaklı ajan olan halofuginone, fosfodiesteraz inhibitörü pentoksifilin ve oral endotelin A reseptör inhibitörü LU 135252'dir. Hepatit C ve B tedavisinde kullanılan interferon-α'nın fibrozisi durduğu hatta gerilettiği yönündeki retrospektif verilerin, prospektif randomize çalışmalar ile doğrulanması gerekmektedir. TGF gibi profibrojenik sitokinleri solubl

tuzak reseptörleri tarafından inhibe etmeye yönelik stratejiler gelişme halindedir, ancak henüz tatmin edici boyutta tedavi seçenekleri değildirler. Fibrojenik karaciğer hücrelerini hedef alan bazı ilaçlar bulunmuştur Aktive stellat hücrelerde arttığı gösterilen platelet kaynaklı büyüme faktörüne bağlanan siklik peptitler bu ilaçlara örnektir (Chojkeier ve ark., 1988).

Ek olarak bu aktivasyon reseptörlerinin blokajı, fibrojenik hücreleri fibrolitik, kollajen yıkıcı fenotipe dönüştüren stresin relaksasyonunu indüklemektedir. Kullanımı gelişmekte olan fibrogenez ve fibrolizin serum göstergeleriyle bu tedavilerin birleştirilmesi sonucunda, karaciğer fibrozisinin etkili ve bireyselleştirilmiş tedavisinin olabileceği düşünülebilir (Chojkeier ve ark., 1988;Franklin ve ark., 1995).

1.4.2.Problemler

Kronik karaciğer hastalıkları sıklıkla antiviral veya antiinflamatuar ajanların kullanımına rağmen çoğunlukla progresif karaciğer fonksiyon kaybına neden olan skarlaşmaya (siroz) yol açarlar. Bu nedenle tolere edilebilir antifibrojenik tedavilere acilen ihtiyaç vardır. Antifibrojenik ilaçların geliştirilmesindeki majör engel önemli derecede bir fibrozis gelişiminin insanlarda yıllar hatta on yıllar almasıdır. Fİbrozis progresyonunun moniterizasyonunda, fibröz dokunun semikantitatif ve son zamanlarda kantitatif olarak biyopsi takipleriyle tayini altın standart olduğundan, potansiyel antifibrotik ajanların insanlardaki etkisini inceleyen prospektif çalışmaları hemen hemen imkansız kılmaktadır. Bu nedenle, anahtar fibrojenik karaciğer hücreleri olan aktive HSH'ler ve MF'lerdeki proliferasyon inhibisyonu, apoptoz indüksiyonu ve/veya kollajen üretimindeki azalmayı gösteren kanıtlar hücre kültürlerinden elde edilmeli, Takiben in vivo etkinlik ve toksisite uygun hayvan modellerinde gösterilmelidir (Watanabe ve ark., 2003).

Önemli derecede fibrozis 3-10 hafta içinde oluşturulabildiğinden, daha da önemlisi karaciğer kollajen içeriğinin altın standart göstergesi olan total karaciğer kollajeni biyokimyasal metotlarla kolayca ölçülebildiğinden, rat modelleri tercih edilmektedir. Bu deneklerin sayısı her tedavi grubu için 10-20 arasında olmalı ve majör hepatosit nekrozu ile oluşturulmalıdır. Bu özellikler önemlidir, çünkü karbon tetraklorür CCl_4, dimetil nitrozamin ve galaktozaminle indüklenen modellerdeki patolojiler üzerine antiinflamatuar, antinekrotik veya radikal tutucu özellikleri olan ilaçlar gerçekte antifibrotik olmadığı halde, şiddetli nekroz ve kollapsı önleyebilirler. Tercihen fibrozis, safra kanalı oklüzyonuna bağlı biliyer sirozda olduğu gibi inflamasyon ve nekroz olmadan (veya çok az) kronik ve tekrar oluşturulabilir bir şekilde geliştirilmelidir. Ek olarak fibrozis geri dönüşümü modelleri (örneğin karbon tetraklorid veya tiyoasetamid indüksiyonuyla elde edilen modeller) gerçek antifibrotik ilaç etkisini değerlendirmek için iyi alternatif modellerdir. Antifibrotik ajanlar hakkındaki birçok yayın bu kriterlere uymamaktadır (Chojkeier ve ark, 1988)

1.4.3. Potansiyel Antifibrotik Ajanlar

Potansiyel antifibrotik ajanların İncelenmesinde hücre kültürleri kullanılır. Bununla birlikte daha önce belirtildiği gibi bu ajanlar insanlarda denenmeden önce mutlaka uygun hayvan modellerinde in vivo olarak denenmelidir.

Bu ilaçlardan bazıları şu anda faz II veya faz III deneme safhasındadır. Bu çalışmalarda hem biyopsi, hem de karaciğer fibrogenez belirteçleri kullanılmaktadır.

Birçok ümit verici ilaç bitki kaynaklıdır. Devedikeni (milk thistle) belirgin üç flavonoid içerir, bunlar arasında silibin'in kuru ekstrenin %60 kadarını oluşturur. Silibin'in hepatosit RNA sentezini stimüle ettiği, radikal tutucu ve hepatosit proteksiyonunu sağladığı ve HSH proliferasyonu azaltarak kollajen

sentezini baskıladığı in vitro olarak gösterilmiştir. Önemli olarak ratlarda safra kanalı oklüzyonuna sekonder oluşan ve 6 haftada hepatik kollajen akümülasyonunda 10-12 kat artış sağlayan biliyer fibrozis tablosunda, tedavi fibrozisin ilerlemiş safhalarında başlasa bile hepatik kollajen akümülasyonunu %30-40 oranında azaltmıştır (Jia ve ark., 2001). Bu in vivo etkisinin HSH aktivasyonunun azalmasının yanısıra profibrojenik sitokin olan TGF-β1 ve major fibrojenik efektörlerden prokollajen I ve TIMP-I 'in inhibisyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (Schuppan ve ark., 1998).

İlginç olarak, geleneksel Çin ve Japon bitki ekstresı Xiao-chai-hu-tang'ın (Sho-saiko-to veya TJ-9) majör alkaloidi olan Baicalein'nin (silibinin'e benzer yapıda) hem in vitro olarak aktive HSH'lerde, hem de in vivo olarak ratlarda domuz serumuyla indüklenmiş fibroziste oksijen radikal düzeyini azalttığı ve belirgin antifibrotik etkisi olduğu gösterilmiştir (Schuppan ve ark., 1998; Shimizu ve ark., 1999).

Antimalaryal bitki olan Dichroa febrifuga'dan elde edilen semisentetik alkaloid derivesi halofuginone potent antifibrotik olarak son zamanlarda ilgi çekmektedir. Halofuginone'nun kollajen sentezi inhibisyonuna bağlı deri gerilme kuvvetini azalttığı saptandığında, veterinerlikte antikoksidiyal ajan olarak kullanılıyordu (Border ve ark., 1994). Bu antifibrotik etki, fibrozisteki majör kollajen olan prokollajen α_1, için spesifik gibi görünmektedir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada thioacetamide ile indüklenmiş hepatik fibroziste fibrozisin reversiyonu modelinde halofuginonun hepatik kollajen miktarını normale döndürdüğü saptanmıştır (Pines ve ark., 2000).

Pentoksifilin, deri fibroblastları ve HSH'lerin kollajen üretimi ve proliferasyonlarını in-vitro olarak kuvvetli bir şekilde baskılamaktadır. Pentoksifilin sinyal molekülü stat-1'i indükleyip, fosfodiesterazı inhibe ederek hücre içi cAMP düzeylerinin artışına neden olmaktadır.

Pentoksifilin in-vitro antifibrotik etkisinde hem stat-1 hem de cAMP sorumludur. Bununla birlikte rat biliyer fibrozisinde oral pentoksifilin hepatik kollajen akümülasyonunu sadece %20 oranında azaltmıştır. İlaç hepatik prokollajen α, down regülasyonu ve profibrojenik stokinlerden TGF-β1 ve bağ dokusu büyüme faktörü supresyonunu artırmaktadır (Schuppan ve ark., 1998).

Oral endotelin A reseptör (ETAR) aktivasyonları HSH/MF kontraksiyonuna, proliferasyonuna ve muhtemelen kollajen sentezine aracılık ederken, endotelin B reseptörleri (ETBR) MF relaksasyonuna ve proliferasyonunun inhibisyonuna aracılık ederler (Schuppan ve ark., 1998).

Rat biliyer fibrozisinde deneyin 6. haftasından sonra verilen oral ETAR antagonisti olan LU 135252'nin (ETAR)ü ETBR'e göre 130 kat daha fazla afinite gösterir. Karaciğer kollajeninde 4 kat artışın gözlendiği, 3 haftadan sonra başlandığında dahi %40'a ulaşan oranda fibrozisi önlediği gösterilmiştir. ETAR antagonizmasının önemli bir etkisi de endotelin-1 tarafından indüklenen HSH/MF kontraksiyonu ile artan portal basıncın düşmesine yol açmasıdır.

Kısa süre önce bir prokollajen C proteinazı ve lizil-oksidaz-sentezleyen enzim olan kemik morfogenetik protein (BMP)-1 tanımlanmıştır. Bu proteinin inhibisyonu teorik olarak ekstraselüler kollajen fibril oluşumunu ve çapraz bağlanmayı durdurması amaçlanmıştır (Schuppan ve ark., 1998). Kollajen biosentezinde, kollajen geninden m-RNA transkripsiyonu olur. Bu mRNA kaba endoplazmik retikulum da proteine çevrilir. Translasyon sürecinde yeni polipeptid zincirleri lizin ve prolin kalıntıları üzerine hidroksile edilir, glikolize edilir ve tripl heliks formasyonu oluşur. Sekrete edildikten sonra N ve C terminal protopeptidleri proteazlar tarafından ayrılır ve fibril gelişimi oluşur. Daha sonra bu fibriller kovalent çapraz bağlantılar ile stabilize edilir. Antifibrotik yaklaşımlar şu aşamalara yönlenebilir;

- Kollajen genine spesifik transkripsiyon faktörlerinin blokajı,
- Prolil hidroksilaz enzim aktivitesinin blokajı (HOE077 ve S 4682 vb. ajanlar ile) aracılığıyla termodinamik stabil üçlü heliks kollajen oluşumunun engellenmesi (Bataller ve ark., 2001),
- Prokollajen peptidleriyle kollajen gen transkripsiyonu ve kollajen m-RNA translasyonunun bloke edilmesi,
- Ekstrasellüler kollajen fibrillerinin çapraz bağlanmasını ve böylece stabilizasyonunu sağlayan matriks enzimi lizil hidroksilazın bloke edilmesi,
- Prokollajen oluşturan enzim olan prokollajen C proteinazın (BMP-1)'in blokajı,
- Metalloproteinazların lokal olarak aktive edilmesi (uPA-urokinaz-tip plazminojen aktivatör) (Bataller ve ark., 2001) oluşmakta olan fibrotik dokuyu çözebilir.

Bütün aşamalar in vitro olarak fibroblastik hücreler için majör bir toksisite oluşturmadan inhibe edilebilir. Ama bu güne kadar denenen ajanların çoğu organizmanın bütünü için toksiktir veya aktive hepatik stellat hücreler veya portal fibroblastlar gibi hedef hücrelere ulaşamazlar. Örneğin, stabil kollajen moleküllerinin sentezinde esansiyel bir enzim olan prolil hidroksilaz inhibitörleri in vivo olarak fibroblastik hücrelere ulaşamadığından etkisizdirler.

İlaçların fibrojenik karaciğer hücrelerine ulaşmasını sağlayacak çalışmalar yeni tedavi yöntemleri geliştirme yolunda önemli olabilir. Örneğin, özel matriks reseptörlerine veya aktive hepatik stellat hücrelerde upregüle olan PDGF-α' ya bağlanma yöntemlerinin geliştirilmesi faydalı olabilir. Lipozomlar veya eritrosit hayaletleri gibi ilaçla yüklü vezikül taşıyıcı sistemler de potansiyel olarak faydalı olabilir. Bu partikül taşıyıcıları karaciğerde makrofajlar tarafından sindirilir, ortama bırakılan farmakolojik olarak aktif bileşikler, sadece Kupffer hücrelerini değil, hepatik stellat hücreler gibi komşu hücreleri de etkilerler. Karaciğer için selektivite yaklaşık %80'dir, kalan kısmı dalak, akciğer ve kemik iliği tarafından dolaşımdan alınır. Bu tür hedefleme

yaklaşımı teorik olarak, makrofajlarının fibrojenik aktivitesini etkileme, hepatik stellat hücrelerin duyarlılığını düzenleme, kollajen ve diğer ekstrasellüler matriks bileşenlerinin sentezine müdahale etme imkanı sağlayabilir. Eritrosit hayalet sistemlerinin geçmişte enzim replasman tedavisinde başarıyla kullanılmış olmasına rağmen, antifibrojenik çalışmalara uyarlanmaları henüz gerçekleşmemiştir (Chojkier ve ark., 1988; Gressner ve ark., 1999).

Fibrojenik büyüme faktörleri ve sitokinlerin nötralizasyonu veya ortadan kaldırılması bir başka tedavi hedefidir. TGF-β1 için böyle bir mekanizma gösterilmiştir. Kritik bir profibrojenik molekül olan TGF-β1 ekstrasellüler matriks birikimini artırmakta ve kollajenaz aktivitesini inhibe etmektedir (Border ve ark., 1994). Küçük bir matriks proteoglikanı olup ekstrasellüler matriksten TGF-β1' i uzaklaştıran dekorin'in intravenöz uygulanması ve dekorin geninin intramüsküler verilmesi antikor ile oluşturulan bir glomerül inflamasyonu modelinde renal granülasyon dokusunun oluşumunu engellemiştir (Marcel ve ark.1997, Schuller-Levis ve ark.1994). Otokrin yolla hücre proliferasyonunu ve kollajen üretimini artıran TGF-β ile uyarılan hücrelerde konnektif doku büyüme faktörlerinin nötralizasyonu daha spesifik bir tedavi yaklaşımı olabilir. Konnektif doku büyüme faktörleri sadece mezenşimal hücrelerde etkili olduğundan immünosüpresyon ve epitelyal apoptoz gibi anti-TGF-β tedavisinin sistemik yan etkileri görülmeyebilir (Border ve ark.1994).

Hepatik stellat hücrelerde bulunan peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) önemli etkilere aracılık ederler. PPAR-γ birçok doku tipinde büyüme ve farklılaşmayı kontrol eden reseptör transkripsiyon faktörüdür. Hepatik stellat hücre aktivasyonu sürecinde PPAR-γ düzeyi azalır. PPAR-γ ligandları hepatik stellat hücrelerde profibrojenik ve proinflamatuar etkileri inhibe ederken hasarlı karaciğerde kollajen birikimi azaltıp kollajenaz aktivitesini artırırlar (Bataller ve ark., 2001).

Hücre büyümesi ve farklılaşması için histon proteinlerinin deasetilasyonu

gerektiğinden histon deasetilazlarının inhibitörlerinin kullanılması hepatik stellat hücre aktivasyonunu engelleyebilir. Bir histon deasetilaz inhibitörü olan Trichostatin A, hepatik stellat hücre aktivasyonunu in vivo ve in vitro baskılayarak fibrozisi azaltmıştır (Bataller ve ark., 2001). Ancak bu yaklaşımın güvenliği üzerinde yeni çalışmalar gerekmektedir.

Hepatik stellat hücreler için potent bir mitojen olan PDGF' ün (Pinzani ve ark., 1989) veya karaciğer parankim hücreleri için önemli bir mitojen olup aşırı üretim yapılan bölgelerde kollajenlere bağlanan HGF (Schuller-Levis ve ark., 1994;Yasunobo ve ark., 1997) aktivasyonunun lokal olarak azaltılmasını hedefleyen yöntemler de tedavi yaklaşımı oluşturabilir. Bu büyüme faktörlerinin ekstraselüler matrikste depolanmasını engelleyen veya ortadan kaldıran peptid analogları dizayn edilebilir. Matriks reseptörlerinin bloke edilmesi fibrojenik fenotipi geri çevirmek için bir diğer yaklaşım olabilir. Bundan yola çıkarak fibronektin ve diğer ekstraselüler matriks moleküllerinde integrin bağlayan bir motif olan tripeptid Arg-Gly-Asp (RGD)' in bir analoğu immün kaynaklı bir karaciğer hasarı modelinde fokal adezyon kinazının tirozin fosforilasyonunu azaltarak fibrozisi inhibe etmiştir. İlginç olarak fibronektinin bir varyantında bulunan ekstra domain III kültür ortamındaki hepatik stellat hücrelerde miyofibroblastik fenotipi indüklemiş ve bu domaine karşı oluşturulmuş bir nötralizan antikor bu aktivasyon basamağını geri çevirmiştir (Schuppan ve ark, 1998).

Fumagilinin semisentetik bir analoğu olup antianjiojenik özelliklerinden dolayı kanser tedavisinde kullanılan TNP-470' in, hücre siklusunu G1' den S fazına geçişte bloke ederek hepatik stellat hücre proliferasyonunu bloke ettiği bildirilmiştir (Bataller ve ark., 2001).

Umit verici diğer bir hedef de fibrojenik hücrelerin stres relaksasyonunun uyarılmasıdır. Bu reaksiyon integrin reseptörü aracılı bir olay olup kollajen sentezinde azalma ve kollajenaz aktivitesinde artmaya neden olur. Mezenşimal hücrelerin ''stresli'', iki boyutlu çevreden (yara oluşumuna benzer

çevre) "relakse", üç boyutlu çevreye taşınmaları ile oluşur (durağanlaşmanın başlaması). PDGF ve diğer mitojenik büyüme faktörleri aracılığıyla iletilen sinyaller relaksasyon sonrasında durur. Ayrıca bu, sinyal iletimi için integrinin gerekliliğini de açıklayabilir (Gressner ve ark., 1999;Schuller-Levis ve ark., 1994). Bu doğrultuda, solubl kollajen VI uygulanması ile birçok mezenşimal hücre ve hepatik stellat hücrede potent büyüme sağlanması önemli bir bulgudur (Schuller-Levis ve ark., 1994). Kollajen VI kaynaklı peptidler stres relaksasyonunu uyarıp nonfibrojenik hücresel fenotipin geri dönmesini sağlayabilir.

Kronik viral hepatitlerde günümüzde kullanılan en önemli tedavi ajanı olan interferonlar (IFN), IFN-α, IFN-β, IFN-γ olmak üzere üç ana grupta incelenen proteinlerdir (Lake ve ark., 2001). IFN-α ve IFN-β' ya Tip-I interferonlar denmektedir. Bunlar aside dayanıklı olup hedef hücrede aynı reseptöre etki ederler. IFN-γ' ya ise Tip-II interferon adı verilmektedir ve aside dayanıklı olmayıp hedef hücrede ayrı bir reseptöre etki eder. IFN-α lökosit, IFN-β fibroblast ve epitel hücreler, IFN-γ ise aktive T lenfositlerince salgılanır. Son yıllarda geliştirilmiş bir protein modifikasyonu tekniği olan "pegilasyon" ile IFN molekülünde değişiklik yapılmış ve abzorbsiyonu geciktirilmiş, renal klerensi azaltılarak yarılanma ömrü haftada bir uygulanabilecek düzeyde artırılmıştır. IFNα2a molekülüne molekül ağırlığı 40000 dalton olan dallı zincirli PEG (polietilenglikol) molekülü kovalent bağla eklenmiştir. IFNα2b molekülünün ise histidin-34 bağına molekül ağırlığı 12000 dalton olan, tek, düz zincirli PEG molekülü eklenmiştir. Oluşan proteinlere peginterferon adı verilmiştir. Bu proteinlerin viral hepatitlerde konvansiyonel interferonların klinik etkinliğine sahip oldukları kontrollü çalışmalarla gösterilmiştir. Hücre proliferasyonunu engelleyici etkileri de rapor edilmektedir. Yapılan çalışmalarda yeni moleküller eskileriyle kıyaslanmış olup yeni moleküllerin özellikle fibrozis üzerine olumlu etkilerini gösteren araştırma bildirmişlerdir (Taşçı ve ark 2003).

Taurin (2-aminoethanesulfonic asid) hemen tüm memeli dokularında bulunan

yarı esansiyel bir sülfür aminoasididir. Genel olarak proteinlerin yapısına katılmamakla beraber dokularda serbest olarak bulunur. Diyetteki et ve sebzelerle alınmakla birlikte sistein ve metiyoninden de sentez edilebilir. Taurinin çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Başlıca en iyi bilinen fonksiyonu safra asitlerinin konjugasyonu olup, ayrıca detoksifikasyon, membran stabilizasyonu, osmoregülasyon ve hücresel kalsiyum seviyesinin modülasyonu gibi diğer bilinen fonksiyonları da mevcuttur. Klinik olarak taurin birçok durumda tedavi ve deneysel amaçlı kullanılmıştır. Başlıca kardiyoloji, nöroloji, göz hastalıkları, diyabet ve hepatoloji alanlarında kullanılmaktadır (Holecek ve ark., 1990; Nakashima ve ark., 1982; Nakashima ve ark., 1996).

Taurin molekülü diğer aminoasitlerden farklı olarak karboksilik asit yerine sülfonik asit içermektedir. Bu nedenle proteinlerin yapısına katılmadan serbest olarak bulunur. Vücutta taurin esansiyel aminoasit olan metiyonin ve nonesansiyel aminoasit sisteinden sentezlenir. insanlarda sisteinden taurin sentezinde sülfonik asit dekarboksilaz enziminin anahtar rolü olduğu saptanmış olup yapılan çalışmalarda kedilerde bu enzim olmadığından taurini diyet yoluyla karşılamak zorunda oldukları bulunmuştur (Jack ve ark., 1992).

İnsanlarda bilinen 5 tür safra asidi mevcut olup bunlar; kolik asit, kenodeoksikolik asit, deoksikolik asit, ursodeoksikolik asit ve litokolik asittir Her bir safra asidi C-24 pozisyonundaki glisin veya taurin ile konjuge olabilmektedir. Safra asitlerinin konjugasyonu karaciğerdeki taurin konsantrasyonuna bağlı olup, hepatik glisin konsantrasyonundan etkilenmemektedir (Timothy ve ark., 1998). Safra asit sentezinde kolesterol 7α hidroksilaz enzimi hız kısıtlayıcı enzim olup taurin bu enzim miktarını arttırmaktadır. Karaciğerde kolesterol miktarı fazla olduğu durumlarda bu enzim üzerinden taurin ile konjuge safra asit yapımı uyarılmakta ve kolesterol miktarı düşürülmektedir Taurin ile yapılan çalışmalarda, hiperkolesterolemi oluşturulan hayvan modellerinde hipokolesterolemik etkisinin olduğu

gösterilmiştir. Taurin bu etkisini hem lipoprotein lipaz enzim aktivitesini hem de periferik dokulardan karaciğere kolesterol transferini sağlayan dolaşımdaki apoE-HDL (HDL_1) miktarını artırarak sağlamaktadır. Ayrıca şilomikron ve VLDL gibi triaçilgliserolden zengin lipoproteinlerin hidrolizine de yol açmaktadır (Hiroshi ve ark., 1996).

