



**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DENEYSEL KARACİĞER SİROZUNDA “CAFFEIC
ACID PHENETHYL ESTER” (CAPE)’İN ETKİLERİ**

YANDAL UZMANLIK TEZİ

**Dr. Murat Taner Gülşen
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI**

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr.Mehmet Koruk

Dr. MURAT TANER GÜLŞEN

KASIM-2007

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**DENEYSEL KARACİĞER SİROZUNDA “CAFFEIC
ACID PHENETHYL ESTER” (CAPE)’İN ETKİLERİ**

YANDAL UZMANLIK TEZİ

Dr. Murat Taner Gülşen

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI**

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr.Mehmet Koruk

ÖNSÖZ

Tüm meslek hayatım boyunca “rahat zahmette zahmet rahattadır” prensibini kendime düstur edinerek çalıştım. Türk bayrağının dalgalandığı her karış toprağı sıla bilerek Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde yapmış olduğum hizmetin verdiği manevi hazzın yanı sıra, iç hastalıkları ihtisasına başladığım günden beri olmasını hep arzu ettiğim Gastroenteroloji yan dalını memleketim olan Gaziantep'te yapıp bu gün bitirmiş olmakla misilsiz bir mutluluğa erişmiş bulunuyorum. Bu ihtisas şansını bana veren ve ihtisas süresince bilgilerini ve tecrübelerini benden esirgemeyen tüm hocalarıma şükran borçluyum.

Bu tezin planlanma aşamasından son haline gelinceye dek her kademede desteğini hemen yanı başımda bulduğum tez hocam sayın Doç. Dr. Mehmet Koruk başta olmak üzere, fikirleriyle ufkumu açan sayın Prof. Dr. Abdurrahman Kadayıfçı'ya, bilimsel desteği nedeniyle sayın Doç. Dr. Cemil Savaş'a, hayvan deneylerindeki tecrübesini benim için cömertçe sarf eden sayın Prof. Dr. Cahit Bağcı ve sayın Yard. Doç. Dr. Serdar Gergerlioğlu'na, tezin mikroskopik çalışma kısmını tereyağından kıl çekercesine basitleştiren sayın Prof. Dr. İbrahim Sarı ve asistanı Emrah Koçer'e, biyokimya için alınan örnekleri büyük bir titizlikle çalışan sayın Prof. Dr. Mehmet Tarakçıoğlu ve gayret ve enerjisiyle göz kamaştıran yüksek lisans öğrencisi Ayşe Karafak'a ve en son olarak da iç hastalıkları kliniğindeki samimi havayı ustaca estirmeyi daima bilen ve böylece rahat bir çalışma ortamı temin eden anabilim dalı başkanı sayın Prof. Dr. Yalçın Kepekçi'ye minnet ve şükranlarımı arz ediyorum. Tezin materyal toplama döneminde heyecanımı paylaşan ve maddi-manevi desteğini gördüğüm tüm endoskopi çalışanlarına da teşekkür ederim.

Dr. Murat Taner Gülşen

Gaziantep 2007

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖN SÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
KISALTMALAR	VII
TABLolar LİSTESİ	VIII
ŞEKİL VE GRAFİK LİSTESİ	IX
RESİM LİSTESİ	X
1. GİRİŞ	1
1.1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. KARACİĞER FİBROZİSİ VE PATOGENEZİ	4
2.1.1 Normal ve Fibrotik Karaciğerde Ekstraselüler Matriks Bileşimi	4
2.1.1.1 Matriks metalloproteinazları (MMPs)	6
2.1.2 Ekstraselüler Matriksin Biyolojik Aktivitesi	7
2.1.2.1 İntegrinler	7
2.1.2.2 Diğer Adezyon Proteinleri ve Hücre Matriks Reseptörleri	7
2.1.2.3 Soluble Growth Faktörler (Sitokinler)	8
2.1.3 Ekstraselüler Matriksi Hangi Hücreler Yapar?	8
2.1.4 Ekstraselüler Matriksin Degradasyonu	12
2.1.4.1 Patolojik Matriks Degradasyonu	13
2.1.5 Stellate Hücre Aktivasyonu ve Hepatik Fibrozisteki Belli Başlı Olaylar	14
2.1.5.1 Başlama	15
2.1.5.2 Süreklilik	17
2.1.5.2.1 Proliferasyon	17
2.1.5.2.2 Kemotaksis	17