Kalpteki total aminoasit havuzunun ise %50'sinden fazlası taurinden oluşmaktadır. Kardiyak dokuda taurinin pozitif inotropik etkisi olup bazı çalışmalarda kan basıncını düşürdüğü gözlemlenmiştir Bu etkilerini intrasellüler kalsiyum homeostazını düzenleyerek gerçekleştirdiği saptanmıştır. Taurinin düşük kalsiyum konsantrasyonlarında pozitif İnotropik etkisi varken, yüksek kalsiyum konsantrasyonlarında negatif inotropik etkileri de saptanmıştır. Taurinin, ilaçlarla oluşan kardiyak toksisiteye karşı koruyucu özellikleri vardır. Taurinin sodyum iyon kanalları üzerine de etkisinin olduğu ileri sürülmektedir Konjestif kalp yetmezliği tanısı almış olan 17 hasta üzerinde 6 hafta boyunca 3 gr/gün dozunda taurin verilerek yapılan plasebo kontrollü bir çalışmada, taurinin sistolik sol ventrikül fonksiyonlarında anlamlı derecede düzelme sağladığı gösterilmiştir (Junichi ve ark., 1992). Yapılan bazı çalışmalarda taurinin, nötrofillerle oluşan reperfüzyon zedelenmesi ve oksidatif stres ürünlerinden koruyabileceği ileri sürülmüştür (Thomas ve ark., 1996). Bu etkisini antioksidan özelliği sayesinde gerçekleştirmesi muhtemeldir (Eppler ve ark., 2001;Nakashima ve ark., 1983). Taurinin hepatokarsinogenez üzerine olan etkisini araştırmak için yapılan bir çalışmada, taurinin lipid peroksidasyona karşı koruyucu olduğu, membran stabilizasyonunu sağladığı ve antioksidan bir enzim olan glutatyon peroksidaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Jeong ve ark., 1998). Miwon ve arkadaşlarının indometazin ile oluşturdukları deneysel gastrik zedelenmede, taurinin lipid peroksidasyon ve nötrofil aktivasyonunu inhibe ederek, antioksidan özelliğinden dolayı mukoza koruyucu etkisinin olduğunu göstermişlerdir (Miwon ve ark., 1996)

Taurinin karaciğerdeki miktarının azalması CCl_4 gibi bazı hepatotoksinlere

karşı olan duyarlılığını arttırmaktadır. Deneysel amaçlı kullanılan CCl4 karaciğerde toksik radikal forma dönüşerek lipid peroksidasyona neden olmakta ayrıca hücresel makromoleküllerle kovalent bağlanmalar yaparak toksisiteye yol açmaktadır. İn vitro kültür ortamında yapılan bir çalışmada taurinin hücre koruyucu etkisinin hasarlanma esnasında azalan hücresel poliaminlerin ve tiyol gruplarının miktarını arttırarak sağladığı ileri sürülmektedir (Nakashima ve ark., 1996; Nakashima ve ark, 1996). Taurin hepatik poliaminlerdeki azalmayı engellemektedir. Taurinin koruyucu etkisinde poliaminlerin önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (Chen ve ark., 1999;Wu ve ark., 1997). Dolayısıyla oksidatif stres ürünlerine karşı koruyuculuğu muhtemel gözükmektedir. Hepatik taurin seviyesindeki azalmanın karaciğeri toksik maddelere karşı duyarlılaştırdığı bilinmektedir (Catherine ve ark., 1999;Guertin ve ark., 1997). Yapılmış olan invitro gözlemlerde taurinin fibrotik süreçte aşırı kollajen birikimini azalttığı saptanmıştır (Jack ve ark., 1992;Jhon ve ark., 1996) Yaşlanmayla birlikte taurin seviyesinin azaldığının deneysel olarak ratlarda gösterilmesiyle beraber bu durumun oksidatif strese karşı yatkınlığı kolaylaştırabileceği ileri sürülmektedir (Eppler ve ark., 2001). Etanol ile oluşturulan hepatik steatozda taurin verilmesi hepatik steatozun derecesini düşürmüş ve lipid peroksidasyonu engellemiştir (Kerai ve ark., 1998).

1.4.4. Fibrozisin Kendiliğinden Gerilemesi

Hemokromatozis, interferon ve diğer antiviral ajanlarla tedavi edilen viral hepatitler, steroid ve immunosüpresiflerle tedavi edilen otoimmün aktif hepatit, biliyer dekompresyon yapılan sekonder biliyer fibrozis ve subletal parasetamol hasarında olduğu gibi altta yatan hastalık başarılı şekilde tedavi edildiğinde akut veya kronik karaciğer hasarı spontan olarak geriye dönebilir. Rezolüsyon ekstrasellüler matriksin azalması ve normal veya normale yakın yapının tekrar oluşması ile karakterize olup bazen yıllar alabilir. Yapılan çalışmaların çoğunda direkt olarak gösterilmemiş olsa da, bu normale dönüş

aktive hepatik stellat hücre sayısında azalma veya aktivasyon konumunda değişime bağlıdır. Parasetamol kaynaklı akut hasar ile ilgili yapılan çalışmada alfa düz kas aktin (α-SMA) sentezleyen, aşırı miktarda, miyofibroblast benzeri, aktive hepatik stellat hücre tesbit edilmiştir. Rezolüsyon döneminde ise bu α-SMA pozitif hücrelerin kaybolduğu gösterilmiştir (Iredale ve ark., 2001).

İyileşme döneminde, hepatik stellat hücre davranışını gözlemlemek için fazla sayıda örnekleme ve kronolojik takip yapılabildiğinden hayvan modelleri çok iyi araçlardır. En sık kullanılan iki model vardır. Bunlardan birinde safra kanalı ligasyonu yapılarak biliyer fibrozis oluşturulurken, diğerinde CCl_4 uygulanarak (Iredale ve ark., 1998; Iredale ve ark, 2001) parankim hasarı oluşturularak fibrozis indüklenir.

Safra kanalı ligasyonu yapılan rodentlerde üç hafta sonra biliyer fibrozis ile belirgin duktüler proliferasyon gelişir. İnterstisyel kollajen sentezi ve aktive hepatik stellat hücre sayısında belirgin artış oluşur (Iredale ve ark., 1998; Iredale ve ark, 2001). Ancak bu lezyon tamamen geriye dönüşüme müsaittir. Biliojejunal anastomoz sonrasında, altı hafta içinde fibrotik dokuda rezorbsiyon ve aktive hepatik stellat hücre sayısında (ve prolifere safra kanallarında) azalma oluşur. Parankimal hasar modelinde ise tek doz CCl4 uygulamasının ardından α-SMA pozitif aktive hepatik stellat hücre sayısında artış oluşur (Iredale ve ark., 1998; Iredale ve ark, 2001)Eğer enjeksiyon tekrarlanmazsa bu durum hızla geriye döner. CCl4'ün dört hafta intraperitoneal uygulanması ile ratlarda vasküler yapılarda köprüleşme yapan, fibrotik septalarla karakterize karaciğer fibrozisi gelişir.

Her iki modelde de aktive hepatik stellat hücre sayısı fibrozis ilerledikçe artar. Bundan sonra, α-SMA boyama yöntemiyle gösterilen aktive hepatik stellat hücre sayısı azalır ve normale yakın ancak yine de normalden fazladır. Dikkatli analiz edilirse, hepatik stellat hücre kaybının en fazla olduğu dönemde aktive hepatik stellat hücre apoptozu mevcuttur (Iredale ve ark.,

1998; Iredale ve ark, 2001). Yani, rezolüsyon döneminde apoptoz ile hem ekstraselülüer matriks üreten hem de bu matriksin yıkımını inhibe eden TIMP'leri sentezleyen hücrelerin yani aktive hepatik stellat hücrelerin ortadan kaybolması sağlanır. Apoptoz ile aktive hepatik stellat hücrelerin azalması fibrotik matriksin metalloproteinazlarca (MMP) yıkımını da kolaylaştırır. MMP'lar apoptoza gitmek üzere olan veya apoptoz sürecinde olan aktive hepatik stellat hücreler, durağan hepatik stellat hücreler veya diğer karaciğer hücrelerinde sentezlenmektedir. Bu modellerde, MMP-13 (insanlardaki MMP-1' in karşılığı)'ün majör kaynağı hepatik stellat hücreler olamayacağı şeklinde görüşler vardır. Bu görüşün en önemli desteği hepatik stellat hücre sayısının azalmasına rağmen MMP-13 düzeyinin değişmediğinin gösterilmesidir. TIMP-1 ve kollajen-1 düzeyleri ise aktive hepatik stellat hücre sayısındaki azalmayla orantılı olarak azalmaktadır (Iredale ve ark, 1998). Bu nedenle, Kupffer hücreleri veya inflamatuar hücreler bu MMP-13 veya interstisyel kollajenaz aktivitesi için potansiyel kaynaklardır. Bugüne kadar, iyileşme döneminde bu kollajenazların kaynağına değinen bir tek çalışma yayınlanmıştır (Iredale ve ark, 2001). Her ne kadar hepatik stellat hücreler MMP-13 kaynağı gibi görülse de MMP-2 ve MMP-14 gibi diğer MMP'ların da kollajenaz aktivitesi olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda progresif fibrozis döneminde aktive hepatik stellat hücre sayısında artışa paralel olarak apoptotik hepatik stellat hücre sayısında da artma tespit edilmiştir. Bu nedenle progresif fibrozisin her döneminde hepatik stellat hücrelerin toplam sayısı proliferasyon ve apoptoz arasındaki dengeyi yansıtmaktadır. Apoptoz in vivo olarak 30 dk.' dan daha az bir sürede gelişen hızlı bir proçestir (Iredale ve ark, 2001).

Apoptoz memelilerde vital bir fonksiyondur. Sayıları çok artmış, istenmeyen, organizmaya potansiyel olarak zarar verebilecek hücrelerin uzaklaştırılmasını sağlar. Programlanmış hücre ölümü de denmektedir. CCl_4 kaynaklı fibrozis modelinde gösterildiği gibi bir dokudaki toplam hücre sayısını dengelemektedir.

Multisellüler organizmaların çoğunda apoptoz mekanizması vardır. İki temel hücre içi yolaktan oluşur. Birincisi, çok spesifik hücre yüzeyi ölüm reseptörleri ve ligandlarının bulunduğu yolaktır. Bunlara örnek Fas (CD 95, APO-1) ve Fas ligandı verilebilir. Liganda bağlandığında bu reseptörün hücre içi ölüm bölgesi aktive olur. Bu da kaspas 8 ve kaspas kaskadının alt komponentlerini aktive eder. Kaspas 3 aktive olana kadar apoptotik cevap amplifiye edilir ve hücre apoptoza gider. İkinci yolak mitokondride başlar. Mitokondrial membranda pro ve antiapoptotik proteinler vardır (sırasıyla Bax ve Bcl-2 ailesinin üyeleri örnek verilebilir). Apoptotik proteinler predomine ve homodimerize olunca, mitokondriden sitokrom C salınır ve hızla apaf-1 ile kompleks yapar. Bu kompleks daha sonra kaspas 9'u aktive ederek kaspas kaskadı aracılığı ile apoptotik cevabı artırır. Kaspasların birçok substratı vardır. Aktivasyonları bir seri olaylar zincirini başlatır ve sonuçta debris halini alan hücre artıkları fagositler ve diğer çevreleyen hücrelerce yutulur. Fagositik proçes inflamatuar cevabı da düzenleyebilir. Apoptotik debris fagositleri, makrofajlardan proinflamatuar mediatörlerin salınımını azaltabilir. Bu bulgular karaciğer açısından önemlidir çünkü apoptoz ve hepatik stellat hücre azalması ile hepatik inflamasyon aktif olarak baskılanabilir (Iredale ve ark, 2001).

Kaspaslar aktive olunca apoptoz mekanizması çalışmaya başlar. Nükleer laminlerin kırılması sonucunda nükleusun büzüşmesi ve tomurcuklanması, sitoplazmik iskelet proteinlerinin kırılması ile hücre şeklinin bozulması ve sonuçta hücrelerin küçük apoptotik cisimciklere parçalanarak çevre hücrelerce fagosite edilmesi bu mekanizmayı oluşturan olaylar zinciridir. Ek olarak, hücresel DNA'nın spesifik bir oligonükleosomal tarzda kırıldığı görülmektedir. Bu durum jel elektroforezi ile tek zincir olarak tespit edilebilir (Iredale ve ark, 2001).

Bir modele göre özellikle bir yaşamsal faktör veya sinyal olmadığı sürece bütün hücreler apoptoza gitmeye programlanmıştır (Iredale ve ark, 1998). Rezolüsyon sürecinde gerçekleşen stellat hücre apoptozu bu modele çok iyi uymaktadır. Bu modele göre apoptoz antiapoptotik bir uyarı olmadıkça

durmayan genel gidiş yoludur. Karaciğerde hasar oluşturan etken ortadan kalkınca, rezolüsyon oluşması için fazladan oluşmuş fibrotik matriksin yeniden yapılanması gerekir. Bu da aktive hepatik stellat hücrelerin sayısının azalması ile olur. Aktive hepatik stellat hücrelerin yaşamalarını sağlayan, bir veya daha fazla hücresel veya çevresel uyarı olabilir. Hem solubl faktörlerin hem de matriks komponentlerinin aktive hücrelerin yaşamı için gerekli olduğuna dair kanıtlar gittikçe artmaktadır.

Karaciğer hasarında hepatositler ve hepatik stellat hücreler IGF-1 sentezlerler (Max ve ark, 1992). IGF-1 birçok hücre türü için antiapoptotiktir (prosurvival etki). Kültürde aktive edilen hepatik stellat hücrelerde IGF-1 apoptozu engellemektedir. Ek olarak TNF-α ve TGF-β (bunların her ikisi de karaciğer hasarında salgılanır) hepatik stellat hücrelerin yaşamalarına katkıda bulunabilir. Ancak, IGF-1'den farklı olarak bu sitokinler Fas/Fas-L sistemi aracılığı ile etkilerini gösterebilirler. IGF-1'e zıt olarak, hepatik stellat hücreler için potansiyel bir mitojenik olan PDGF oldukça düşük antiapoptotik aktiviteye sahiptir.

Ekstrasellüler matriksten de önemli yaşam sinyalleri çıkmaktadır. Aktive stellat hücrenin fenotipik durumu temas halinde bulunduğu subsellüler matriksin içeriği ile oldukça yakın ilişkilidir. Kollajen matrikste kültüre edilen aktive stellat hücreler plastik veya Engelbreth-Holm-Swarm matrikste kültüre edilenlere göre apoptoza daha meyillidirler. Engelbreth-Holm-Swarm matriks rat sarkoma hücrelerinden elde edilen bazal membran benzeri kompleks bir besiyeridir. Aktive hücreler Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) matrikse taşınırsa durağan konuma geçerek apoptoza dirençli hale gelmektedirler. Bu veriler aktive hepatik stellat hücrelerin durağan olanlara göre apoptoza daha duyarlı olduğuna işaret etmektedir. Daha detaylı çalışmalarda stellat hücrelerin matriks ile temasının engellenmesiyle apoptozun arttığı gösterilmiştir. Buna anoikis adı verilmektedir (Iredale ve ark, 2001). Sonuç olarak, aktive fenotipteki stellat hücreler apoptoza kolayca gidebilmekte ancak, solubl büyüme faktörlerinden gelen kompleks sinyaller ve sitokinler de fibrotik

matriks devamlılığına katkıda bulunmaktadır. Solubl yaşam faktörlerinin konsantrasyonunun azalması, spesifik matriks komponentlerinin yıkılması veya hücrelerin matriks ile temastan uzaklaşması tek başına veya birlikte hepatik stellat hücreler apoptozunu uyarabilir.

TIMP-1'in yaşam faktörü özelliğinin olduğuna dair gittikçe artan kanıtlar vardır. Kısa süre önce TIMP-1'in otokrin yolla hepatik stellat hücre apoptozunu engelleyici etkisinin olduğu gösterilmiştir (Schuppan ve ark, 1998). Lenfoma ile ilgili çalışmalarda TIMP-1'in antiapoptotik etkisinin MMP aktivitesini inhibe etmesinden bağımsız olduğu bulunmuştur. Bu önemli bir bulgudur. Çünkü hepatik stellat hücreler gibi Fas eksprese eden hücrelerde apoptozu tetikleyen hücre yüzeyi Fas Ligandlarının sentezi MMP tarafından artırılırken, TIMP-1 tarafından inhibe edilmektedir (Iredale ve ark). Stellat hücrelerde MMP aktivite artışının matriks yıkımı ve apoptoza aracılık ettiğini doğrudan tanımlayan veriler yeni yeni ortaya çıkmaktadır. Yapılan yeni bir çalışmada TIMP-1' in antiapoptotik etkisinin MMP inhibisyonuna bağlı olduğuna dair güçlü kanıtlar elde edilmiştir (Murphy ve ark., 2002). Epitel hücresi survival modellerinde, doku kültüründe veya in vivo olarak spesifik MMP'lerin sentezinde artma bu hücrelerin programsız apoptozuna sebep olmaktadır. Bu proçes hücre-matriks etkileşiminde gerçekleşen kritik bir değişiklik sonucunda olabilir. Bu problem degradasyona dirençli bir matriks kullanarak da değerlendirilmiştir. İnterstisyel kollajenaza dirençli mutant kollajen-I ekspresyonu varlığında, iyileşme döneminde hepatik stellat hücre kaybı olmamaktadır. Bu verilere göre kollajen-I' in veya kollajen-I içeren matriksin aktive hepatik stellat hücreler için yaşama sinyalleri ürettiği kabul edilebilir (Iredale ve ark., 2001).

Hücrelerin apoptoza gitmesine yol açan bir diğer önemli uyarı kaynağı TNF reseptör süperfamilyasının (TNFR) bazı üyeleridir. Bu transmembran reseptörler birçok hücre türünde bulunurlar(özellikle immün sistem, beyin ve sinir sistemi). Hücre dışını kaspas kaskadına ve hücresel apoptotik mekanizmalara bağlarlar. Yapıları oldukça benzerdir. Uygun bir ligand ile

birleştiğinde reseptörü aktive eden ekstrasellüler bir kısmı vardır. Reseptörün ekstrasellüler kısmına transmembran ve intrasellüler bölümler bağlıdır. İntrasellüler kısımla ilişkili, ölüm bölgesi proteinleri de denen bir intrasellüler kısım kompleksi vardır (Iredale ve ark., 2001). Bu ölüm bölgeleri kaspas kaskadının başlangıç komponentlerini aktive ederler ve apoptotik cevap oluştururlar. Ölüm bölgesi taşıyan TNF reseptörlerine ölüm reseptörleri denmektedir. Bu ailenin en iyi tanımlanmış üyesi Fas (CD 95 veya APO-I)' dır (Iredale, 2001). Fas/Fas ligand sistemi immün sistemde klonal delesyonda ve virüsle infekte hücrelerin sitotoksik T lenfositlerince öldürülmesinde önemlidir. Ek olarak, her ne kadar Fas ligand genel olarak membrana bağlı olsa da MMP bağımlı bir proçes ile soluble form Fas ligand oluşmak üzere kırılabilir ve böylece Fas stimülasyonu ve apoptoz kolaylaşabilir. Aktive hepatik stellat hücreler Fas eksprese ederler ve Fas ligand uyarımı ile apoptoza giderler. Aslında, hepatik stellat hücrelerin aktivasyon durumu Fas ligand ekspresyonu ile ilişkilidir (Iredale ve ark., 2001). Bu da, otokrin Fas ligand ekspresyonunun stellat hücre apoptozunda major bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir. Hatta, hasar sırasında salgılanan spesifik büyüme faktörleri de Fas/Fas ligand aracılığı ile hepatik stellat hücre apoptozunda görev alabilirler. Stellat hücrelerden, TNFR superfamilyasının bir diğer üyesi olan NGF (sinir büyüme faktör) reseptörü (veya P75) ekspresyonunu da artırırlar. Bu reseptör bir ölüm bölümüne bağlıdır ve uygun bir ligand uyarısı (NGF gibi) apoptozla sonuçlanır. Hem Fas hem de P75' in in vivo fibrotik karaciğerde hasar sırasında hepatik stellat hücrelerde eksprese edilmeleri bu iki reseptörün de stellat hücre apoptozunda önemli olduğunu düşündürmektedir. Ek olarak, hepatik stellat hücreler P75 ligandlarının bir kaynağı da olabilir. Bu da apoptoz için düzenleyici daha ileri bir otokrin basamağın olduğuna işaret edebilir (Max ve ark, 1992). Ayrıca, fibrotik hasar süresince fibrozise yakın bölgelerde çoğalan mast hücreleri potent NGF kaynağıdır. Bu nedenle, TNFR ölüm reseptör ailesinin stellat hücre apoptozunu düzenleyebileceğine yönelik belirgin kanıt vardır. Hatta, hasarlı bölgeye göç eden hücrelerce ölüm reseptör ligandlarının üretilmesi inflamatuar ve immün hücrelerin de apoptoz aracılığı

ile hepatik stellat hücre sayısına etki ettiği bir mekanizmayı göstermektedir.

Yara iyileşmesinde görev alan bazı hücre tiplerinde (glomerül mezengial hücreleri gibi) NF-κB aktivasyonu ile apoptoza direnç oluşturulur. Hücre kültürü modellerinde hepatik stellat hücre aktivasyonunda NF-κB aktivasyonu anahtar bir nükleer olaydır. Hatta, NF-κB ekspresyonu ve aktivasyonu apoptotik uyarı varlığında bile stellat hücrelerinin yaşamalarını sağlamaktadır (Iredale ve ark., 2001). Bu durum renal hasar sırasında mezengial hücrelerde de benzer şekilde gerçekleşir. NF-κB, kaspas kaskadı ve apoptoza inhibitör etki gösteren birçok geni düzenler. Ayrıca, NGF, aktive hepatik stellat hücrelerde kaspaslar aktive olmadan önce NF-κB bağlanmasını hızlı ve geçici olarak durdurur ve böylece apoptoz uyarılır.

Tek bir hepatik stellat hücrede reversibilite çalışılmasını sağlayan bir yöntem halen yoktur. İzole edilmiş hepatik stellat hücrelerin durağan fenotipini elde etmek için hücre kültürü substratı olarak Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) matriksi kullanılabilir (Iredale ve ark., 2001). Örneğin, plastik ortamda aktive edilmiş hepatik stellat hücrelerin EHS matrikse aktarılması ile hücre fenotipinde dramatik bir değişiklik elde edilebilir. Hücreler kültür ortamından retinoidleri tekrar kazanırlar ve durağan hepatik stellat hücrelere benzer bir fenotip kazanırlar. Ek olarak, α-SMA, kollajen-1 ve TIMP-1 gibi aktivasyonla ilişkili anahtar proteinlerin ekspresyonu anlamlı olarak azalır. Bu gözlem matrikste uygun değişiklikler yapılırsa stellat hücrelerin daha durağan fenotipe dönüşebileceğini düşündürmektedir. Bu olayın in vivo önemi açık değildir. Henüz daha geçiş döneminde veya aktivasyonun erken fazındaki hücreler çevredeki kollajen-1 azken, normal bazal matriksin yeniden yapılanmasına durağan fenotipe geçerek cevap veriyor olabilirler. Ancak, insan ve hayvan iyileşme modelleri gözden geçirildiğinde, rezolüsyondan sonra perisinüzoidal hücre sayısında artış olmadığı için bu proçesin fazla bir önemi olmadığı gözükmektedir. Hatta, fibrozisin iyileşmeyle sonuçlanmasını takiben perisinüzoidal hücrelerin sayısı normal karaciğerdeki miktara düşmektedir. Herşeye rağmen, mevcut bilgiler aktive olmak üzere olan veya

in vivo ortamdaki stellat hücrelerin matriks değişikliğine duyarlı olduğunu ve bunun daha durağan bir fenotipe dönüşü kolaylaştırdığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak, karaciğer fibrozisinin gerilemesindeki temel faktörler;

- Hepatik stellat hücre apoptozu,
- TIMP-1 sentezinde azalma,
- MMP aktivitesinde artma,
- Kollajen yıkımında artma,
- Ekstrasellüler matriks dağılımında oluşan değişikliklerdir.

Bu aşamalardan hangisinin primer düzenleyici olduğu açık değildir. Ancak bu mekanizmaların hedeflenmesi yeni tedavi seçenekleri sunabilir.

1.4.5. Oksidatif Stres ve Karaciğer Fibrozisi

Biyolojik sistemlerde elektron alıcı moleküller serbest radikaller olarak adlandırılır. Serbest radikallerden aktif oksijen türevlerine kısaca oksidanlar denilir. Oksidanlar çeşitli biyolojik reaksiyonlarda önemli roller üstlenirken aynı zamanda da bir çok hastalıkların patogenezinde etken oldukları hakkında veriler mevcuttur. Canlıda değişik patolojilere yol açan serbest radikaller, normal hücresel biyolojik olaylar esnasında ve iltihabi hücreler tarafından üretilir (Moslen ve ark., 1994).

Oksidanlar ve insan hastalıklarındaki ilişki oksidan ve antioksidan arasındaki dengeye bağlıdır. Vücutta oksidanların artması (oksidatif stres) veya antioksidanların azalması sonucu oksidanlar normal biyolojik makromoleküllerle kolaylıkla etkileşebilecektir. Bu etkileşme, kritik moleküllerde ve yeterli şiddette meydana geldiği zamanda doku harabiyeti meydana gelebilecektir (Sies ve ark., 1991).

Oksidanların sebep olduğu hasarların mekanizması oldukça karmaşıktır. Hedef moleküllerden elektron alma yetenekleri nedeniyle oksidanlar, bu hedef molekülün yapısını ve/veya fonksiyonunu değiştirebilir. Bu şekilde oksidanlar hücre membranını, genetik materyali (DNA, RNA gibi) ve değişik enzimatik olayları etkileyerek hücre hasarı yapabilirler. Oksidanlar organizmada sitoplazmik, mitokondriyal ve ekstrasellüler formları olan süperoksid dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzim sistemleri ile seruloplazmin, transferrin, indirgenmiş glutatyon (GSH), metiyonin, vitamin E ve C gibi antioksidanlar tarafından yıkılmaktadır (Pompella ve ark., 1987;Taylor ve ark.1986).

En sık bahsedilen oksidanlar; süperoksid radikali (O_2^-), hidroksil radikali (HO), hidrojen peroksid (H_2O_2), singlet oksijen (singlet O_2) ve hipokloröz asid (HOCl) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) ile nitrik oksid (NO) radikalidir. Bunların tümü fizyolojik olaylarda rol alırlar veya fizyolojik süreç esnasında üretilirler (Cochrane ve ark., 1991;Sies ve ark., 1982).

Serbest radikal bir veya birden çok ortaklanmamış elektron içeren bir maddedir ve bu elektron atomik veya moleküler orbitalde tek başına bulunur. Bir veya birden çok çiftlenmemiş elektron bulunması o maddenin magnetik bir alana çekilmesine yol açar ve bazen de o maddenin son derece reaktif olmasına neden olur. Bugün kimya ve biyolojide pek çok serbest radikal mevcuttur. Serbest radikaller, radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla veya bir elektron ilavesiyle oluşurlar. Başlıca serbest radikal kaynakları:

- Mitokondriyal elektron transport zinciri
- Endoplazmik retikulum
- Redoks döngüsü
- Araşidonik asid metabolizmasıdır.

Bir çok hayvan ve bitki dokularındaki endoplazmik retikulum başlıca sitokrom P-450 olarak bilinen sitokromları ihtiva eder. Bunlara P-450 adının verilmesi, indirgenmiş sitokromların karbonmonoksid ile bir kompleks oluşturması ve bu kompleksin 450 nm dalga boyundaki ışığı absorbe etmesi nedeniyledir. Sitokrom P-450 moleküler oksijeni kullanarak bir çok substratı oksidler. Oksijen molekülünün bir atomu substrata bağlanır, diğer atomu ise su oluşturur, bu yüzden mono-oksijenaz veya karışık fonksiyonlu oksidaz reaksiyonu olarak adlandırılır. Kimyasal ajanlardan serbest radikal oluşmasında en önemli mekanizma ksenobiyotiklerin mikrozomal sitokrom P-450 sistemi ile aktivasyonudur. Bu sistem moleküllere bir elektron ilavesiyle (indirgenme olayı) karbontetraklorid ve halotanda olduğu gibi veya molekülden bir elektron çıkararak (oksidasyon olayı) serbest radikal oluşur (Brent ve ark., 1993)

1.5. Oksijen Türevi Serbest Radikaller

Reaktif oksijen türevleri (ROS) aerobik organizmalarda bazı fizyolojik olaylar esnasında oluşurlar. Bunların fizyolojik şartlardaki başlıca kaynağı mitokondriyal elektron transport zinciridir. Genellikle hücrelerce kullanılan oksijenin %95'i mitokondrilerde kademeli olarak dört elektron ilavesiyle indirgenir. Normal şartlarda bu mitokondriyal olay esnasında oksijenin %1-2'si de O_2^- ye dönüştürülür. O_2^-, H_2O_2, OH, singlet oksijen ve HOCl başlıca radikallerdir. Bu reaktif türler enzim ve protein gibi hayati makromoleküllerle, lipidlerle ve nükleik asidlerle (DNA ve RNA) reaksiyona girip hücre yapısı ve fonksiyonunu bozarak bir çok patolojik olaylarda rol oynarlar (Taylor ve ark., 1986). Serbest radikallerin hücresel hasar yaptığının en iyi tanımlandığı durumlar şunlardır:

- Pulmoner oksijen toksisitesi
- Post iskemik reperfüzyon hasarı
- İltihabi durumlar

- Radyasyon hasarı
- Bir çok kimyasalların toksik etki göstermesi

Özellikle bazı kimyasalların serbest radikaller yoluyla hücre hasarı yaptığı çok iyi bilinmekledir. Bunlardan en çok çalışılmış olanları, halojene hidrokarbonlar, karbontetraklorid, aromatik halojene hidrokarbonlar, sigara dumanı, alkol, diquat, parakuat, asetaminofen, halotan, demir, adriyamisin, bleomisin, nitrofurantoin, asbest, furosemid, ozon ve menadiondur (Sugiyama ve ark., 1994).

1.5.1. Süperoksid Radikali (O_2^-)

Süperoksid radikali moleküler oksijene bir elektron bağlanmasıyla meydana gelir. Milisaniyelik bir yarı ömrüyle zayıf bir oksidan fakat güçlü bir redüktandır. Oksijen toksisitesinde önemli bir faktör olup, SOD enzimi buna karşı organizmayı korur. Zayıf bir oksidan olarak O_2^-' nin kendi başına önemli bir hücre hasarına yol açması muhtemel görülmemektedir. O_2^- oluştuktan sonra tiyol gruplarıyla reaksiyon verebilir ve böylece ya glutatyon boşalmasına yol açarak hücreyi ileri bir oksidatif strese sokar veya enzim ve diğer hücresel proteinler üzerindeki tiyol gruplarıyla reaksiyon vererek onları inaktive eder. Bunlarla birlikte O_2^- aynı zamanda oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonları da başlatabilir. Bu reaksiyonların kritik olan bir tanesi Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinen O_2^- ve H_2O_2'nin demir varlığında etkileşerek son derece reaktif HO vermesi reaksiyonudur.

$$O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow HO + OH^- + O_2$$

Üretilen bu OH çok önemli hücresel hasara yol açar. O_2^- intrasellüler demir depolarından demiri serbest hale getirir. Ferritin +3 değerli demir içerir ve O_2^- bunu +2 değerli demire dönüştürerek serbest hale geçirir. Serbest hale geçen demir iyonu Haber-Weiss reaksiyonu gibi demir bağımlı olan radikal

üreten reaksiyonlarda kullanılabilir veya diğer önemli serbest radikal aracılıklı hücre hasarlarında rol oynayabilir. O_2^- çok sınırlı bir yarı ömre sahip olduğu için çoğunlukla bu reaksiyonlara uğramaz. Dismutasyon reaksiyonuyla H_2O_2 ve oksijen vererek parçalanır.

$$2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$$

Bu dismutasyon reaksiyonu spontan olarak meydana gelebildiği gibi aynı zamanda SOD enzimi ile hızlandırılır (Siegers ve ark., 1988).

1.5.2. Hidroksil radikali

HO, biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü radikaldir. Haber-Weiss reaksiyonu ile oluşturulur. Yaşayan canlı hücrelerin başlıca bileşeni su olduğu için bu hücrelerin x-ışını veya gamma ışınları gibi iyonize edici radyasyona maruz kalmaları su molekülünden hidrojen radikali ve HO meydana getirir.

$$H\text{-}O\text{-}H \longrightarrow H + OH$$

H_2O_2'nin Fe^{+2} ile reaksiyona girmesi Fenton reaksiyonu olarak bilinir ve H_2O_2 toksisitesinin temelinde oluşan HO olduğu düşünülmektedir.

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{+3} + OH + OH^-$$

OH, hemen hemen tüm hücresel moleküllerle reaksiyon verebilir, fakat başlıca ve en önemli etkileri lipidler, proteinler, sitokromlar ve nükleik asitler üzerine olan etkileridir. OH'nin membran fosfolipid komponentlerinden olan poli doymamış yağ asitleri üzerindeki etkisi hücresel oksidatif hasarda başlıca etkin faktör olarak yorumlanmaktadır. OH bir yağ asidinin metilen kısmından bir hidrojen atomu koparark lipid radikali oluşturur. Bu safha lipid peroksidasyonun başlangıç safhasıdır. Daha sonraki basamaklarda ise

peroksil ve karbon radikali oluşur. Böylece lipid peroksidasyon zincir şeklinde devam eder (Siegers ve ark., 1988).

Sonuç olarak bu ürünlerden ortamda bulunan demir gibi metal iyonları katalizörlüğünde malondialdehitlerin de bulunduğu aldehitler, hidrokarbonlar ve polimerizasyon ürünleri meydana gelir. Bu peroksidasyon reaksiyonları serbest radikallerin başlıca etkisi olarak düşünülmektedir. Lipid peroksidlerin metal iyonu bağımlı dekompozisyonlarında üretilen karbonil bileşiklerinin çoğu aldehidtir. Malondialdehit karaciğer mikrozomlarının peroksidasyonu esnasında fazla miktarda oluşturulur (Siegers ve ark., 1988).

Radikaller, aldehitler ve diğer lipid peroksidasyon ürünleri membran proteinlerinde ciddi hasarlara yol açarlar. Karaciğer ve eritrosit membranlarının peroksidasyonunun membranda yüksek moleküler kütleli protein agregatları oluşumuna yol açtığı bilinmektedir ve bunun sonucu hepatosit membran permeabilitesi artmakta, hepatositler yok olmakta ve eritrositler lizise uğramaktadır. Genel olarak lipid peroksidasyon, membranın akışkanlığını azaltır, normalde hücre içine geçemeyen maddelerin membrandan hücre içine girişlerini arttırır (Ca^{+2} iyonu gibi) ve membrana bağlı enzimleri inaktive eder, protein sentezini inhibe eder, DNA replikasyonunu önler ve mitokondriyal solunumu durdurur. Membranda yağ asidi zincirinin devamlı olarak aldehidler ve pentan gibi hidrokarbon üretmesi membran bütünlüğünün tamamen kaybolmasına yol açar. Bu yolla lizozom membranlarının yırtılmasıyla hidrolitik enzimler hücrenin geri kalan kısmına boşalır ve hasarın artmasına yol açar (Siegers ve ark., 1988)

1.5.3.Hidrojen Peroksid (H_2O_2)

H_2O_2 son derece güçlü bir oksitleyici ajandır, fakat nispeten yavaş reaksiyon verir. O_2^- nin dismutasyon reaksiyonuyla veya direk olarak oksijenin indirgenmesiyle oluşur.

$$2\,O_2^- + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$$

Bu şekilde oluşan H_2O_2 ortamdaki oksijen miktarının artmasıyla artar. Aynı zamanda serbest O_2^- 'ye ihtiyaç duymadan bazı peroksizomal enzimlerle de bol miktarda H_2O_2 üretilir. H_2O_2 oluştuktan sonra ya direkt olarak oksidatif hasar yapabilir veya O_2^- gibi daha reaktif serbest radikal oluşturarak hasara yol açabilir. H_2O_2 zayıf oksidan bir ajandır ve kendisinin oluşturduğu hasar protein tiyollerini oksidleme ve DNA'da zincir kırılmaları meydana getirme yeteneği nedeniyledir (Siegers ve ark., 1988).

1.5.4.Hipokloröz asid (HOCl)

HOCl radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri arasında yer almaktadır. Fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde önemli bir rol oynar HOCl tiyol gruplarını, aminleri, aminoasitleri, nükleotidleri hemoproteinleri oksidler.

1.5.5.Singlet oksijen (singlet O_2)

Oksijen molekülünün daha reaktif bir türü olan singlet O_2'ler moleküler oksijenin enerji almasıyla oluşurlar. Bunların delta ve sigma olmak üzere iki türü vardır. İkisi arasında enerji farkı olup, sigma tipi daha reaktiftir. Singlet oksijenler, biyolojik olarak önemli proteinlerin metiyonin, triptofan, histidin ve sistein gibi kalıntılarıyla reaksiyon vererek önemli hasarlar oluştururlar.

1.6. Serbest Radikallere Karşı Koruyucu Sistemler

Oksidatif bir ortamda yaşayan canlı hücreler, bazı endojen serbest radikal koruyucuları ve temizleyicileri içerirler. Hücreler oksidatif hasara karşı

enzimatik ve nonenzimatik olan antioksidan sistem ve moleküllerle korunurlar. Enzimatik sistemler içinde birincil olan antioksidan enzimler süperoksid dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve selenyum bağımsız GSH-Px olan glutatyon S transferaz bulunur. Bu birincil enzimlerden başka dolaylı olarak antioksidan sistem içinde yer alan glutatyon redüktaz (GR) ve G6PD enzimleri de vardır ve bunlara ikincil olan antioksidan enzimler denilmektedir (Siegers ve ark., 1988).

Enzimatik olmayan küçük moleküllü antioksidanlar ise glutatyon (GSH), N-asetil sistein ve tiyoller gibi protein olmayan sülfidler, vitamin C, A ve E, metallotiyonein ve daha başka moleküllerdir (Sugiyama ve ark., 1994).
Süperoksid dismutaz enzimi bakır ve çinko içermektedir. Bu enzim süperoksid detoksifikasyonunda anahtar bir enzimdir ve O_2^- ni H_2O_2' ye dönüştürür. Bu detoksifikasyon sonucu bir taraftan O_2^- yıkılmakta bir taraftan da güçlü bir oksidan olan H_2O_2 oluşmaktadır. Vücuttaki tüm sistemler ahenk içersinde işlediği zaman oluşan H_2O_2'den daha sonra katalaz enzimi ile detoksifiye edilmektedir (Halliwel ve ark., 1989). Glutatyon peroksidaz enziminin substratı küçük molekül ağırlıklı bir tiyol bileşiği olan GSH'dur. Serbest glutatyonun büyük çoğunluğu GSH şeklinde bulunur, az bir kısmı ise okside GSHglutatyon (GSSG) halindedir ve normalde GSH/GSSG oranı yüksektir. Glutatyon peroksidaz aşırı H_2O_2 mevcudiyetinde glutatyonun oksidasyonunu katalize eder. Bu arada H_2O_2' de suya dönüşerek detoksifiye edilir. Bu enzim karaciğerde yüksek oranda bulunmaktadır (De Biesser ve ark., 1999;Greenwel ve ark., 2000;Siegers ve ark., 1988).
Serbest radikallerin nekrojenik potansiyeli karbontetraklorid ve etanol veya demir ve bakır gibi metaller olan ksenobiyotiklerin hepatotoksisitesiyle ilişkilidir. Oksijen türevi olmayan serbest radikallerde mevcut olup karbon merkezli radikaller birçok biyolojik sistemlerde oluşabilmektedir (Kim ve ark., 2000). Deneysel karaciğer fibrozis ve siroz çalışmalarında kullanılmakta olan karbontetraklorid sitokrom P-450 sistemi ile metabolizması sonucunda triklorometil radikali (CCl_3) oluşur (Inoue ve ark.,1994;Murel ve ark., 1990).

$$CCl_4 \longrightarrow CCl^3 + Cl^-$$

Serbest oksijen varlığında triklorometil serbest radikalinin trikloroperoksil radikaline dönmesiyle, demir veya bakır gibi katalizörlerin etkisiyle lipid peroksidasyonu başlamaktadır (Pompella ve ark., 1987). Biyolojik membranlarda lipid peroksidasyon sonucunda poliunsatüre yağ asitleri oksidatif yıkıma uğramakta, yüksek reaktif aldehitlerin oluşumu ve membranlarda fonksiyonel ve yapısal hasar meydana gelmekledir.Serbest oksijen türevlerinin sitotoksik etkilerinin yanında fibrojenik süreçte fibrozisin başlangıcı veya devamına yol açabileceği düşünülmektedir. İnsanlardaki kronik karaciğer hastalığının çoğu şeklinde viral ve alkolik karaciğer hastalığındaki gibi inflamatuar komponent hakim durumdayken bazı durumlarda özellikle fibrozisle seyreden genetik hemakromatozis gibi hastalıklarda inflamasyon ya çok az yada yok denebilecek düzeydedir. Bu durum hepatik stellat hücre aktivasyonunda başka bazı faktörlerinde rolü olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalar, bu faktörlerin başında oksidatif stresin rol oynadığını düşündürmektedir (Ankonella ve ark., 1996;Gianluca ve ark., 1998; R. Alcolado ve ark.). Oksidatif stresi arttıran faktörler, invivo olarak kollajen sentezinde artmaya yol açabilmektedirler (Cochrane ve ark., 1991;Valerie ve ark., 1999). Kollajen karaciğer fibrozisinde en çok artan ekstrasellüler matriks proteinidir. Aktive olmuş stellat hücrelerde kollajen ve alfa düz kas aktin (α-SMA) ekspresyonu yüksek bulunmuştur. Okazaki ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada oksidatif stress etkisiyle c-myb ve nükleer faktör kappa-B (NFkappaB) ekspresyonu yoluyla hepatik stellat hücrelerinin aktive olduğunu ve antioksidan olan 1α-tokoferol ve butirat hidroksitoluen verilmesiyle inhibisyon sağlandığını gözlemlemişlerdir (Okazaki ve ark., 2000).

Etanol ile oluşan karaciğer fibrozisinde, asetaldehitin fibrojenik etkisinin yanında bir serbest oksijen radikali olan hidrojen peroksidin de miktarında artma olduğu ve bu artışın profibrojenik bir mediatör olan TGF-β ekspresyonunu additif olarak arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar oksidatif

stresin hem direkt olarak lipid peroksidasyon ürünleri hem de TGF-β üzerinden parakrin yolla fibrotik süreçte etkili olduğunu düşündürmektedir. Yapılmış olan başka bir çalışmada aktive olmuş hepatik stellat hücrelerde, antioksidan bir enzim olan glutatyon S-transferaz seviyesinin düştüğü gözlemlenmiştir. Hepatik stellat hücreler oksidatif stresten glutatyon S-transferaz gibi detoksifikasyon enzimleri ile korunabilmektedir. Enzim seviyesindeki bu azalma lipid peroksidasyon ürünlerinin detoksifikasyonunu azaltmakla ve hücrelerin oksidatif strese olan yatkınlığını arttırabilmektedir (De Blesser ve ark., 1999; Whalen ve ark., 1985).

Yıllardır askorbik asidin kültüre edilmiş fibroblastlarda prokollajen gen transkripsiyonunu stimülasyonu ve prokollajen mRNA'nın degradasyonunun azalmasıyla kollajen üretimini arttırdığı bilinmektedir. Kollajen ekspresyonunda askorbatın etkisinin kompleks olması ve propil hidroksiliz aktivitesinin uyarılması insan fibroblastlarındaki deneylerde eklenen askorbik asidin sadece kollajen sentezini uyarmadığı, lipid peroksidasyonunu indüklediği ve her iki olayın vitamin E gibi antioksidanlarla önlendiği gözlenmiştir (Cnojkier ve ark., 1988; Lee ve ark., 2001).

1.7. Deneysel Karaciğer Fibrozis Modelleri

Günümüze kadar yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler doğrultusunda, deneysel olarak insanlardaki karaciğer fibrozisine benzer düzeyde model oluşturulamamakla beraber, eldeki mevcut modeller sayesinde fibrotik sürecin biyokimyasal yönleri büyük oranda açıklığa kavuşturulmuştur. Bu sayede karaciğer fibrozisinde anahtar rolü hepatik stellat hücrelerin oynadığının ortaya konmuş olmasıyla beraber halen yapılan çalışmalar bu hücreler üzerinde yoğunlaşmakta ve yeni tedavi yaklaşımlarının denenmesine imkan sağlamaktadır (Hidekazu ve ark., 1990).

1.7.1.Hepatotoksine Bağlı Fibrozis Modeli

CCl_4 laboratuar hayvanlarında deneysel karaciğer fibrozisi ve sirozu oluşturmak amacıyla uzun süreden beri ve en yaygın olarak kullanılan toksindir. Bu toksin deney hayvanlarına subkutan, intraperitoneal, gastrik lavaj veya inhalasyon yoluyla verilebilir. İnhalasyon yoluyla verildiği takdirde daha kısa sürede fibrozis ve siroz meydana getirebilmektedir. Gastrik lavaj ile verildiği zaman mortalite oranları daha yüksek olup günümüzde pek tercih edilmemektedir. Subkutan ve periton içi uygulamalarda ise fibrozis 4. haftadan itibaren oluşmaya başlamakta, 12.haftadan sonra ise siroz gelişmektedir Bu iki yöntem deneysel çalışmalarda daha çok tercih edilmiş olup fibrozis sürecindeki olaylar bu sayede daha ayrıntılı olarak incelenmiştir. CCl_4, karaciğerde aktif metaboliti olan triklorometil radikaline dönüşmekte ve bu radikal ansatüre durumdaki membran lipidlerinden bir hidrojen iyonu alarak lipid peroksidasyonuna yol açmakta ayrıca proteinlerin sülfidril gruplarıyla da reaksiyona girmektedir Bu olaylar başlangıçta geri dönüşümlü olup toksine olan maruziyet kronik hale geldiğinde ise geri dönüşüm olmadan fibrozise doğru seyretmektedir (Chen ve ark., 1999;Harushige ve ark., 1990;Hidekazu ve ark., 1990).

Deneysel modellerde kullanılan, aynı zamanda hepatokarsinojen özellikleri olan diğer iki toksin ise dimetilnitrozamin (DMNA) ve tiyoasetamid (TAA) olup bunlarda karaciğerde aktif metabolitlerine dönüşmektedirler. Bu toksinlerin düşük dozda kronik olarak kullanımları tümör oluştururken, yüksek dozları nekroz ve sonrasında fibrozis meydana getirmektedir. DMNA proteinlere kovalent bağlanarak hepatosit fonksiyonunda bozulma yapmakla beraber, nükleik asit ve proteinlerin metilasyonuna neden olarak hepatosellüler nekroza yol açar. CCl_4'ten farklı olarak hepatositlerde yağlı değişikliklere yol açmaz. Ciltaltı veya periton içine verilerek yaklaşık aynı süre zarfında fibrozis oluşturulabilir TAA ise ratlara oral olarak verilip ortalama 3 ay sonra fibrozis oluşturulabilmektedir (Hidekazu ve ark., 1990).

1.7.2. Nutrisyonel Fibrozis Modeli

Düşük oranlarda protein ve kolinle beraber yüksek miktarda yağ içeren bir diyet ratlara 6-7 hafta süreyle verildiği takdirde hem portal hem de sentrilobüler alanlarda lipid damlacıklarının intrasellüler birikimi gözlenmektedir. Sentrilobüler alandaki steatoza, kolin ile beraber diğer bazı aminoasitlerin eksikliği yol açmaktadır, 6-12 hafta içersinde ise fibrozis gelişmeye başlamakta, 12. haftadan sonra ise siroz meydana gelebilmektedir. Diğer bir beslenme modeli ise düşük protein ve metiyoninle beraber %0.5 DL-etionin içeren diyet şeklidir. Histolojik olarak lezyonlar diffüz fibrozis ve hücresel proliferasyondan oluşur. Aşikar nekroz gözlenmez. Fakat bu modelle mortalite oranı yüksektir (Guertin ve ark., 1988;Hidekazu ve ark., 1990).

1.7.3. İmmünolojik Fibrozis Modelleri

İmmünolojik mekanizmayla fibrozis oluşturmak amacıyla 4 tür madde kullanılmıştır. Karaciğer fibrozisinde immünolojik komponentin önemi, ilk olarak Paronetto ve Popper tarafından ileri sürülmüştür. Antijenik substanslar olarak domuz ve at serumu, yumurta ve domuz albumini, insan gamma globülini ve domuz serum globülini kullanılmıştır. Bu maddelerin periton içersine enjekte edilmeleriyle ortalama 5-6 hafta içinde fibrozis oluşturulabilmektedir. Bu model fibrogeneziste stellat hücrelerin, myofibroblastların ve kupfer hücrelerinin fonksiyonlarını araştırmak amacıyla kullanılmıştır. Bakteriyel hücre duvarı ürünleri de aynı maksatla kullanılmıştır. Fibrogenez esnasında immünite aracılıklı hücresel cevaplar streptokokların hücre duvarından elde edilen peptidoglikan-polisakkarid fragmanlarının tek sefer intraperitoneal enjeksiyonu ile çalışabilmektedir Bu modelde daha çok granülomatöz lezyonlar elde edilmektedir. Diğer bir yöntem de ise Schistosoma mansoni ile enfekte olmuş maymun karaciğerinde granülom gelişebilmektedir. Bu granülamatöz reaksiyon, portal traktusta lokalize olmuş

parazite karşı oluşan immünolojik ve inflamatuar bir cevaptır. Enfekte karaciğer normalden 20 kat daha fazla kollajen içerir ve albumin sentezi azalır. Bu model ile artmış kollajen birikimi ve albumin sentezinin azalmasına yol açan moleküler mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmıştır. Hepatotoksinlere bağlı karaciğer hasarlanmasında antimikrobiyal ilaçların kullanılmasıyla, endotoksinlerinde bu hasarlanmada rolü olabileceği ileri sürülmüştür. Bu amaçla deneysel olarak endotoksin enjeksiyonu yapılmış histolojik olarak nonspesifik değişimler gözlenmiş fakat mortalite oranı yüksek olmuştur (Hidekazu ve ark., 1990).

1.7.4. Biliyer Siroz

Deneysel biliyer siroz modeli ratlarda, tavşanlarda, köpek ve maymunlarda uygulanmış ve değişik derecelerde başarılı olmuştur. Teknik bazı problemlerin yanında, histolojik değişimlerin reversibl karakterde olması özellikle tıkanmış duktal sistemin rekanalizasyonu nedeniyle ve yüksek mortalite oranları ile beraberdir.

1.7.5. Alkolik Karaciğer Fibrozisi ve Sirozu

İnsanlarda aşırı alkol tüketimi karaciğer fibrozisi ve sirozunda majör etiyolojik faktör olarak yerini korumaktadır. Bu modelde alkolün hayvanlara verilmesinde, verilen alkolün tespitinde ve hayvanlardaki bireysel farklılıklar nedeniyle uygulamada zorluklar olmakladır. İlk yapılan çalışmalarda sadece nekroz elde edilmiş, fibrozis oluşturulamamıştır. Bu modelde amaç kanda yüksek oranda alkol seviyesi elde etmek olup bunun için intragastrik infüzyon ile mide içersine istenilen miktarda alkol verilerek progresif karaciğer hasarı için gereken yüksek kan alkol seviyesi sağlanmıştır. Ayrıca Lieber ve DeCarli etanol içeren bir diyet geliştirerek fibrozis ve siroz oluşturmuşlardır Fakat bu yöntemde istenilen sonuçlara ulaşmak için çok uzun süre beklemek

gerekmektedir (Hidekazu ve ark., 1990; Hidekazu ve ark., 1995; Lieber ve ark., 1990).

Çalışmamızda, deneysel karaciğer fibrozisinde PEG interferon ve taurinin fibrozis oluştuktan sonra spontan iyileşmeye olan katkısını in-vivo olarak ve aynı zamanda PEG-İFN ve taurinin in-vitro etkisini inceleyerek fibrozisin spontan iyileşmesine yönelik yeni alternatif tedaviler sunmayı amaçladık.

2- GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. In-Vivo Çalışma

Çalışmamızda GATA Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı, Deney Hayvanları bölümünden emin edilen 250-400gr. Ağırlığında 60 adet Sprague-Dawley türü erkek cins ratlar kullanıldı. Ratlar 12'şer saatlik gece-gündüz sikluslarında ve sabit oda ısısında tutularak standart yemle beslendi

Çalışmamızda, deneysel karaciğer fibrozis çalışmalarında, insan karaciğer fibrozisine benzerliği daha fazla olan ve en yaygın kullanılan CCl_4 modeli kullanıldı. Bu modelde CCl_4 (Sigma Chemical Co.) 0,2ml/100 gr. Gün dozunda olmak üzere toplam 12 hafta boyunca haftada iki ardışık gün 1/1 oranında zeytin yağı içerisinde subkutan enjekte edilerek fibrozis oluşturuldu.

2.1.1. Deney Grupları

Grup 1 (n =15)

Başlangıçtan itibaren 12 hafta CCl_4 verildi. Daha sonra spontan iyileşmeye bırakıldı.16. haftanın sonunda sağ kalan 10 rat sakrifiye edilerek kan ve doku örnekleri alındı.

Grup 2 (n =15)

Başlangıçtan itibaren 12 hafta CCL_4 daha sonra 4 hafta 0,2 ml/100gr/gün (1200mg/kg/gün) taurin tedavisi intraperitoneal verildi. 16 haftanın sonunda sağ kalan 12 rat sakrifiye edilerek kan ve doku örnekleri alındı.

Grup 3 (n =15)

Başlangıçtan itibaren 12 hafta CCl_4 daha sonra 4 hafta Peginterferon-α2b 1,5 µg/kg, 0,2 ml salin içinde sulandırılarak SC, haftada bir defa verildi.16 haftanın sonunda sağ kalan 12 rat sakrifiye edilerek kan ve doku örnekleri alındı.

Grup 4 (n =15)

Başlangıçtan itibaren 12 hafta CCl_4 daha sonra 4 hafta Peginterferon-α2b + taurin aynı yukarıda ki dozlarda uygulandı.16 haftanın sonunda sağ kalan 12 rat sakrifiye edilerek kan ve doku örnekleri alındı.Tüm ratlar 16. haftanın sonunda sakrifiye edildi.

2.2. İn-Vitro

2.2.1.Hepatik Stellat Hücre İzolasyonu

Bu modelde 500-600 gr ağırlığında Sprague-Dawley cinsi sıçanlar kullanıldı. Hepatik stellat hücrelerin izole edilmesi ve idantifiye edilmesi amacıyla sıçanlara intraperitoneal olarak ketamin 100mg/ml (firma Parke Davis) Rompun %2 (Bayer) uygulandı. Anestezi işlemini takiben sıçanların karaciğer, V.porta hepatis ve V.cava inferior'ları görülecek şekilde abdominal organları kenara çekildi. Abdomen içerisinde yer alan organların kenara çekilmesi sırasında bu organların hasar görmemesine özellikle çok dikkat edildi. Bunun nedeni bağırsaklar gibi kolay hasarlanabilecek organların karaciğerin enfekte olmasına neden olabilmesi idi.Daha sonra ince bir kanül ile v.portae hepatis'ten girildi ve sıçanlar ilk olarak Hanks dengeli tuzlu solüsyon (HBSS) w/o Ca mg ile perfüze edildi. Perfüzyona başlandığında

v.cava inferior'da diseke edildi ve HBSS ile perfüzyon uygulamasına v.cava inferior'dan HBSS gelene kadar devam edildi. HBSS ile perfüzyon uygulaması devam ederken karaciğerin çevresinde yeralan organlar çok dikkatli bir şekilde diseke edildi ve çevre organlardan ayrıştırılan karaciğer perfüzyon sıvısının rahatça akmasına imkan verecek taban kısmında delikleri olan bir kaba alındı.daha sonra perfüzyon işlemine pronase ile devam edildi.Pronaz ile karaciğer 10 dakika süreyle perfüze edildi. Pronase safhası bittikten sonra, karaciğerin perfüzyonuna kollagenaz ile devam edildi.Kollagenaz perfüzyonunun süresi 30 dk idi. HBSSw/o Ca, Mg, pronase ve kollagenaz'ın perfüzyon işlemi sırasında 10 ml/dk hızda karaciğere gitmeleri iyi bir perfüzyon işlemi için gerekli idi ve bu hız otomatik bir pompa sistemi ile sağlanıyordu.

Perfüzyon işlemi bittikten sonra karaciğer DNA'ase isimli solüsyona alındı. DNA'ase içerisindeki karaciğer iki penset yardımı ile steril bir petri kabında küçük parçalara ayrıldı ve bu işlemi bir karaciğer süspansiyonu elde edilene kadar devam edildi. Daha sonra naylon bir filtre (Nylongaze 20 T1-56) ile karaciğer plastik bir kaba süzüldü ve santrifüj işlemini takiben tüpün içerisinde beyaz bir çizgi şeklinde stellat hücrelerin bulunduğu bölge tüplerden çekildi, daha sonra cam bir behere alınan stellat hücreler ve altlarında yeralan karaciğer süspansiyonunun üzerine sabit oranlarda Bovin serum Albumin (BSA, Sigma) ve Nycodenz (analytical grade) (firma Nycard AS, Oslo) ilave edildi.Hücre süspansiyonunun miktarı ile doğru orantılı olarak sabit değerlerde ilave ediliyordu.Daha sonra 6 ml BSA ve Nycodenz eklenmiş stellat hücre süspansiyonundan 20'şer ml olacak şekilde konuldu ve 1400 G'de 0 dk süre ile ikinci bir santrifüj işlemi uygulandı.Bu ikinci santrifüj işlemini takiben, stellat hücrelerin yüzeye yakın olarak ara tabakada gri bir çizgi halinde bulundukları tespit edildi. Plastik uçlu bir enjektör ile tüp içerisinde arada bulunan gri tabaka (stellat hürelerin bulunduğu tabaka) enjektöre çekildi ve 450 G'de 7 dk süre ile santrifüj işlem uygulandı. Üçüncü santrifüj işleminin sonunda tüpün üst kısmında yer alan sıvı çekildi ve bunun alt kısmında yer alan stellat hücreler baz içerisine alındı. Hepatik stellat

hücrelerin üzerine mikroskopta daha iyi sayılabilmesi için bir miktar HBSS (Ca, Mg'lu) ilave edildi.Daha sonra Neubauer lamı yardımı ile sayısı bulundu. Elde edilen stellat hücrelerin saflığı (purity) 0,71-0,80 arasında değişmekte idi.

Saflık düzeyi = Neubauer lamında bir karede bulunan stellat hücreler/Neubauer lamında aynı karede bulunan tüm hücreler

Daha sonra hepatik stellat hücreler %20 FCS (Fetal calf serum)'li kültür ortamına alındı.% 20 FCS' li kültür ortamı hazırlanırken DMEM (Dulbecco'nun modifiye vasatı); L-Glutamine; penisilin (streptomisin) (5 ml.) ve FCS (100 ml) olacak şekilde ilk olarak hazırlandı.Daha sonra ilk olarak DMEM ve L-glutamine karıştırıldı.Bu karışımdan 400 ml. alındı ve üzerine 1000 ml. FCS ile birlikte 5 ml. penisilin/streptomisin ilave edildi. 12' li besiyerine (her kuyucuğunda 1 ml medium ve 9×10^4 hücre olacak şekilde) konulan hücrelerde stellat hücrelerin proliferasyonu araştırıldı.İlk gün %20 FCS'li besi yerine alınan hepatik stellat hücreler % 5 CO2 içeren 37'C sıcaklıktaki etüvlerde tutuldu. 24 saat sonra hücrelerin mediumları, % 10 FCS'li mediumla değiştirildi ve deneye başlandı. Taurin (2-amino ethane sulfonik asid) (sigma) well plate' lere 1-5-10-20-50 ve 100 mmol/L konsantrasyonda olacak şekilde ilave edildi.diğer bir grup stellat hücreye ise PEG IFN (Peg Intron) (Schering-Plough) 10-50 ve 100 ng/ml olacak şekilde eklendi.

Farklı dozlarda Taurin ve PEG IFN eklenmiş olan stellat hücrelerin 1. grubu 24 saat ikinci grubu 48 saat ve üçüncü grubu ise 72 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyonu takiben stellat hücre proliferasyon değerlendirilmeleri yapıldı.

2.2.2.Hepatik Stellat Hücrelerdeki Proliferasyonun Değerlendirilmesi

Farklı dozlarda ve sürelerde Taurin ve PEG IFN uygulanmış olan stellat hücrelerin proliferasyonları 12 well.plate'lere konulan 1 ml medium içerisinde

bulunan 3×10^5 hepatik stellat hücrelerde ^3H Thymidin çalışması ile değerlendirildi. İzolasyon ve identifikasyon aşamalarını takiben % 20 FCS'li medium'a konularak 24 saat süre ile 37'C de % 5 CO_2'li ortamda inkübe edilen hepatik stellat hücrelerin medium 'ları 24 saatin sonunda % 5 FCS'li medium'la değiştirildi.Bunun nedeni % 5 FCS'li medium içeren ortamda kimyasal maddelerin etkilerini daha iyi göstermeleridir.Daha sonra kuyucuklarda bulunan hepatik stellat hücrelerin plate yeterliliği değerlendirildi.

Plate yeterliliği:Hücrelerin sayısı $\times$ 641 $\times$ 0,38 $\times$ 3×10^5

Hücrelerin sayısı özel bir oküler olan plate yeterliliği okülerinde bulunan karenin içindeki hepatik stellat hücre sayısını ifade eder.Değeri hesaplanırken her bir kuyucukta dört alan sayıldı ve sayılan dört alanın ortalaması alınarak bu değerler elde edildi.Plate yeterliliğinin değerlendirilmesinden sonra Taurin ve PEG IFN well-plate' lere ilave edilerek deneye başlandı. Tüm bu deneysel çalışmalar sırasında çift kontrollü olarak çalışıldı ve aynı doz ve sürelerde uygulanan maddelerin ikişer kez değerlendirilmesi sağlanmış oldu.

Taurin well-plate'lere 1-5-10-20-50-100 mmol/L konsantrasyonunda, PEG IFN ise 10-50 ve100 ng/ml dozda ilave edildi. Ayrıca bir grup hepatik stellat hücreye hiçbir madde eklenmedi, bunlar yalnızca % 5 FCS içeren ortamda inkübe edildi ve kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi.

Taurin ve PEG IFN eklenen hepatik stellat hücreler ile kontrol grubundaki hücrelerin birinci grup 24 saat, ikinci grubu 48 saat ve üçüncü grubu 72 saat süre ile 37°C ve % 5 CO_2'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süreleri biten grupların mediumları % 10 FCS içeren medium ile değiştirildi. %10 FCS'li medium konulmasını takip eden 24. saatte ise 0,1 mikrocuri/ml konsantrasyonundaki ^3H Thymidinden well-plate'lerin kuyucuklarına 20 mikrolitre ilave edildi. Hepatik stellat hücreler 24 saat süre ile ^3H-Thymidin içeren ortamda tutuldu ve bu sürenin sonunda PBS tampon çözeltisi ile

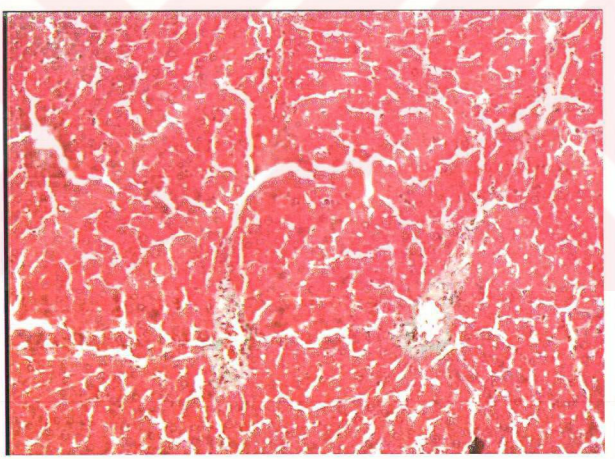
yıkanarak deneye devam edildi.PBS tampon çözeltisi ile yıkama işlemini takiben well-plate'lerin her bir kuyucuğuna 50 µl 10 konsantrasyonunda tripsin ve 150 µl DNA çözeltisi konularak hücreler 37 °C'de 45 dakika inkübe edildi. Bu işlem well-plate'lerin tabanına yapışmış olan hücrelerin yapıştıkları yerden kopmalarını ve serbestçe hareket edebilir konuma gelmelerini sağlamakta idi. Daha sonra well-plate'lerin kuyucuklarına 800 µl DNA tampon çözeltisi ilave edilerek hücre süspansiyonu pipetlerin yardımı ile homojenize edildi. Homojenize işlemini takiben kuyucuklardan iki kez 100'er mikrolitre hücre süspansiyonu alınarak 96 well-plate'lere çift kontrollü çalışılmak üzere konuldu. 96 well-plate'lere hücre süspansiyonları ile birlikte DNA ve DNA tampon çözeltisi değişen oranlarda ilave edildi..Bu işlemi takiben SYBR Green DNA ölçümü yöntemi ile Victor multilabel Counter cihazında ilk standardizasyon yapıldı. Bu işlemden sonra 12 well-plate'de kalan hücre süspansiyonlarına BSA-Carrier (20mg/ml)ilave edilerek DNA'nın çökmesi işlemi başlatıldı.Bundan sonra well-platelere soğuk triklor asetik asit (2,5 ml) ilave edildi ve 2 saat süre ile 4 °C'de DNA'nın çökmesi için beklendi.Bu işlemi takiben 3000 rpm'de 30 dk. süre ile santrifuj edildi ve tekrardan santrifuj işlemi sonunda üstte kalan sıvı uzaklaştırılarak presipitatın kalması sağlandı.Daha sonra, bu beyaz presipitatın üzerine 300 mikrolitre 0,5 Molar NaOH ilave edildi ve 3 ml %20 triklorasetik asit ile 30 dk süresince yeniden DNA 'nın çöktürülmesi sağlandı.Bu işlemi takiben 3000 rpm'de 30 dakika süre ile çözelti santrifüj edildi ve santrifüj işlemi sonunda üstte kalan sıvı çekilerek epandorf kapsülden uzaklaştırıldı.

Epandorf tüpünün dibinde bulunan santrifüj materyalinin üzerine 300 mikrolitre 0,5 M NaOH ilave edildi ve dipte kalan bu tortunun çözülmesi sağlanmış oldu.Daha sonra tüm bu madde sintilasyon kabına konuldu ve üzerine Roti Saint Ecco Plus sintillatör 3 ml ilave edildi. Bu işlem sonunda radyoaktivite ölçülerek hepatik stellat hücrelerin proliferasyonları değerlendirildi.

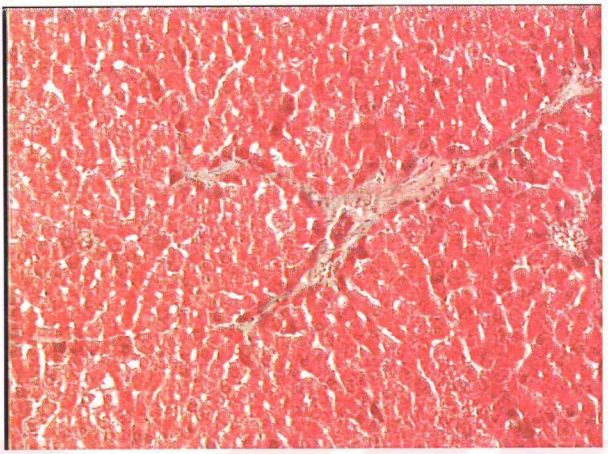
2.3. LABORATUAR TESTLERİ

2.3.1. Histopatolojik İnceleme

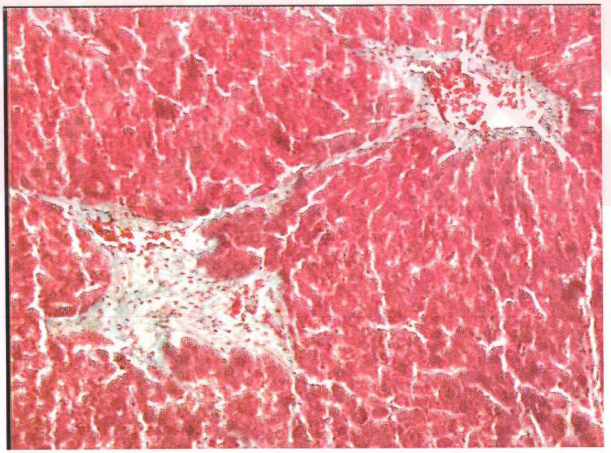
Karaciğer dokuları % 10'luk tamponlu formalinde tespit edilerek parafinde bloklandı. Her parafin bloktan 4-6 mikron kalınlığında kesitler (aynı bloktan 5 kesit) histopatalojik incelemeler ve TUNEL metodu ile apoptoz tayini için kullanıldı. Histopatalojik inceleme için ayrılan kesitler hematoksilen- eozin boyası ve trikrom ile boyanarak ışık mikroskobunda incelendi Ishak ve ark. 1995 – Knodell ve ark. 1981 de oluşturdukları skorlar modifiye edildi ve altı paterne ayrıldı (Şekil 2.3.1a, Şekil 2.3.1b, Şekil 2.3.1c, Şekil 2.3.d, Şekil 2.3.1e, Şekil 2.3.1f, Şekil 2.3.1g).



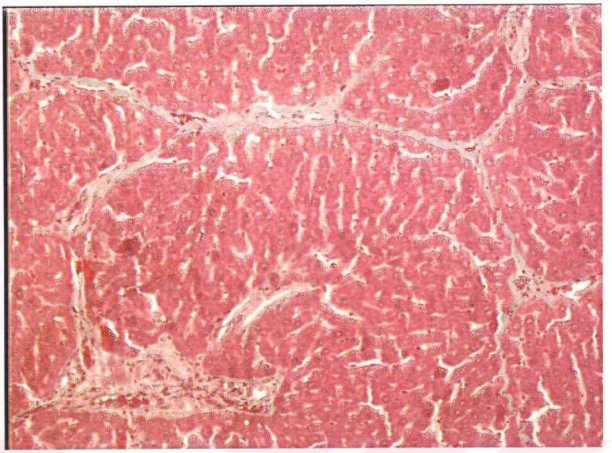
Şekil 2.3.1a (Patern 1) : Normal veya hafif genişleme gösteren portal alanlar; parankim normal



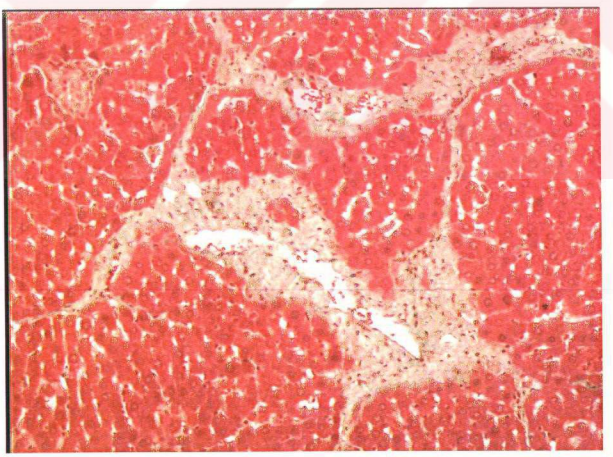
Şekil 2.3.1b (Patern 2) : Portal genişleme ve parankime kısa fibröz uzantıları,



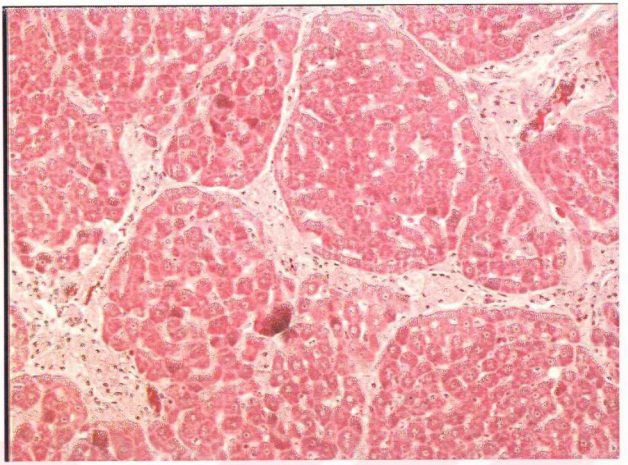
Şekil 2.3.1c (Patern 3) : Belirgin portal fibrozis, porto-portal az sayıda fibröz birleşmeler



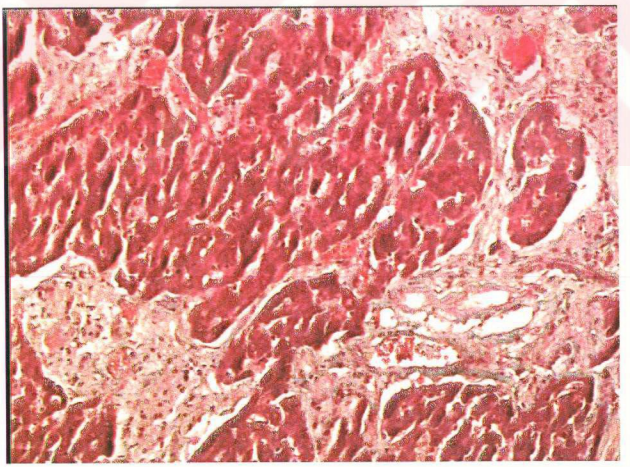
Şekil 2.3.1d (Patern 4) : Normal-hafif geniş portal alanlar, porto-portal fibrozis, tam birleşmeyen nodüller



Şekil 2.3.1e (Patern 5) : Belirgin portal fibrozis, porto-portal fibrozis, yer yer az sayıda mikro nodül oluşumu



Şekil 2.3.1f (Patern 6a) : Hafif orta genişlikte fibrozisli portal alanlar ince fibröz bantlardan oluşan mikronodüler sirotik süreç



Şekil 2.3.1g (Patern 6b) : Belirgin fibrozisli portal alanlar, kalın fibröz septumlu makro ve mikro nodül oluşumu sirotik süreç

2.3.2 Apoptotik Hücrelerin Saptanması:

Karaciğer apoptotik hücreler TUNEL yöntemi ile (Insitu Cell Death Detection kit, AP. Roche Diagnostics.Katalog No:1 684 809) saptandı. Bu amaçla yukarıdaki şekilde ayrılan doku kesitleri ksilollerde deparafinize edildi;100, 96, 80 ve 70'lik alkol serilerinden geçirilip dehidrate edildi. Sonra Cytonin solüsyonuna (Trivigen, katalog no:4876-05-01) konularak 37 °C etüvde 30dk bekletildi. Oda sıcaklığında %3 'lük hidrojen peroksitte 5 dk tutuldu. Nemli kamaraya alınarak üzerlerine birer damla TUNEL mixture (TdT ve label solution) damlatılarak 37 °C 60 dk bekletildi bunu izleyen aşamada kesitlere caverter POD damlatıldı. Yine 37 °C etüvde 30'ar dk tutuldu. Nihayet kesitler, 5 ml. Deiyonize su, 2 damla konsantre buffer ve 2 damla 3-amino-9 etilkarbazol (AEC) karışımından oluşan kramojende kontrollü olarak 5 dk bekletildi.

Kesitler Mayer's hematoksilen boyamasına gelinceye kadar fosfatlı bufferla (pH 7,4) yıkandı. Bu boya ile 1 dk karşıt boyamaya tabi tutulan kesitler, çeşme suyu altında yıkanıp ve jelatinli yapıştırıcı damlatılarak lamellerle kapatıldı.

Hazırlanan kontrol preparatlarıda aynı prosedüre göre boyandı. Ancak TUNEL mixture yerine DNA'sı ile muamele edildi.

2.3.3. Steliat Hücrelerinin Saptanması

Lipositler (Ito, satellit hücreleri) anti-smooth muscle (anti-SMA) primer serumu kullanılarak immunoperoksidaz yöntemiyle (Avidin-Biotin Peroksidaz (ABC)-Dako) saptanmaya çalışıldı. Aynı dokulardan hazırlanan kesitler ksilollerde deparafinize edilip, dereceli alkol serilerinde dehidre edildikten sonra tripsin solüsyonuna konularak 37°C'lik etüvde 10 dakika bekletildi. Oda ısısında 5 dakika % 3'lük hidrojen peroksitte 5 dakika tutulduktan sonra nemli kamaraya alındı. Üzerlerine birer damla normal keçi serumu damlatılarak 37°C'lik etüvde 30 dakika bekletildi.

Bunu izleyen aşamada bir kesite monoklonal anti-SMA (Sigma) serumu damlatılıp, 60 dakika aynı derecelik etüvde inkube edildi. Daha sonra tüm kesitlere biotinize sekonder antikor ve Streptavidin-peroksidaz damlatılıp 37°C'lik etüvde 30'şer dakika tutuldu. Nihayet kesitler 5 ml deionize su, 2 damla konsantre buffer ve 2 damla konsantre 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) karışımından oluşan kromojende 7 dakika bekletildi. Kesitler normal keçi serumunun kullanıldığı aşama hariç hematoksilenle boyanıncaya kadar fosfatlı bufferla (pH 7.4) yıkandı. Mayer'in hematoksilen boyasında 1 dakika karşıt boyamaya tabi tutulan kesitler, çeşme suyu altında yıkanıp ve jelatinli yapıştırıcı damlatılarak lamelle kapatıldı. Hazırlanan kontrol preparatları da aynı prosedüre göre boyandı.

2.3.4. CuZn SoD Aktivite Yöntemi ile Antioksidan Sistemin Belirlenmesi

Bu yöntemde ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile süperoksit radikali üretilmekte bu da nitroblue tetrazolium (NBT) ile reaksiyon vererek viyole renkli formazon boyası oluşturulmakta ve bu renk şiddeti 560 nm dalga boyunda ölçülmektedir.Ortamdaki Cu Zn SOD ise aktivitesine bağlı olarak bu reaksiyonu önleyerek % inhibisyon olarak hesaplanmaktadır.

2.3.5. MDA Ölçümü ile Oksidan Sistemin Belirlenmesi

Tiyabarbitürik asit ila MDA'nın reaksiyon vererek 532 nm dalga boyunda ölçülebilen renkli bir bileşik verme esasına dayanmaktadır.

2.3.6. Se GSH-Px Aktivite Yöntemi ile Antioksidan Sistemin Değerlendirilmesi

Bu yöntem H_2O_2 varlığında GSH'ın GSH-Px tarafından GSSG'ye oksidlenmesi ve oksidlenen GSSG'nın glütatyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a dönüştürülmesi esnasında ortamda bulunan NADPH'nın kullanılması ve kullanılan bu NADPH miktarındaki dolayısı ile absorbansta ki azalmanın 340 nm dalga boyunda izlemesi esasına dayanmaktadır.

2.4. İstatistiksel Analiz

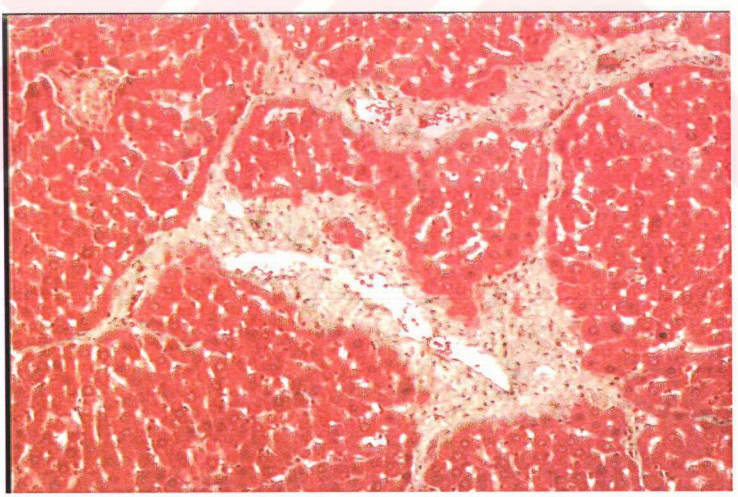
Tüm hesaplamalar SPSS, PC, Ver 4.5 inc USA ile yapıldı. Grupların patern incelenmesinde Kruskall-Wallis; iki grup arasındaki farkın anlamlılığı için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Diğer parametreler için One-Way Anowa testi kullanıldı. α serbestlik derecesi 0.05 olarak kabul edildi. $P<0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3-BULGULAR

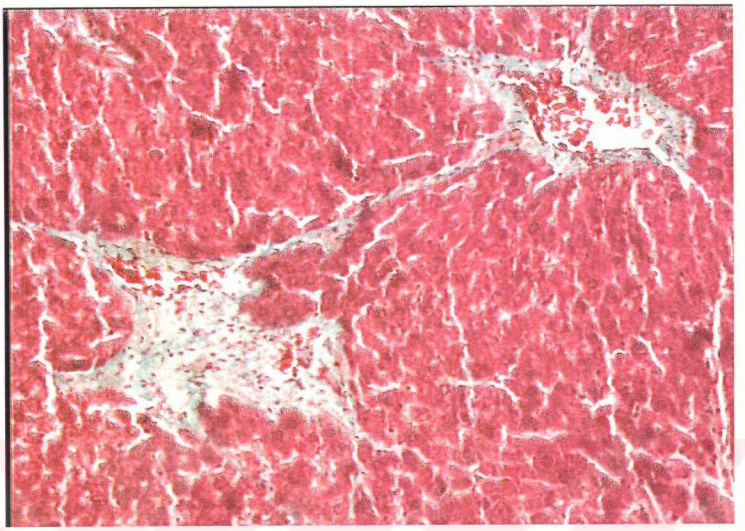
3.1. Histopatolojik Bulgular

3.1.1. Histopatolojik Patern

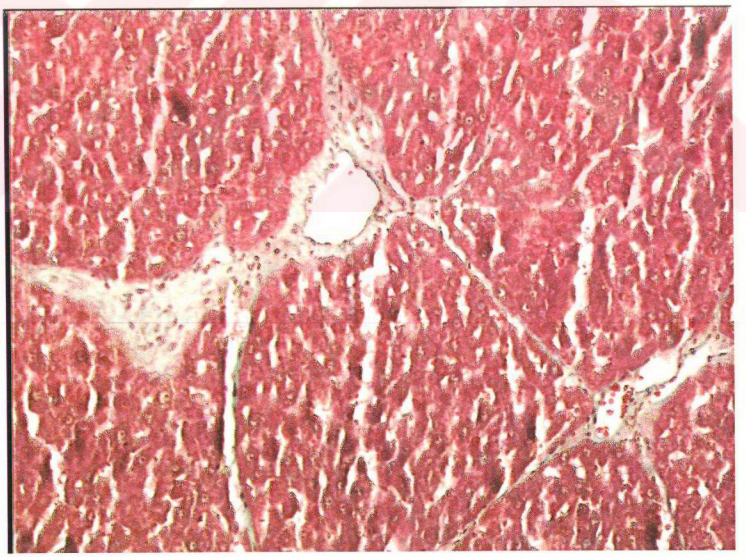
Histopatolojik patern yönüyle değelendirildiğinde; Grup 1 (Şekil 3.1.1a) ile kıyaslandığında grup 2 (Şekil 3.1.1b) grup 3 (Şekil 3.1.1c) ve grup 4 'de (Şekil 3.1.1d) istatistiksel olarak paternde düzelme saptanmıştır ($p<0.001$). Gruplar arasında histopatolojik patern skoru, grup 2 ve grup 3 ile grup 4 kıyaslandığında grup 4 de istatistiksel anlamlı düzeyde iyileşme saptanmıştır. ($p<0,03$). Grup2 ile grup 3 arasında istatistiksel anlamlılık bulunamadı ($p>0,05$) (Şekil 3.1.1e).



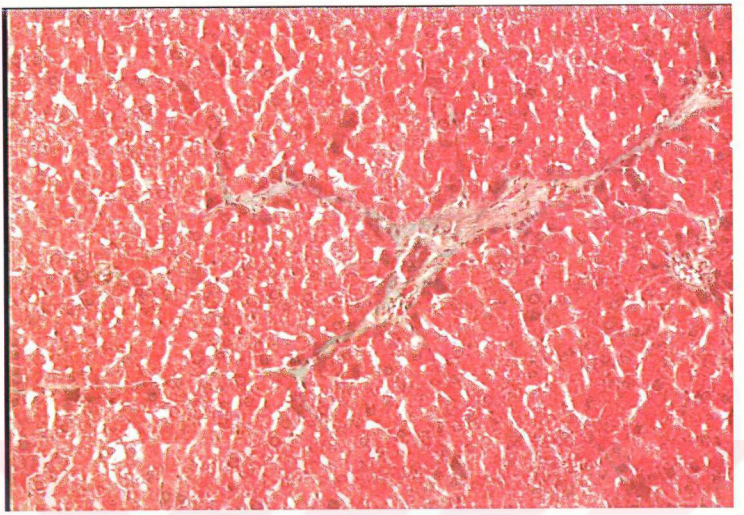
Şekil 3.1.1a Belirgin portal fibrozis, porto-portal fibrozis, yer yer az sayıda mikronodül oluşumu



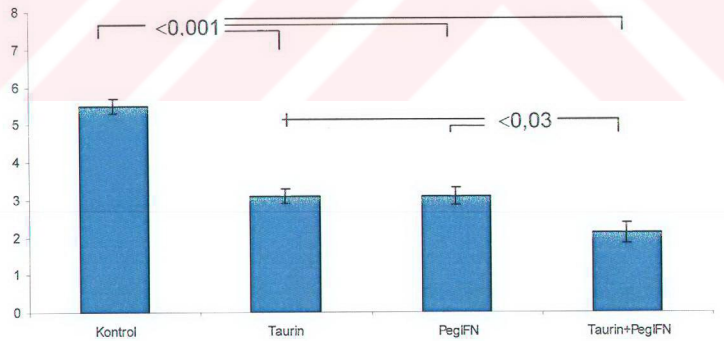
Şekil 3.1.1b Belirgin portal fibrozis, porto-portal az sayıda fibröz birleşmeler



Şekil 3.1.1c Portal fibrozis, porto-portal az sayıda fibröz birleşmeler



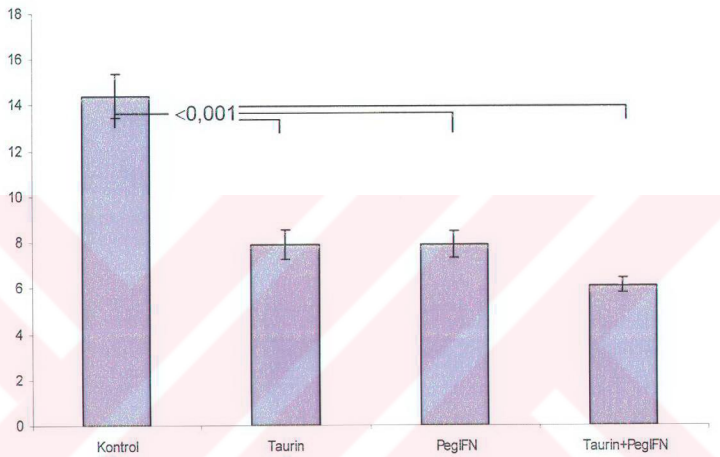
Şekil 3.1.1d Portal genişleme ve parankime kısa fibröz uzantılar



Şekil 3.1.1e Histopatolojik patern grafiği

3.1.2. Fibrozis

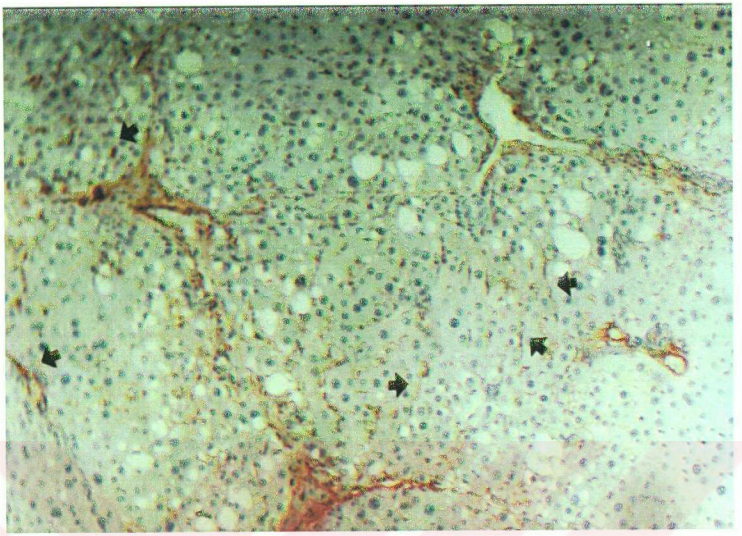
Fibrozis skorları Grup 1 ile kıyaslandığında Grup 2, Grup 3 ve Grup 4' de anlamli derecede düşük bulundu ($p < 0,001$). Gruplar arasında fibrozis skorları yönünden kombinasyon grubunda (grup 4) azalma olmasına karşın istatistiksel anlama ulaşamamıştır ($p>0,05$) (Şekil 3.1.2.).



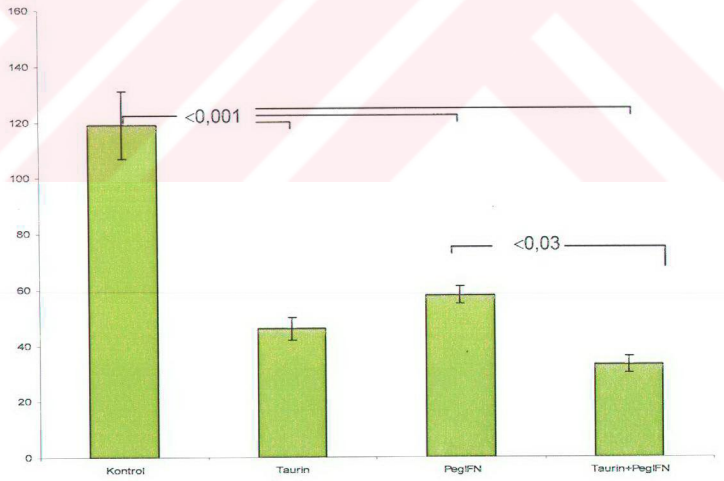
Şekil 3.1.2. Fibrozis skor grafiği

3.1.3. Alfa Düz Kas Antikor (α SMA)

α SMA (+) hücreler (Şekil 3.1.3a) yönünden değerlendirildiğinde Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 α SMA (+) hücre sayıları Grup 1' e göre daha anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0,001$). Tedavi grupları arasındaki değerlendirmede grup 3 ile kıyaslandığında grup 4 α SMA (+) hücre sayısı anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0,03$). Grup2 ve Grup 3 arasında istatistiksel fark yok idi. (Şekil 3.1.3b)



Şekil 3.1.3a α SMA (+) hücreler (okla işaretlenmiş)

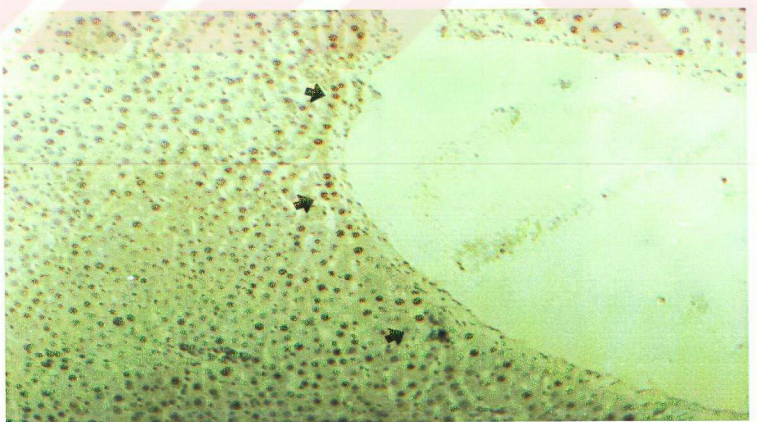


Şekil 3.1.3b αSMA (+) hücrelerin gruptaki dağılım grafiği

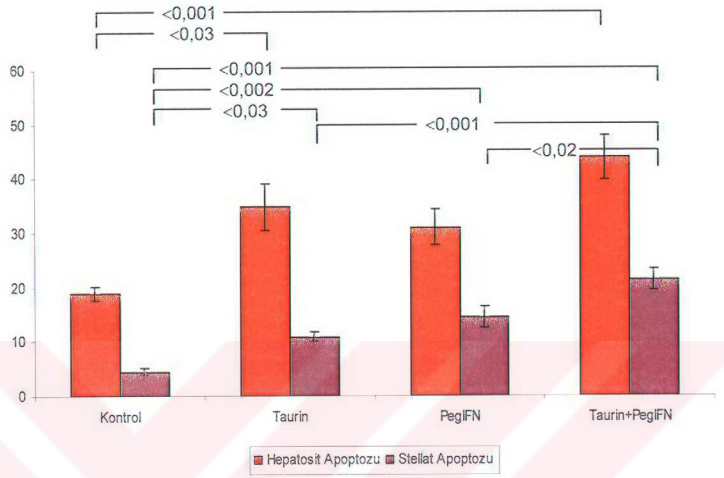
3.1.4. Apoptoz

Apoptoza uğrayan hepatositlerin yönünden değerlendirildiğinde kontrol grubu ile kıyaslandığında grup 2, ve grup 4' de hepatosit apoptozunun anlamlı düzeyde arttığı gösterildi (sırasıyla, $p < 0,03$, $p < 0,001$). Tedavi grupları arasında değerlendirmede kombinasyon grubunda (grup 4) ile (grup 3) ve (grup 2) de arasında istatistiksel fark saptanmadı ($p > 0,05$). Grup 3 ile grup 2 arasında istatistiksel fark yok idi ($p > 0,05$).

Apoptoza uğrayan stellat hücreler değerlendirildiğinde grup 1 ile kıyaslandığında grup 2, grup 3 ve grup 4' te stellat hücre apoptozunun anlamlı derecede arttığı saptandı (sırasıyla $p < 0,03$, $p < 0,002$, $p < 0,001$). Tedavi grupları arasındaki değerlendirmede kombinasyon grubu ile taurin grubu kıyaslandığında, kombinasyon grubunda stellat apoptozunun anlamlı düzeyde arttığı saptandı ($p < 0,001$). Kombinasyon grubu ile Peg IFN grubu kıyaslandığında, kombinasyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde stellat apoptozunun arttığı gösterildi ($p < 0,02$). Peg IFN grubu ile taurin karşılaştırıldığında Peg IFN grubunda stellat apoptozu artmış olmasına karşın istatistiksel anlama ulaşamamıştır ($p > 0,05$) (Şekil 3.1.4a, Şekil 3.1.4b)



Şekil 3.1.4a Hepatosit apoptozu (okla işaretlenmiştir)



Şekil 3.1.4b Hepatosit ve stellat apoptozunun istatistiksel değerlendirilmesi

3.2. Biyokimyasal Bulgular

3.2.1. Doku MDA (Malondialdehit)

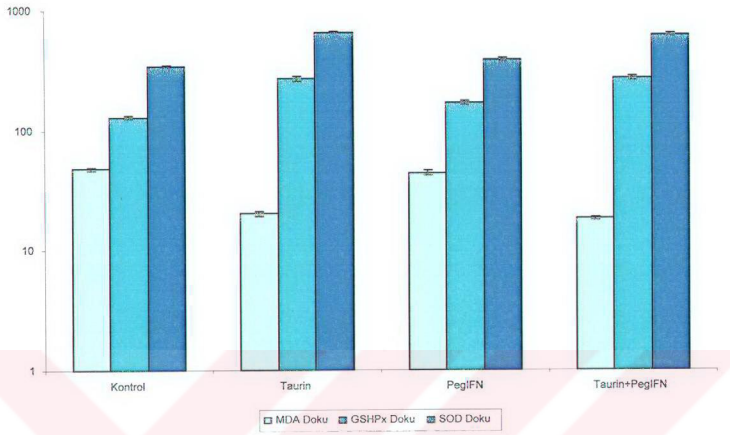
Grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4 doku MDA düzeyleri karşılaştırıldığında, grup 1 MDA düzeyinin diğer tedavi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gösterildi ($p < 0,001$). Tedavi grupları kıyaslandığında grup 3 ve grup 4 doku MDA düzeyleri karşılaştırıldığında grup 4 MDA düzeyinin anlamlı düzeyde azaldığı gösterildi ($p < 0,001$). Grup 4 ile grup 2 kıyaslandığında doku MDA düzeyi grup 4' de azalmasına karşın istatistiksel anlamlılığa ulaşamadı ($p > 0,05$). Grup 3 ile grup 2 değerlendirildiğinde grup 2 doku MDA düzeyi oldukça anlamlı düzeyde azalmıştı ($p < 0,001$).

3.2.2. GSHPx Doku

Doku GSHPx düzeyleri yönünden grup 2, grup 3 ve grup 4 ile grup 1 karşılaştırıldığında grup 2, grup 4 gruplarında doku GSHPx düzeylerinin arttığı saptandı ($p < 0,001$). Grup 4 ile grup 2 kıyaslandığında, GSHPx doku düzeyleri, aralarında istatistiki bir fark saptanmadı ($p > 0,05$). Grup 4 ile grup 3 arasında değerlendirme yapıldığında, grup 4 GSHPx doku düyeyinde belirgin istatistiki anlamlılık saptandı ($p < 0,001$). Grup 2 ile grup 3 kıyaslandığında Grup 2 de GSHPx düzeyinin istatistiki olarak anlamlı düzeyde arttığı gösterildi ($p < 0,001$).

3.2.3.SOD Doku (Süperoksit dismutaz seviyesi)

SOD doku düzeyleri açısından kombinasyon, taurin ve peg IFN grubu ile kontrol grubu değerlendirildiğinde pegIFN grubu dışındaki tedavi gruplarında SOD doku düzeyinin anlamlı olarak arttığı saptandı. Tedavi grupları değerlendirildiğinde; grup 4 ile grup 3 SOD doku düzeyleri karşılaştırıldığında grup 4 de istatistiki anlamlılık oluşmuştur ($p < 0,001$). Grup 4 ile grup 2 karşılaştırıldığında gruplar arasında SOD düzeylerinde istatistiksel fark oluşmadı ($p < 0,001$). Grup 3 ile grup 2 kıyaslandığında grup 2 doku SOD düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gösterildi ($p < 0,001$) (Şekil 4.2.3 Bulgular toplu olarak tablo 4.2.3 de gösterilmiştir).



Şekil 3.2.3. Oksidatif stres parametreleri

	Kontrol	Taurin	PegIFN	Taurin+ PegIFN	p
Patern	5,50±0,19	3,11±0,20	3,13±0,22	2,10±0,27	< 0,001*
Fibrozis	14,36±0,98	7,91±0,66	7,98±0,60	6,14±0,34	< 0,001†
Hepatosit Apoptozu	19,0±1,3	34,8±4,4	31,1±3,3	43,9±4,0	< 0,001†
Alfa SMA	119,4±11,8	46,1±3,8	58,2±3,2	32,6±3,0	< 0,001†
MDA Doku	48,0±1,3	20,2±0,9	44,0±2,2	18,4±0,6	< 0,001†
GSHPx Doku	129±4	269±14	168±7	270±10	< 0,001†
SOD Doku	344±6	647±15	387±10	619±19	< 0,001†

Tablo 3.2.3 Çalışmanın sonuçlarının tablo halinde değerlendirilmesi

3.3. Hepatik Stellat Proliferasyonu

3.3.1 Peg IFN

Peg IFNα2b'nin 10,50 ve 100 ng/ml konsantrasyonlarında inkübe edilen izole HSH proliferasyonu sırasıyla 24 saatte % 7,11 ve 18, 48 saatte % 8, 13 ve 23, 72. saatte ise % 12, 29 ve 38 oranında azaldı. Peg interferonun HSH proliferasyonunu inhibe edici etkisi en fazla 72. saatte ve 100 ng/ml dozunda gerçekleşti.

3.3.2. Taurin

Taurin 1, 5, 10, 20, 50 ve 100 mmol/L konsantrasyonlarında inkübe edilen HSH proliferasyon değerlerinde kontrol grubuna göre sırasıyla, 24 saatte % 4, 10, 12, 20 ,22 ve 28; 48 saatte % 4, 11, 13, 20, 25 ve 30 ; 72 saatte % 6, 13, 15, 22, 30 ve 33 oranında azalma tespit edildi. Taurin HSH proliferasyonunu doz ve uygulama süresi ile doğru orantılı olarak azalttı.

4-TARTIŞMA

Karaciğerde kronik hasar ile fibrogenez ve fibroliz arasındaki denge bozulur ve fibrozis yani aşırı konnektif doku birikimi meydana gelir. Aşırı matriks birikiminin temel mekanizması matriks üretiminin uyarılmasıdır (Alcolado ve ark., 1997; Gressner ve ark., 1999). Matriks yıkımının inhibisyonu da kollajen matriks birikimi ve kollajen olmayan komponentlerin dağılımının değişmesine neden olur (Schuppan ve ark., 1990).

Fibrozis patogenezinde anahtar olay olarak tanımlanan hepatik stellat hücre aktivasyonu sürecinde bu hücrelerin proliferasyonunun uyarılması, durağan fenotipten miyofibroblast fenotipine transformasyon, matriks proteinlerinin, glikokonjugatların ve glikozaminoglikanların (hyaluronan) sentez ve sekresyonunda artma ve aktive olan HSH' lerin kontraktilite özelliği kazanması şeklinde bir seri değişiklikler oluşur (Gressner ve ark., 1999). Hepatositlerin ekstrasellüler matriks üretimine direkt katkısı varsa bile çok azdır (Schuppan ve ark., 1990).

Karaciğer fibrozisinin geriye dönüşümlü olduğu yönünde bol miktarda bulgu vardır. Parankimal karaciğer hasarı hayvan modelinde tek doz CCl_4 uygulamasının ardından α-SMA pozitif aktive HSH sayısında artış oluşur (Iredale, 1998; Iredale, 2001). Eğer enjeksiyon tekrarlanmazsa bu durum hızla geriye döner. Rezolüsyon ekstrasellüler matriksin azalması ve normal veya normale yakın yapının tekrar oluşması ile karakterize olup bazen yıllar alabilir. Sirotik evrenin de kısmen geriye dönebildiğine yönelik bildiriler vardır. Yapılan çalışmaların çoğunda direkt olarak gösterilmemiş olsa da, bu normale dönüş aktive HSH sayısında azalma veya aktivasyon konumunda değişime bağlıdır.

Aktive HSH sayısı fibrozis ilerledikçe artarken gerileme döneminde azalır. HSH kaybının en fazla olduğu dönemde aktive HSH apoptozunda artış vardır (Iredale ve ark., 1998; Pietrangelo ve ark., 1996). Yani, rezolüsyon döneminde apoptoz ile hem ekstrasellüler matriks üreten hem de bu matriksin yıkımını inhibe eden TIMP' leri sentezleyen hücrelerin yani aktive

HSH' lerin ortadan kaybolması sağlanır. Diğer yandan, normalde karaciğerde üretilen fazla matriksi yıkan metalloproteinazların aktivitesi karaciğer fibrozisi sürecinde azalmaktadır. Hatta, karaciğer fibrozisinin gerilemesi metalloproteinaz aktivitesinde oluşan artmayla karekterizedir (Iredale ve ark., 1998). Bu nedenle, HSH apoptozu karaciğerde fibrozisin gerilemesinin en temel mekanizması olarak değerlendirilmektedir (Iredale ve ark., 1998). Apoptoz ile aktive HSH sayısının azalması fibrotik matriksin metalloproteinazlarca yıkımını da kolaylaştırır. Progresif fibrozisin her döneminde HSH' lerin toplam sayısı proliferasyon ve apoptoz arasındaki dengeyi yansıtmaktadır.

Oksidatif stres HSH aktivasyonu ve karaciğer fibrozisi ile gerek direkt olarak gerekse hasara uğramış hepatositlerce oluşturulan parakrin stimülasyon ile ilişkilidir (Pietrangelo ve ark., 1996; Suegliati ve ark., 1998). Oksidatif stres ürünleri üretiminde artma ile in vivo matriks oluşumu arasında ilişki bulunmuştur (Tsukamoto ve ark., 1995). Hidrojen peroksit üretimi artışı potent bir profibrojenik mediator olan TGF-β aktivasyonuna neden olur. Bu da oksidatif stresin hem lipid peroksidasyonu hem de parakrin mekanizmalar ile fibrogenezde rol oynadığına işaret etmektedir (De Blesser ve ark., 1999). HSH' leri oksidatif stres ürünlerinin zararlı etkilerine karşı koruyan kritik bir antioksidan enzim olan glutatyon-S-transferaz düzeyi de oksidatif stress sonucunda azalır (Whalen ve ark., 1999). Glutatyon-S-transferaz düzeyinin azalması lipid peroksidasyon ürünlerinin detoksifikasyonunun engellenmesine ve oksidatif strese duyarlılık oluşmasına neden olmaktadır.

Daha önce yapılan çalışmalarda konvansiyonel interferonların fibroblast kültürlerinde kollajen sentezini baskıladığı gösterilmiştir. Bu yönüyle interferon γ' nın etkin, interferon α' nın ise zayıf olduğu bildirilmiştir (Schuppan ve ark., 1998; Weng ve ark., 2001). Ancak, interferon γ' nın hayvan deneylerinde kullanılan ve antifibrotik etkinliğinin gösterildiği dozlar insanlar için oldukça toksiktir. İnterferon alfa ile deneysel karaciğer fibrozisi modellerinde yapılan çalışmalarda bu ajanın biyokimyasal düzelme ve histolojik iyileşme sağladığı (Boucher ve ark., 2000; Moreno ve ark., 1995), antifibrotik etki için yüksek dozlar gerekmediği (Muriel ve ark., 1997) veya

bunun aksine doza bağımlı olarak bu etkinin arttığı (Souza ve ark., 2001), erken başlandığında fibrozisi daha belirgin azaltıp kollajen birikimini engellediği ancak portal basınca etkisinin olmadığı (Fort ve ark., 1998) gibi araştırma sonuçları vardır.

Taurin potent bir antioksidandır. Hücre volüm homeostazı, protein stabilizasyonu ve stres cevaplarında önemlidir. Hücre içinde normalde bulunan miktarda DNA hasarını engelleyici etkisi vardır (Messina ve ark., 2000). Deneysel diabetik nöropati (Obrosova ve ark., 2001), kurşun (Gurer ve ark., 2001) ve CCl_4' kaynaklı oksidatif stres (Vohra ve ark., 2001) ve deneysel diabetic böbrekte (Ha ve ark., 1999) antioksidan mekanizmalar aracılığıyla koruyucu etki göstermiştir. Ayrıca, lenste protektif etki (Devamanoharan ve ark., 1998), insan endotel hücresi viabilitesinde düzenleyici etkileri (Wang ve ark., 1996) de vardır. Kronik karaciğer hastalıklarının tedavisi için yapılan çalışmalarda hepatik hasarın başlamasını ve ilerlemesini engellediği bildirilmiştir. CCl_4 toksisitesine karşı etkili bulunmuştur. CCl_4 uygulanan ratlarda hepatik taurin miktarının 12-24 saat sonra anlamlı düzeyde azaldığı ve oral taurin uygulamasının bu hepatik taurin azalmasına karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir. Bütün bunlar taurinin toksinlere karşı koruyucu olarak kritik rolü olduğuna işaret etmektedir (Nakashima ve ark., 1982; Waterfield ve ark., 1993; Timbreli ve ark., 1996). Bazı organ hasarı modellerinde MMP aktivitesiyle ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Bleomisin kaynaklı akciğer hasarı ve uyarılmış nötrofillerce oluşturulan glomerül bazal membranı hasarında oksidatif stres sonucunda aktive olan metalloproteinazların etkilerine karşı koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Blaisdell ve ark., 1995). Taurin insan PMN hücrelerinde arsenit kaynaklı apoptozu (Watson ve ark., 1996), endotel hücresi apoptozunu (Wang ve ark., 1996; Wu ve ark., 1999; Alfieri ve ark., 2002) ve hiperglisemi ve radyokontrast madde/hipertonisite kaynaklı renal tübüler hücre apoptozunu (Hizoh ve ark., 2002) muhtemel olarak intrasellüler kalsiyum çıkışına etki ederek inhibe etmiştir. CD 95 reseptörü ve kaspas aracılı bir mekanizma ile taurinin hücre dışına çıkması ile apoptotik DNA fragmantasyonu ve hücre şişmesi başlamakta ve hücrenin apoptotik uyarı verilmeden taurin ile

yüklenmesi ise bu apoptotik kaskadın başlamasını engellemektedir (Lang ve ark., 2000). Renal epitel hücrelerinde taurinin gösterdiği antiapoptotik etkinlik N-asetil sistein (NAC) ile oluşmadığından dolayı sitoprotektif etkinliğin sadece antioksidan mekanizmalar aracılığı ile oluşmadığı düşünülebilir. Bununla birlikte, taurin, in vitro ortamda, glutatyon ve NAC' in aksine eozinofil apoptozuna etkisizdir.

Karaciğer fibrozisinin kesin bir tedavisi bulunmadığından ve etyolojisinin multifaktöriyel, patogenezinde ise çeşitli faktörlerin etkili olmasından dolayı, bugüne kadar in vitro, in vivo veya klinik çalışmalarda faydalı bulunmuş olan ajanların potansiyelize edici ve/veya aditif etkinliklerinin araştırılması amacıyla kombinasyon tedavilerinin önemi vardır.

CCl_4 ile oluşturulan deneysel karaciğer fibrozisi safra kanalı ligasyonu ile birlikte günümüzde en sık kullanılan modeldir. Mortalitesi düşük ve emniyetli bir yöntemdir. 12 hafta, haftada iki defa cilt altı uygulanmasının ardından erken dönemde sentrilobüler hasar, takiben perivenüler fibrozis ve son olarak da fibröz septalarla karakterize siroz gelişmektedir. Yapılan araştırmalarda intraperitoneal uygulandığında 4-6 haftada, cilt altı uygulandığında da 8-12 haftada fibrozis, sonrasında ise siroz geliştiği rapor edilmiştir. Önceki çalışmalarımızdan elde ettiğimiz deneyimlerin de bir sonucu olarak, bu yöntemle fibrozisin 12. haftada en yüksek düzeyde olduğunu tespit ettik.

Çalışmamızda, yeni bir molekül olup kronik HCV enfeksiyonunda klinik olarak kullanımı onaylanmış olan Peg-IFNα, CCl_4 ile oluşturulmuş karaciğer fibrozisini anlamlı düzeyde geriletmiştir. Etken ortadan kalktıktan sonra spontan olarak gerileme özelliği gösteren karaciğer fibrozisi üzerine elde edilen bu etkinlik aslında grubumuzca daha önce yaptığımız bir araştırmada elde ettiğimiz bulgularla uyumludur (Taşçı ve ark., 2003). Peg-IFNα_{2b} 1,5 μg/kg dozunda verilmiştir. Bu, ABD' de Food And Drug Administration tarafından insanlarda kronik HCV tedavisi için önerilen dozdur. İnsanlarda uygulandığı gibi haftada bir defa subkutan enjekte edilmiştir. Peginterferon α_{2b}' nin bu dozda uygulanması konvansiyonel interferonlarla karşılaştırıldığında, viral hepatitlerde, monoterapide kalıcı cevap yönünden anlamlı üstünlük sağlamıştır (Lindsey ve ark., 2001). Ayrıca, insanlardaki

kronik viral hepatitlerde interferonların antiviral yanıt oluşmasa bile uzun dönemde fibrozis gelişimini yavaşlattığı bildirildiğinden (Guerret ve ark., 1999) antiviral etkinliklerinden bağımsız antifibrotik etkilerinin olduğu yönünde görüşler vardır. Peg-IFN α_{2a} ile sirotik hastalarda yapılan bir çalışmada antiviral dozda fibrozisin gerilediği bildirilmiştir (Heathcote ve ark., 2000). Çalışma yaptığımız fibrozis modeli kronik viral hepatit nedenli olmadığından fibroziste gözlemlediğimiz azalma Peg-IFNα_{2b}' nin antiviral etkisinden bağımsız antifibrotik etkisinin olduğu düşüncesini destekleyen bir bulgudur.

İnterferon uyguladığımız ratlarda ileri fibroziste de HSH apoptozu anlamlı düzeyde artış göstermiştir. İn vitro ortamda, stimüle edilen HSH' ler üzerine artan konsantrasyonlarda uygulanan Peg-IFNα bu hücrelerin proliferasyonunu azaltmıştır. İnterferonların HSH apoptozunu indüklemeleri yanında aktivasyon sürecindeki hücrelerin proliferasyonunu engellemesi antiviral özelliklerinden bağımsız antifibrotik aktivitelerini açıklamaya yardımcı olabilir. Hepatosit apoptozuna olan etkisinin ise spontan gerileme grubuyla benzer olması antifibrotik etkisini direkt olarak HSH' ler üzerinden gösterdiğini düşündürebilir.

HSH' lerin karaciğerden uzaklaştırılması için önemli yol olan fibrozisin spontan gerilemesinin temel basamağını oluşturan apoptoz Peg-IFN uyguladığımız ratlarda spontan iyileşmeye bıraktığımız ratlara göre anlamlı düzeyde artmıştır. Yukarıda öne sürülen, henüz aktive olmamış hepatik stellat hücrelerin durağan fenotipinin korunması düşüncesiyle beraber aktive HSH apoptozunu indükleyerek yeni ekstrasellüler matriks sentezini baskılaması peginterferon α_{2b}' nin majör antifibrotik etki mekanızması olabilir.

Taurin uygulaması da fibrozis skorlarını anlamlı derecede düşürmüştür. Hepatotoksin kaynaklı sıçan fibrozisinde taurinin iyileştirici etkinliği araştırma grubumuz ve başka diğer araştırmacılar tarafından da daha önce gösterilmişti (Mas MR 2004 ve ark.; Balkan ve ark., 2001). Potent bir antioksidan olan taurinin karaciğer fibrozisindeki etkinliğinin oluşan oksidatif stresi azaltması aracılığı ile olması mevcut bilgiler ışığında olasıdır. Çünkü oksidatif stres HSH aktivasyonu için en önemli başlatıcı etkilerdendir. Gerçekten de, çalışmamızda taurinin antioksidan sistemlere karşı etkinliği

oksidatif stres parametrelerini iyileştirmesi şeklinde bir kez daha gösterilmiştir. Bununla beraber, taurinin renal epitel hücrelerinde gösterdiği koruyucu etki N-asetil sistein ile oluşmamaktadır. Antifibrotik etkinliğinin salt antioksidan mekanizma olmadığına işaret edebilecek bu duruma başka bir bakış açısı getirebilmek için fibrozisin rezolüsyonunda çok önemli bir mekanizma olarak ileri sürülen HSH apoptozuna taurinin etkisini araştırdık. Ayrıca, α SMA (+) HSH' lerden apoptoza gidenleri TUNEL boyama yöntemiyle tespit ettik. Sonuçta taurin uygulanan ratlarda apoptoza giden HSH sayısının spontan iyileşme grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını gözlemledik. Daha önce bir çok hücre grubunda antiapoptotik özellik gösteren, belki bu yolla organ koruyucu özellik sergileyen taurinin fibroblast özellikli bu hücrelerin apoptozunu artırması gerçekten önemli bir bulgudur. Zira, HSH apoptozunun indüklenmesi potansiyel bir fibrozis tedavisi yöntemi olarak gösterilmektedir (Bataller ve ark., 2001). Taurin uygulaması ile hepatosit apoptozunda oluşan artmanın terapötik anlamı açık değildir. Bununla beraber, interferonla benzer oranda azalmış fibrozis skorları elde edildiğinden taurinin hepatosit apoptozunu artırması da antifibrotik etkinliğinin altında yatan mekanizmalardan birisi olabilir.

Çalışmamızda, izole HSH proliferasyonuna etkinlik araştırılmış ve kültür ortamında, fibrotik stimülasyon almış aktive HSH' lerin proliferasyonunu taurin tarafından artan konsantrasyonlarda daha fazla olacak şekilde inhibe olduğu gözlenmiştir. Taurinin fibrojenik fenotipteki HSH apoptozu üzerine etkisi de in vitro çalışmalarda araştırılmalıdır. İnterferon ile taurin arasında fibrozis skorlarına ve α SMA (+) HSH sayısına etki yönünden anlamlı fark yokken doku MDA ve SOD düzeylerinin taurin uygulaması ile anlamlı düzeyde fazla iyileştiği tespit edilmiştir. İnterferon ve taurinin birlikte uygulanmasının fibrozis skorlarına olan etkisi tek başına uygulanmalarına göre daha fazla olsa da istatistiksel olarak farklılık oluşmamıştır. Bu bulgu α SMA (+) HSH sayısında elde edilen azalma ile desteklenmektedir. İn vitro ortamda HSH proliferasyonu üzerindeki etkilerinin paralellik göstermesi her iki ajanın da bu hücreler üzerine direkt etkilerinin olduğunu düşündürebilir. Kombine uygulanmaları halinde hepatosit apoptozunun interferonun tek

başına uygulanmasına göre değişiklik göstermemesi, taurin uygulamasına göre ise anlamlı düzeyde artması taurinin hepatositler üzerine gösterdiği apoptotik etkinliğin interferonda yeterince olmadığına işaret edebilir. HSH apoptozu interferon uygulaması ile taurin grubuna göre daha fazla artmasına rağmen aradaki fark anlamlı düzeye ulaşmamıştır. Kombinasyon tedavisi ise HSH apoptozunu her iki ajanın da tek başına uygulanmasına göre anlamlı olarak artırmıştır. Diğer parametrelerle beraber değerlendirildiğinde bu iki ajanın HSH apoptozunu indükleyici etkilerinin birbirini potansiyelize ettiği düşünülebilir. Taurin ile oluşan oksidatif stres azalması aktive HSH' ler için gerekli yaşam sinyallerinin oluşmasını azaltarak bu hücrelerin apoptozunu indüklüyor olabilir. Çünkü oksidatif stres ve ardından gelişen PDGF, TGF-β vb. sitokin aktivasyonu ve hepatosit- HSH etkileşimi aktive olmuş bu hücreler için yaşam sinyalleri oluşturarak proglamlanmış hücre ölümünü engellemektedir (Iredale ve ark., 2001).

5-SONUÇ VE ÖNERİLER

Karaciğer fibrozisi etken ortadan kalktıktan sonra spontan gerileme özelliğine sahip, ancak, henüz tedavisi bulunamamış bir hastalıktır. Aşırı matriks üretiminden fibrogenez sürecinde aktive olarak myofibroblast fenotipi kazanan hepatik stellat hücreler sorumludur. Terapötik yaklaşımlarda yeni matriks oluşumunun engellenmesinin yanında oluşmuş olan matriksin yıkımını uyarılması da en temel hedef olmalıdır. Oksidatif stres stellat hücre aktivasyonu ve hasarın ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır. Oksidatif stresin azaltılması fibrogenezin durdurulmasında faydalı olabilir. Karaciğerde, aktive olmuş stellat hücrelerin ortamdan uzaklaşmasını sağlayan en etkili yollardan birisi bu hücrelerin apoptoza gitmeleridir. Bu hücrelerin apoptozunun uyarılması etkili bir tedavi seçeneği olabilir. Kronik viral hepatitlerde en etkili tedavi ajanı olan interferonların antifibrotik potansiyelleri olduğu deneysel ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir. Hepatik stellat hücrelerle direkt ilişkileri tam olarak ortaya konmamıştır. Moleküler yapı değişikliği ile oluşturulan, klinik kullanıma yeni giren ve daha etkili antiviral cevap oluşturmakla beraber fibrotik sürece etkileri bilinmeyen bu ajanların deneysel fibrozise etkilerinin araştırılması faydalı olabilir. Taurin potent bir antioksidandır. Bir çok hastalıkta akut ve kronik hasarı engelleyebilmektedir. Deneysel karaciğer fibrozisinin başlamasını engelleyebilmektedir. Bu çalışmada, peginterferon$_{\alpha}$ ve taurinin sıçanlarda oluşturulmuş deneysel karaciğer fibrozisini geriletmiştir. Her iki ajan da in vitro stellat hücre proliferasyonunu baskılamıştır. Etki mekanizmaları farklı bu iki ajanın birlikte uygulanması antifibrotik mekanizmaları desteklese de matriks birikiminin azaltılmasına anlamlı fayda sağlamamıştır.

ÖZET

Deneysel Karaciğer Fibrozisinde Peginterferon Alfa 2b Ve Taurin Tedavilerinin Spontan Gerilemeye Katkısının İn-Vivo Ve İn-Vitro Değerlendirilmesi

Kronik karaciğer hastalıklarının sık bir komplikasyonu olan fibrozis fibrogenez (matriks üretimi) ile fibroliz (matriks yıkımı) arasındaki dengenin bozulmasının bir sonucudur. Etyolojisi ne olursa olsun tüm dünyada yaygın bir ölüm sebebidir. Karaciğerde aşırı üretilerek biriken ekstrasellüler matriksin kaynağı hepatik stellat hücrelerdir. Antifibrotik tedavi çalışmaları bu hücrelere doğrudan müdahelenin yanında fibrogenez sürecinde birbirleriyle, hepatositlerle ve matriks komponentleriyle etkileşimlerini düzenlemeye yöneliktir. Bu çalışmada, kronik karaciğer hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan interferon α_{2b}' nin molekül yapısında değişiklik oluşturularak geliştirilen peginterferon α_{2b} ile potent bir antioksidan olan taurinin antifibrotik etkinliklerini değerlendirdik.

Erkek cins, 60 adet Sprague-Dawley ratında SC CCl_4 uygulanarak 12 haftada karaciğer fibrozisi oluşturuldu. CCl_4 uygulaması sonlandırılarak Grup I spontan iyileşmeye bırakıldı. Grup II' ye peginterferon α_{2b} 1.5μg/kg haftada tek doz, Grup III' e taurin 1200 mg/kg/gün uygulandı. Grup IV' e ise bu ajanların aynı dozlarda kombinasyonu uygulandı. Dört haftalık bir tedavinin ardından tüm gruplar sakrifiye edilerek histopatolojik fibrozis skorlaması, α SMA (+) HSH sayısı, oksidatif stres belirteçleri (SOD, MDA, GSH-Px), apoptoza giden hepatosit ve HSH sayısı ile in vitro ortamda her iki ajanın da izole HSH' lerin proliferasyonuna etkileri değerlendirildi.

Peginterferon α ve taurin fibrozise olumlu etki sağladı. Fibrozis skorları Grup

1 ile kıyaslandığında Grup 2, Grup 3 ve Grup 4' te anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,001$). Kombinasyon grubunda (Grup 4) tek başına uygulamaya göre daha iyi sonuçlar oluştu ama istatistiksel anlamlılık oluşmadı ($p>0,05$). Aktivasyon göstergesi olarak α SMA (+) boyanan HSH sayısı Grup 2, Grup 3 ve Grup 4' te Grup 1' e göre anlamlı olarak azaldı ($p<0,001$). Tedavi grupları arasında, Grup 4' te Grup 3' e göre α SMA (+) hücre sayısı anlamlı olarak azaldı ($p<0,03$). Grup 1 ile Grup 3 değerlendirildiğinde Grup 3' teki α SMA (+) hücre sayısı anlamlı derecede azaldı ($p<0,001$). Grup 2 ve Grup 3 arasında istatistiksel fark oluşmadı ($p>0.05$). Peg-IFN hepatosit apoptozuna etkisiz bulundu. Taurin ve kombinasyon tedavisi hepatosit apoptozunu artırdı (sırasıyla $p<0,03$, $p<0,001$). Peg-IFN ve taurin arasında hepatosit apoptozu yönünden fark bulunmadı. Grup 2, 3 ve 4' te HSH apoptozu anlamlı düzeyde arttı (sırasıyla, $p<0.03$, $p<0.002$, $p<0.001$). Kombinasyon yalnız Peg-IFN ve yalnız taurine göre anlamlı apoptoz artırdı (Sırasıyla $p<0.02$, $p<0.001$). Peg-IFN ve taurin arasında HSH apoptozu açısından anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Doku SOD, MDA ve GSHPx değerlerine etkinlik taurinde anlamlı düzeyde fazla bulundu. Peg-IFN 10, 50 ve 100 ng/ml konsantrasyonlarında 24, 48 ve 72 saatlik zaman noktalarında izole HSH' lerin proliferasyonunu azalttı. Proliferasyonun gerilemesi en kuvvetli 72. saatte gerçekleşti. Taurin 1, 5, 10, 20, 50 ve 100 mmol/L konsantrasyonlarında izole HSH proliferasyonunu kontrol grubuna göre, 24 48 ve 72 saatlik zaman noktalarına göre doğru orantılı azalttı.

Sonuç olarak, peginterferon α ve taurin deneysel karaciğer fibrozisini geriletti. Bu iki ajanın birlikte uygulanması fibrozis üzerine anlamlı etkinlik artışı sağlamadı.

Anahtar Sözcükler: Karaciğer fibrozisi, PegIFNα$_{2b}$, Taurin

SUMMARY

Evalution of In vitro and In vivo Effects of Pegylated Interferon Alfa 2b and Taurine Treatments on Spontaneous Recovery in Experimental Liver Fibrosis

Fibrosis, a frequent complication of chronic liver diseases is characterized by overproduction (fibrogenesis) and diminished degradation of matrix proteins (fibronolysis) in the sinusoids. It ultimately progresses to cirrhosis which is a common cause of mortality worldwide. Main cells that produce excess matrix are hepatic stellate cells (HSC). Antifibrotic treatment strategies have been being directed not only to direct interference with intracellular events of these cells but also on correction of altered signaling between HSCs and hepatocytes, other non parenchymal cells and collagen matrix.

We studied the effects of peginterferonα_{2b}, a newly modified interferon$_{\alpha}$ molecule with higher sustained antiviral response rates, and a potent antioxidant taurins on experimental liver fibrosis.

Sixty male Sprague-Dawley rats were injected SC with CCl_4 for 12 weeks to induce liver fibrosis. Then, hepatotoxin induction was stopped and the rats were divided into four groups. Group I (n=15) was left for spontaneous recovery. Group II was treated with peginterferonα_{2b} 1.5μg/kg/week, Group III with taurin 1200 mg/kg/day, and Group IV with the combination of these two regimens. After four weeks of treatment all the rats were killed and histopathological fibrosis scores, α SMA (+) HSH counts, oxidative stress parameters, apoptotic hepatocytes and HSCs were determined. Individual effects of the two agents on in vitro HSC proliferation were analyzed on isolated cells.

Peginterferon$_\alpha$ and taurin equally improved fibrosis. Fibrosis scores were reduced significantly in Group I, II and III when compared to Group I ($p<0,001$). Scores were lower in Group IV than Group II and III but the difference was not significant ($p>0,05$). As the indication of activation, α SMA (+) cell counts were reduced Group II, III and IV when compared to Group I ($p<0,001$). Group IV α SMA (+) cell counts were lower than Group III ($p<0,03$). α SMA (+) cell counts were significantly low in Group III than Group I ($p<0,001$). Number of α SMA (+) cells in Group II and three were similar. Peginterferon$_\alpha$ did not effect hepatocyte apoptosis. Taurin alone and its combination induced hepatocyte apoptosis significantly ($p<0,03$, $p<0,001$, respectively). Effects of peginterferon$_\alpha$ and taurin on hepatocyte apoptosis were similar. HSC apoptosis increased significantly in Group II, III and IV when compared to Group I ($p<0,03$, $p<0,002$, $p<0,001$, respectively). Combination regimen (Group IV) significantly increased HSC apoptosis in comparison with individual peginterferon$_\alpha$ and taurin treatments ($p<0,02$, $p<0,001$, respectively). There was no difference between apoptotic cell counts in Group II and III ($p>0.05$). Tissue SOD, MDA and GSHPx levels improved significantly in taurine treated Group III. Peginterferon$_\alpha$ inhibited isolated HSC proliferation at 10, 50 and 100 ng/ml concentrations at 24, 48 ve 72nd hour time points. The maximal effect occurred at 72nd hour. Taurine also inhibited HSC proliferation at concentration of 1, 5, 10, 20, 50 and 100 mmol/L at 24, 48 and 72nd hour directly proportional with the time.

In conclusion, peginterferon α and taurine both has improving effects on experimental liver fibrosis. Although seems favorable, combination of these two has no significant benefit.

Key Words: Liver fibrosis, Peg IFNα$_{2b}$,Taurin

KAYNAKLAR

ALCOLADO, R., ARTHUR, M.T., IREDALE, J.P. (1997).: Pathogenesis of liver Fibrosis. *Clinical Science* 92;103-112

ANKONELLO P. (1996): Metals, Oxidative Stress and Hepatic Fibrogenesis. *Seminars in Liver Disease*, 16(1): 13-30

ALFIERI RR, CAVAZZONI A, PETRONINI PG, BONELLI MA. (2002).:Compatible osmolytes modulate the response of porcine endothelial cells to hypertonicity and protect then from apoptosis. *J.physiol* 15; 540; 499-508

ALT, M. AND CASELMAN WH. (1995): Liver-directed Gene Therapy: Molecular Tools and Current Preclinical and Clinical Studies. *Journal of Hepatology*. 23: 746-58

BATALLER, R., BRENNER, DA. (2001):Hepatik stellate cells as a Target for the Treatment of Liver Fibrosis.*Sem liver Disease*, 21 (3):427-436

BENHAMAU, JP., BİRCTIER, J., MCINTYRE, N., RİZZETO, M., RODES, J. (1999): *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*, :3-31

BERNARD, H., DAVİS, R., THOMAS, F., KRESİNA, V. (1996): Hepatic Fibrogenesis. *Clinics in Laboratory Medicine*. Vol., 16. Number 2:331-375

BERGMAN (1963), I., Lowleys R.Two Improved and Simplified Methods for the Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline. *Analytical Chemistry*, 35 (12):1961-1965

BİSSELL, D.M. (1990): Cell-Matrix Interaction and Hepatic Fibrosis. *Prog Liver Dis*., 9:143-55

BLAISDELL RJ, GIRI SN. (1995): Mechanism of antifibrotic effect of taurine and niacin in the multidose bleomycin-hamster model of lung fibrosis: Inhibition of lysyl oxidase and collagenase.*J.Biochem Toxicol*, 10(4):203-210

BORDER, W. A. AND RUASLAHTI, E. (1992): Transforming Growth Factor-Beta in Disease :The Dark Side of Tissue Repair. *Journal of Clinical Investigation*, 29:385-91

BORDER, WA., NOBLO, NA(1994);Mechanisms of disease (TGF-β in Tissue fibrosis. *New England Journal of medicine*, 331;1286-1292

BOUCHER, E., GUYADER.D., JACQUELİNET, S., ANDRE, P.:(2000): Interferon and ursodeoxycholic acid combined therapy in chronic viral C hepatitis. Controlled randomized trial in 203 patients. *Dig Liver Dis*.32(1):29-33

BRENT, J. A., RUMACK, H.H. (1993): Role of Free Radicals in Toxic Hepatic Injury. *Clinical Toxicology*, 31 :139-171

CATHERİNE, J., WATERFİELD, JOHN, A. TURTAN, M. DAVİD C. SCALES AND JOHN A. TIMBRELL(1993) :Reduction of Liver Taurin in Rats by 3-alanin Treatment increases Carbon tetracholoride Toxicity.: *Toxicology*, 77:7-20

CZAJA, MJ., WEİNER, FR, FLANDERS, KC., GİAMBRONE. (1989) MA. Wind, R.In. Vitro and In vivo Association of Transforming Growth Factor-Beta 1 with Hepatic Fibrosis. *J. Cell Biol.*, 108(6):2477-2482

CHEN, Y., LI, S., ZHANG, X. (1999) : Taurin Inhibitis Deposition of Extracellular Matrix in Experimental Liver Fibrosis in Rats. : *Chung Hua Kan Tsang Ping Tsa Chih*., 7(3):165-7

CHEN, W., DAVİD, O.K., YOSHİHİSA, Y., SHUZO, O. (1999): Thiols and Polyamines in The Cytoprotective Effect of taurin on Carbon Tetracholoride Induced Hepatotoxicity. *J. Molecular Toxicology*, 13(2): 71-76

CHOJKİER M AND BRENNER D. A. (1988) : Therapeutic Strategies for Hepatic Fibrosis. *Hepatology*, :8(1):176-82

COCHRANE C.G. (1991):Celluler Injury By Oxidants. *The American Journal of Medicine*, 91 :23-30

DAS, D., PEMBERTON, P.W., BURROWS, P.C., GORDON, C., SMİTH, A. (2000): Antioxidant Properties of Colchicine in Acute Carbon Tetracholoride Induced Liver Injury and Its Role in The Resolution of Established Cirrhosis. *Biochem. Biophys. Acta*., 1502:351-362

DE BLESSER, P.J., XU, G., RAUBOTUS, K., ROGİERS, V., GEERTS, A. (1999):Glutathion Levels Discreminate between Oxidative Stress and Transforming Growth Factor Beta Signaling in Activated Rat Hepatic Stellate Cells. : *J. Biol. Chem*., 274:33881-33887

DEVAMANOHARAN PS, ALİ AH, VARMA SD, (1998).Oksidative stress to rat lens in vitro protection by taurine, *Free Radic Res* 1998 Sep; 29(3) :189-195

EPPLER, B., DAWSON, R.J. (2001): Dietary Taurin Manipulations in Aged Male Fischer Rat Tissue : Taurin concentration, Taurin Biosynthesis and Oxidative markers. *Biochem. Pharmacol*., 62:29-39

FORT, I, PILLETTE, C, VEAL, N., OBERT, F., GALLOIS, Y., DOUAY, O., ROSENBAUM, I., CALES, P. Effects of long term administration of interferon alpha in two models of liver fibrosis in rats. *J. Hepatol*, 29(2) :263-270

FRANKLIN, T.J. (1995): Current Approaches to The Therapy of Fibrotic Disease. *Biochem. Pharmacol.*, 49:267-73

FREIDMAN, S.L., ROLF, F.J., BOYLES, J. BİSSEL, D.M. (1985): Hepatic Lypocytes; The Principal Collagen-Producing Cells of Normal Rat Liver. Proc. *Natl. Acad. Sci.*, 82:8681-5

FRIEDMAN, S.L., ARTHUR, M.P. (1989): Activation of Cultured Rat Hepatic Lypocytes by Kupffer Cell Conditioned Medium. Direct Enhancement of Matrix Synthesis and Stimulation of Cell Proliferation Via Induction of PDGF Receptors. *J. Clin. Invest.*, 84:1780-5

FREIDMAN, SL. (1993): The cellular Basis of Hepatic Fibrosis Mechanism and Treatment Strategies NEJM,328;1828-35

FREIDMAN,SL. (2000)Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis,an Integrated Cellular Response to tissue Injury. *J. Biol Chem* 275:2247-2250

GIANLUCA SB., LETİZİA D, GİANNA F, ALESSANDRO C. (1998): Fibrojenic Effect of Oxidative stress on Rat Hepatic Stellate Cells. *Hepatology*, 27:720-26

GLASSER, V. (1996) : Gene Transfer To The Liver. *Molecular Medicine Today*, 2:47-51

GREENWEL, P., DOMİNGUEZ-ROSALES, J. A., MAVİ, G., RİVAS-ESTİLLA A.M., ROJKİND, M. (2000) : Hidrojen Peroxide ; A Link Between Acetaldehyde-Elicited Alpha 1 (I) Kollagen Gene Up-Regulation and Oxidative Stress in Mouse Hepatic Stellate Cells. *Hepatology*, 31 :109-116

GRESSNER, A.M. (1994): Perisinusoidal Lipocytes and Fibrogenesis. *Gut*, 35:1331-3

GRESSNER, A.M., HOFFMAN, C., LAHME, B., SHECKEL, L. (1995): Hepatocyte Injury Stimulates The Mitogenic Activation of Cultured Fat Storing Cells. *The Kupffer Cell Foundation*, 5:380-2

GRESSNER, A.M. AND SCHUPPAN, D. (1999) : Cellular and Molecular Pathobiology, Pharmacological Intervention and Biochemical Assesment of Liver Fibrosis .*Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. 607-627

GUERTIN, F., RAY, C.C., LEPAGE, G., PEREA, A. (1991):Effect of Taurine on Total Parenteral Nutrition-Associated Cholestasis. *J. Parenter. Enteral. Nutr.*, 15:247 51

GUERET,S., DESMOULIERE, A., CHOSSEGROS, P., COSTA, A.M., BADID, C., TREPO,C., GRIMAUD J. A, CHEVALLIER M. (1999): M. Long term administration of interferon alpha in non responder patients with chronic hepatitis c : follow – up liver fibrosis over 5 years. *Viral Hepat.*6(2):125-133

GURER H, OZGUNES H, SAYGIN E, ERCAL N. (2001). Antioksidanlar oxidant effect of taurine against lead induced oxidative stres. *Arch Environ Contam Toxicol* 41(4):397-402

HA H, Yu MR, Kım KH. Melatonin and Taurine reduce early glomerulpathy in diabetic rats(1999).*Free Radic Biol Med* 26(7-8):944-950

HANNE CB SNORRI S. THERGIRSSON. (1996): Hepatic Regeneration. *Clinical Laboratory Medicine*, 16:325-339

HARUSHİGE, N., PETER, N., RİTVA, P.E., CHU-CHİELS H., ELİZABETH, M. (1990): Transforming Growth Factor-β and Procollagen Type I, III and IV Transcripts in Carbon Tetracholoride-Induced Rat Liver Fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 85:1833-1843

HEATHCOTE, E.I., SHIFFMAN, M.L, LOOKSLEY, G.E. (2000): Peginterferon alfa 2a in patients with chronic hepatits C and cirrhosis .*N. Engl J.Med*,343:1673-1680

HIDEKAZU TK, MASAKI M, SANWEL W. FRENCH. (1990): Experimental Models of Hepatic Fibrosis ; A Review. *Seminars in Liver Disease*, 10 (1) :56-65

HIDEKAZU, T., WALTER, H., SEİİCHHİRO, K., ONNİ, N., SEPPO, P. (1995): Experimental Liver Cirrhosis Induced by Alcohol and Iron. *J. Clin. Invest.*, 96:620-630

HIROSHI OGAWA. (1996): Effect of Dietary Taurine on Lipid Metabolism in Normacholesterolemic and Hypercholesterolemic Stroke-Prone Spontaeously Hypertansive Rats. *Adv. Exp. Med. Biol., Taurine* 2:107-115

HIZOH I, HALLER C. (2002): Radiocontrast-induced renal tubular, cell apoptosis: hypertonic versus oxidative stres. *Invest radiol*, 37(8):428-434

HOLECEK, M., SKALSKA, H., MRAZ, J. (1999): Plasma Amino acid Levels After Liver Damage. A Dose-Response and Time-Response Study in Rats. *Amino Acids*, 16:1-11

INOUE, M. (1994): Protective Mechanisms Against Reactive Oxygen Species. *The Liver Biology and Pathobiology. Newyork Raven Press*,. :443-459

IREDALE.JP.,BENYON,RC.,PICKERING,J.,MCCULLEN,M.,NORTHROP ,M. ,PAWLEY,S.,HOVELL,C.,ARTHUR,MJ.(1998):Mechanisms of Spontaneous

Resolution of Rat Liver Fibrosis: Hepatic stellate Cell Apoptosis and Reduced Hepatic Expression of Metalloproteinase Inhibitors.*J Clin Invest.,* 102:538-549

IREDALE,JP(2001).Hepatic stellate Cell Behavior during resolution of Liver Injury.*Sem liver Disease*.,21(3):427-436,

IRVING, M.G., ROLL, F.J., HUANG, S., BİSSEL, D.M. (1984): Characterisation and Culture of Sinusoidal Endothelium From Normal Rat Liver Lipoprotein Uptake and collagen Phenotyp. *Gastroenterology*, 87:1233-47

ISHAK K. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J.hepatol*;22:696-699.

JACK O, ERİC N. G, GAİL L. C. M., DAVİD H. B. (1992): Urinary excretion of Taurine as a Function of Taurine İntake; Potential for Estimating Taurine Bioavailability in The Adult Cat. *Adv. Exp. Med. Biol., Taurine* 2:55-61

JACQUELYN, J.M., RİCHARD, C.M. (1990): Extracelilular Matrix Gene Expression Increases Preferentially in Rat Lipocytes and Sinusoidal Endothelial Cells During Hepatic Fibrosis In Vivo. *J. Clin. Invest.,* 86:1641-1648

JEONG SOON Y., KYUNG JA C. (1998): Taurine Protects The Liver Against Lipid Peroxidation and Membran Disintegration during Rat Hepatocarcinogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol., Taurine* 3 :105-112

JİA JD,BAVER M,REUHL M,MİLANİ S,BOİGK G,RİECKEN EO,SCHUPPAN D. (2001): Antifibrotic effct of sillymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen 1,TIMP-1 and TGF-β1 RNA, *J Hepatol* :128-630

JOHN, A T, CATHERİNE J. W. (1996) : Changes in Taurine As An Indicator of Hepatic Dysfunction and Biochemical Perturbations. *Adv. Exp. Med. Biol., Taurine* 2 :125-234,1996.

JUNICHI A, AKIHIKO S, NOBUTIISA A. (1992): Usefulness of Taurine in Chronic Congestive Heart Failure and Its Prospective Application. *Japanese Circulation Journal*, 56:95-99

KENNETH J. SİMPSON. (1999): Cytokines, For Better or Worse? *Europan Journal of Gastroenterology and Hepatology,* 1 1 :957-966

KERAİ, M.D., WATERFİELD, C.J., KENYON, S.H.,TİMBRELL, J. A. (1998): Taurine: Protective Properties Against Ethanol-Induced Hepatic Steatosis and Lipid Peroxidation During Chronic Ethanol Consumption in Rats. *Amino Acids*, 15:53-76

KNODELL RG (1981). Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*,1(5):431-5

KİM, K.Y., CHOİ, I., KİM, S.S. (2000):Progression of Hepatic Stellate Cell Activation in Associated with The Level of Oxidative Stress Rather Than Cytokines During CCl4-Induced Fibrogenesis. *Mol. Cells.*, 10:289-300

LAKE, D.F.,AKPORİAYE,E.T.HERS,EM(2001).:Immunopharmacology.*Basic and Clinical Pharmacology,(*Ed) Katzung, BG.8th. edition.Lange :970

LAMARRE, J., WOLLENBERG, G.K., GONİAS, S.L. AND HAYES, M. A. (1991): Biology of Disease Cytokine Binding and Clearance Properties of Proteinase-Activated Alpha2 Macroglobulins. *Laboratory Investigation.* 65:3-14

LANG F, MADLUNG I, SIMEN D, ELLORY,C, LEPPLE WIENHUES A, GULBINS E (2000) The involvement of caspases inde CD 95 but not swelling induced cellular taurine release from Jurkat T. Lymphocytes. *Pflugers Arch* 440(1):93-99

LEE, K.S., LEE, S.J., PARK, H.J., CHUNG, J.P., HAN, K.H. (2001): Oxidative Stress Efifect on The Activation of Hepatic Stellate Cells. *Yonsei. Med. J.*, 42(1):1-8

LİEBER, C.S. (1999): Prevention and Treatment of Liver Fibrosis Based on Pathogenesis. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 23:944-9

LİEBER, C.S. (1990): Mechanism of Ethanol Induced Hepatic Injury. *Pharmacol. Ther.*,46:1-41

LINDSEY,K., TREPO,C., HEINTGES,T. (2001): A randomised double blind trial comparing pegylated interferon alfa 2b to interferon alfa 2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology*, 34:395-403

MAHER, J.J., MCGUİRE, R.F. (1990): Extracellular Matrix Gene Expression Increases Preferentially in Rat Lipocytes and Sinusoidal Endothelial Cells During Hepatic Fibrosis In Vivo. *J. Clin. Invest.*, 86:1641-1648

MARCEL L, FLORIAN G, HENKE N, HORST B. (1997): Tumor Necrosis Factor-Induced Apoptosis During The Poisoning of Mice with Hepatotoxins. *Gastroenterology*, 1 12:923-934

MARRA, F., CHOUDHURY, G.G., PINZANI, M., ABBOUD, H.E. (1994): Regulation of Platelet Derived Growth Factor Secretion and Gene Expression in Human Liver Fat Storing Cells. *Gastroenterology*, 107:1 1 10-17

MARTIN, B., KARL-HEINZ, B., MARTİN, G., VOLKMAR, G. (1998): Selective İnhibition of Hepatic Kollagen Accumulation in Experimental Liver Fibrosis in Rats by A New Prolyl 4 Hydroxilase Inhibitor. *Hepatology,* 28: 404-411

MAS. MR., COMERT B., ONCU K., VURAL SA, AKAY C., TASCI, I, OZKOMUR E., SERDAR M, MAS N, ALCIGIR G, YENER N. (2004) The Effect of taurine treatment on oxidave stres in experimental liver fibrosis *Hepatology Research*.28:207-215

MASSAQUE, J. (1990): The Transforming Growth Factor Beta Family. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 6:597-641

MASSİMO, P., LORETO, G., GHALEB, M.S., AND HANNA, E. (1989): Effects of Platelet Derived Growth Factor and Other Poylpeptide Mitogens on DNA Sythesis and Growth of Cultured Rat Liver Fat-Storing Cells. *J. Clin. Invest.*, 84:1786 1793

MASSIMO, P., STEPHANO, M., CECILLA, G., FREDERİC, L. WEBER, J.R. (1994): Expression of Platelet-Derived Growth Factor in a Model Of Acute Liver Injury. *Hepatology,* 19: 701-707

MAX, G., DİETER, M., RALPH, M., KLAUS-MARTİN, S., AXEL, M.G. (1992): Activation of Rat Liver Perisinusoidal Lipocytes by Transforming Growth Factors Derived from Myofibroblastlike Cells. *J. Clin. Invest.*, 89:19-27

MCGEE, J.O., PATRİCK, R.S. (1982): The Role of Perisinusoidal Cells in Hepatic Fibrogenesis. An Electronmicroscopic Study of Acute Carbon Tetracholoride Liver Injury. *Lab. Invest.*, 26:429-440

MESSINA,SA., DAWSON. R.,(2000): Attenuation of oxidative damage to DNA by taurine and taurine analogs. *Adv Exp Med Biol* 483: 355-367

MiCHAEL J. P. A., SCOTT L. F. JOSEPH R(1989).:Lipocytes from Normal Rat Liver Release a Neutral Metalloproteinase that Degrades Basement Membrane (TypeIV) Collagen. *J. Clin. Invest.*, 84:1076-1085

MiWON, S., HEE KEE, K., WON BAE, K., JUNNICK, Y. (1996): Protective Effect of Taurine on Indomethacın-Induced Gastric Mucosal Injury. *Adv. Exp. Med. Biol., Taurine* 2:147-155

MOORE, K. L.Dalley AF. (1999): *Clinically oriented anatomy* (Fourth edition). 263-274.

MONTGOMERY, B., SHAO-SHEAN, W., WILLIAM, R.J., JOSEPH ROLL, F. (1995): Cell-Specific Expression of Transforming Growth Factor- β in Rat Liver. *J. Clin. Invest.*, 96:447 455

MORENO, M.G., MURIEL.P. (1995): Remission of liver fibrosis by interferon-alpha2b. *Biochem Pha*rmachol.,8:50(4): 515-520

MOSLEN, M.T. (1994): Reactive Oxygen Species in Normal Physiology, Cell Injury and Phagocytosis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 366:17-21

MUREL, G.A., FRANCİS, M.J.O., BROMLEY, L. (1990): Modulation of Fibroblast Proliferation by Oxygen Free Radicals. *Biochem. J.*, 265:659-665

MURIEL, P.CASTRO,V. (1997): Dose Response studies of interferon- alpha 2b on liver fibrosis and cholestasis inuced by biliary obstruction in rats. *Pharmacology,* 54(4):179-185

MURPHY, F.R., ISSA, R., ZHOU, X., RATNARAJAH, S., NAGASE, N., ARTHUR, M.J.P., BENYON,C., IREDALE J.P. (2002): Inhibition of Apoptosis of Activated Hepatic stellate Cells by Tissue Inhibitör of Metalloproteinase-1 ıs mediated via Effects on Matrix Metalloproteinase Inhibition, *The Journal of Biologicial Chemistry,*277:11069-11076

NAKASHİMA, T., TANİKO, T., KURİYAMA, K. (1982):Therapeutic Effect of Taurine Administration on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Injury. *Jpn. J. Pharmacol.*, 32:583-589

NAKASHİMA, T., TAKİNO, T., KURİYAMA, K. (1983): Pretreatment with Taurine Facilitates Hepatic Lipid Peroxide Formation Associated with Carbon Tetrachloride Intoxication. *Jpn. J. Pharmacol.*, 33:515-523

NAKASHİMA, T., SHİMA, T., MİTSUYOSHİ, H., INABA, K. (1996) : Taurine in The Liver. The Function of Taurine Conjugated with Bile Acids. *Adv. Exp. Med. Biol. Taurine* 2:80-84

NAKASHİMA, T., SHİMA, T., MİTSİYOSHİ, H., INABA, K., MATSUMOTO, N., SAKUMOTO, Y. (1996):Taurine in The Liver. *Adv. Exp. Med. Biol., Taurine* 2:85-91

OBROSOVA IG, FATHALLAH L, STEVENS MI. (2001): taurine counteracts oxidative stres and nerve growth factor deficit in early experimental diabetic neuropathy. *Exp. Nevrol*:172(1):211-219

OKAZAKİ, I., WATANABE, T., HOZAVA, S.,ARAi, M., MARUYAMA, K. (2000): Molecular Mechanism of The Reversibilty of Hepatic Fibrosis: with Special Reference to The Role of Matrix Metalloproteinases. *J. Gastroenterol. Hepa*tol., 15 Suppl:26-32

PIETRANGELO, AL(1996): Metals, Oxidative Stres and Hepatic Fibrogenesis. *Seminars in Liver Diease*,16(1):13-30

POLI, G. (2000) : Pathogenesis of Liver Fibrosis: Role of Oxidative Stress. *Mol. Aspects. Med.*, 21 (3):49-98

PINES, VLODAVSKY I,NAGLER A. (2000):Halofuginone from veterinary use to human therapy.*Drug Devel Res.*;50:371-8.

PINZANI, M.,GESVALDA, L., SABBAH, GM.,ABBOUD,HE. (1989): Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat storing cells.*Journal of Clinical Investigetion*, 84 :1786, 1793

POMPELLA, A., MOELLARA, E., CASSİNİ, A.F., FERROLİ, M., CİCCOLİ, L. (1987): Measurement of Lipid Peroxidation In Vivo: A Comparasion of Different Procedures. *Lipids,* 22:206 21 1

SCHAFFNER, F., POPPER, H. (1963): Capillarization of Hepatic Sinusoids in Man. *Gastroenterology*, 44:239-42

SCHAFER, S., GRESSNER, A.M. (1987): The Sythesis of Proteoglycans in Fat Storing Cells of Rat Liver. *Hepatology*, 7:680-687

SCHULLER-LEVİS G.,QUİNN, M. R., W RİGHT, C., PARK, E. (1994): Taurine Protects Against Oxidant-Induced Lung Injury: Possible Mechanism(s) of Action. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 359:31-39

SCHUPPAN.D. (1990):Structure of The Extracellular Matrix in Normal and Fibrotic Liver. *Seminars in Liver Disease*, 10:1-10

SCHUPPAN, D. STROBEL, D.,HAHN,E.G. (1998),:Hepatic Fibrozis. Therapeutic Strategies.*Digestion* 59; 385-390

SIES, H. (1991): Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. *The American Journal of Medicine*, 91 (3c):31-38

SIES, H., DE GROOT, H. (1992): Role of Reactive Oxygen Species in Cell Toxicity. *Toxicology*, 65:547-551

SHIMIZU I.,MA YR,MIZABUCHI Y, Liu F. (1999) Effects of sho-saiko.to a Japanase herbal medicine, on hepatic fibrozis in rats. *Hepatology:* 29: 282-4

SIEGERS, C.P., RIEMAN, D., THIES, E., YOUNES, M. (1988): Glutathione and GSH Dependent Enzymes in The Gastrointestinal Mucosa of The Rat. *Cancer Letters*, 40:71-76

SOUZA, MM. PARANA, R., TREPO, C., BARBOSA,AA. OLIVERIA, I., ANDRADE, ZA. (2001) : Effect of interferon-alpha on experimental septal fibrosis of the liver-study with a new model. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 96(3):343-348

SUGIYAMA, M. (1994): Role of Cellular Antioxidants in Metal Induced Damage. *Cell Biology and Toxicology*, 10:1-22

SVEGLIATI BG,D'AMBROSIO L., FERRETTI G., CASINI A. Di SARIO A, SALZANO R. (1998) Fibrogenic effect of oxidative stres on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* Mar;27(3) 720-726

TASCI I, MAS MR, VURAL SA, MAS N, SERDAR M, COMERT B, ALCIGIR G, KOCARI H. (2003):Liver Fibrosis regresse beter with peginterferon alpha and ursodeoxycholic acid treatment than spontaneous recovery. *J.Hepatol* Sup 75,38(2):9

THOMAS, M., TETSUYA, Y. HİLTRUD, K., PETER, W.,DİETRİCH, M. WOLF, I. (1996): Taurine Reduces Experimental Liver Injury After Cold Ischemic Preservation and A Period of Rewarming Prior to Reperfusion. *Adv. Exp. Med. Biol., Taurine* 2:157-161

TIMOTHY, C., BİRDSALL, N.E. (1998): Therapeutic Application of Taurine. *Alt. Med. Rev.*, 3(2):128-136

TIMBRELL JA, WATERFIELD CJ. (1996): Changes in taurine as an indicator of hepatic dysfunction and biochemical perturbations. Studies in vivo and in vitro. *Adv Exp Med Biol* 403;125-134

TSUKAMOTA, H., RIPPE, R., NIEMELA, O., LİN, M. (1995): Role of Oxidative Stress in Activation of Kupffer and Ito Cells in Liver Fibrogenesis. *J. Gastroenterol. Hepatol.,* suppl(1).:50-53

VALERİE, P., DELPHİNE, D., MİCHEL, V., ANNE-CHARLETTE DE, G., STEPHANE, H.,VİNCENT, N. (1999): Expression of Connective Tissue Growth Factor in Experimental Rat and Human Liver Fibrosis. *Hepatology,* 30:968-976

VOHRA B P, HUI X (2001): Taurine protects against carbon tetrachloride toxicity in the cultured neurons and in vivo. *Arch Phsiol Biochem*:109(1):90-94

VOM DAHL,S., BODE, J.G.,REINEHR, R.M.,MONNIG HOFT,I.,KUBITZ,R, HAUSSINGER D. (1999):Release of Osmolytes from Perfused Rat Liver on Perivascular Nerve Stimulation,Alpha adrenergik Control of OsmolyteEfflux from parenchymal And Non parenchymal Liver Cells. *Hepatology* 29(1):195-204

WANG JH, REDMOND HP, WATSON RW, CONDRON C, BOUCHER-HAYES D. (1996): The benefical effect of taurine on the prevention of human endotelial cell death. *Shock* 6(5):331-338

WATANABE,T.,NIOKA,M.,HOZAWA,S.,SUGIOKA, Y. (2000): Stem Cells Expressing matrix metalloproteinase-13 mRNA .*Matrix and the liver*. 361-388

WATERFIELD CI, TURTON JA, SCALES MD, TIMBRELL JA. (1993).: Reduction of liver taurine in rats by beta-alanine treatment increases carbon tetrochloride toxicity.*Toxicology*;77:7-20

WEINER, F.R., GIAMBRANE, M.A., CZAJA, M.S., et al. (1990): Ito-Cell Gene Expression and Collagen Regulation. Hepatology, 11 :111-117

WENG,H.L. CAI,W.M, LIU, R.H(2001): Animal experiment and clinical study of effect of gamma interferon on hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol*, 7(1): 42-48

WATSON RW, REDMOND HP, WANG IH, BOUCIHER HD(1996): Mechanisms involvedl in sodium arsenite induced apoptosis of human neutrophils. J Leukoc Biol, 60(5):625-632

WHALEN, R., ROCKEY, D.C., FRİEDMAN, S.C., BOYER, T.D. (1999): Activation of Rat Hepatic Stellate Cells Leads to Loss of Glutathion S-Transferases and Their Enzymatic Activity Against Products of Oxidative Stress. *Hepatology*, 30:927-933

WU, C., MİYAGAWA, C., KENNEDY, D.O., YANO, Y. (1997): Involvement of Polyamines in The Protection of Taurine Against The Cytotoxicity of Hydrazine or Carbon Tetrachloride in Isolated Rat Hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.*, 103(3):213-224

WU, J., DANİELSON, A. : Inhibition of Hepatic Fibrogenesis. (1994): A Review of Pharmacologic Candidates. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 29:385 391

WU QD, WANG JH, FENNESSY F, REDMOND H P, BOUCHIER-HAYES D. (1999): Taurine prevents high-glucose induced human vascular endothelial cell apoptosis. *Am J Physiol* 277 (6):1229-1238

YASUNOBO, M., KUNIO, M., AKİRA, Y., TAKAFUMİ, I. (1997): Preventive and Therapeutic Effects in Rats of Hepatocyte Growth Factor Infusion on Liver Fibrosis/Cirrhosis. *Hepatology*, 26:81-89

ÖZGEÇMİŞ

1964 yılında Denizli'nin Tavas ilçesinde doğdum.İlköğrenimimi 1975 yılında İzmir Ankara İlkokulunda tamamladım.Orta öğrenimimi 1978 yılında İzmir Karşıyaka Ortaokulu'nda ve Lise öğrenimimi ise 1981 yılında İzmir Atatürk Lisesi'nde başarı ile tamamladım. Aynı yıl Gülhane Askeri Tıp Akademisi'ni kazandım ve 1987 yılında mezun oldum. 1988 yılına kadar aynı üniversitede stajyerlik eğitimimi tamamladıktan sonra,1988-1990 yılları arasında Çorlu 61.Topçu Alay'ında Kıta Baştabipi olarak görev yaptım.

1990 yılında ilk tercihim olarak GATA İç Hastalıkları Bilim Dalı uzmanlık öğrenciliğini kazandım.1994 yılında Kayseri Askeri Hastanesi'ne İç Hastalıkları uzmanı olarak atandım.1995 yılında GATA İç Hastalıkları Bilim Dalı'nda yardımcı doçentlik görevime başladım.1996 yılında GATA Komutanlığı tarafından Geriatri Bilim Dalı'nda görevlendirildim. Halen bu görevimi de sürdürmekteyim. 1999 yılında İngiltere'de, "London Universty, St.George Hospital Gastroenterology&Hepatology Department"da hepatoloji eğitimi aldım.

2002 yılında Almanya'da "RWTH Universitatklinikum İnstitut für Klinische Chemie und Pathobiochemie" ünitesinde Prof.Dr. Gresner'in yanında "karaciğer stellat hücre kültürü" teknikleri alanında eğitim aldım.

Tüm bu yıllar içinde birçok yurtiçi ve yurtdışı bilimsel kongre ve sempozyumda katılımcı ve konuşmacı olarak görev yaptım. Halen Türk Geriatri Vakfı Üyeliği, Türk Gastroenteroloji Derneği ve Ankara Amerikan Hepatoloji Derneği üyeliğinde aktif görev yapmaktayım.Ayrıca Amerikan Pankreas Dergisi'nde bilimsel hakemlik, Türk Gastroenterohepatoloji Dergisi'nde bilimsel kurul ve Turkish Journal of Gastroenterology dergisinde bilimsel hakemlik görevini yürütmekteyim.

2001 yılında Sağlık bilimlerine bağlı Hepatoloji Enstitüsünde Temel Hepatoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladım.

Evliyim. Bir çocuk babasıyım. Eşim, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi A.B.D'da görev yapmaktadır.