2.1.5.2.3 Fibrojenesis	18
2.1.5.2.4 Kontraksiyon	18
2.1.5.2.5 Matriks Degradasyon	19
2.1.5.2.6 Retinoid Kaybı	19
2.1.5.2.7 Lökosit Kemoatraktanı ve Sitokin Salıverilmesi	20
2.1.6 Fibrozisin Süresi	20
2.1.7 Fibrozisin Geri Dönüşümü	21
2.1.8 Fibrozisin Değerlendirilmesi	22
2.1.9 Fibrozisin Tedavisi	24
2.1.9.1 İmmünomedülatör Bileşikler	24
2.1.9.1.1 Kortikosteroidler	24
2.1.9.1.2 Kolşisin	25
2.1.9.1.3 İnterferon alfa	25
2.1.9.1.4 Diğer immünmodülatör sitokinler	25
2.1.9.2 Stellate Hücre Aktivasyonunu İnhibe Edenler	25
2.1.9.2.1 TGF β inhibisyonu	25
2.1.9.2.2 Endotelin aktivitesinin inhibisyonu	26
2.1.9.2.3 Pentoksifilin	26
2.1.9.2.4 Halofuginon	26
2.1.9.2.5 Fumagillin ve analogu TNP-470	26
2.1.9.2.6 Angiotensin converting enzyme inhibitörleri (ACE)	26
2.1.9.3 Antioksidantlar ve Sitoprotektif Ajanlar	27
2.1.9.3.1 Vitamin-E	27
2.1.9.3.2 Silymarin	27
2.1.9.3.3 Polyenoylphosphatidylcholine (PPC)	27
2.1.9.3.4 “Sho-saiko-to”	27
2.1.9.3.5 Ursodeoxycholic acid (UDCA)	28
2.1.9.3.6 Prostaglandinler (PG)	28
2.1.9.3.7 Malotilate	28
2.1.9.4 Kollajen Sentezinin ve Degradasyonunun Modulatorleri	28
2.1.9.4.1 Prolilhidroksilaz İnhibitörleri (HOE 077)	28
2.1.9.4.2 Safironil	29
2.1.9.5 Diğerleri	29

2.1.9.5.1 Hepatocyte growth factor (HGF)	29
2.1.9.5.2 Trichostatin A	29
2.1.9.5.3 Octreotid	30
2.1.9.5.4 Hücre hedefli antifibrotik ajanlar	30
2.1.9.5.5 Flavonoidler	30
2.1.9.5.5.1 Propolis ve Cape	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	38
3.1. Gereç ve Yöntem	38
3.1.1 Eksperimental düzenleme (Çalışma Tasarımı)	38
3.1.2 Hayvanlar ve Bakımı	39
3.1.3 Biyokimyasal Ölçümler	39
3.1.4 Karaciğerin Histopatolojik Değerlendirmesi	39
3.1.5 İstatistiksel analiz	40
4. BULGULAR	41
4.1 Bulgular	41
4.1.1 Fibrozis	44
4.1.2 Biyokimyasal değerler	47
4.1.3 Total Protein	47
4.1.4 Albumin	47
4.1.5 Bilirubin	47
4.1.6 Alanine Aminotransferase	48
4.1.7 Alkalen Fosfataz	48
4.1.8 Hemogloblin	49
4.1.9 Gruplar Arasında İstatistiksel Olarak Fark Görülme Biyokimyasal Değerler	49
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
7. KAYNAKLAR	62

ÖZET

DENEYSEL KARACİĞER SİROZUNDA “CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER” (CAPE)’İN ETKİLERİ

Dr. Murat Taner Gülşen
Yandal Uzmanlık Tezi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Gastroenteroloji Bilim Dalı
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Mehmet Koruk
Kasım 2007, 84 sayfa

Bal arısının doğal bir ürünü olan CAPE (Caffeic Acid Phenetyl Ester)’nin antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antioksidan ve antitümöral etkiler gibi çeşitli biyolojik aktiviteler gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmamızda CAPE’in dimethylnitrosamine (DMN) ile sıçanlarda oluşturulmuş karaciğer fibrozisindeki etkilerini araştırmayı amaçladık.

Bu çalışmamızda ortalama ağırlıkları 250-300 g arasında olan 60 adet Wistar-Albino erkek sıçan kullanıldı ve her grupta 10 tane sıçan olmak üzere toplam 6 gruba ayrıldı.

Grup 1; Kontrol grubu. İntraperitoneal (ip) serum fizyolojik injekte edildi

Grup 2; CAPE 10 µmol/kg/ip .

Grup 3; Dimetilnitrozamin (DMN) %1’lik 10 mg/kg ip

Grup 4; Önce CAPE 10 µmol/kg/ip sonra DMN %1’lik 10 mg/kg ip

Grup 5; Eş zamanlı olarak CAPE 10 µmol/kg/ip ve DMN %1’lik 10 mg/kg/ip

Grup 6; Önce DMN %1’lik 10 mg/kg ip sonra CAPE 10 µmol/kg/ip

Çalışma sonunda hayvanlar sakrifiye edilip kanları alındı ve serumlarında biyokimyasal tetkikler yapıldı. Karaciğer dokusu çıkartılarak patolojide “modifiye nodell sınıflaması”na göre 6 puan üzerinden ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Çalışmayı 53 sıçan tamamladı. Grup 1 ve grup 2’deki sıçanların karaciğerleri histolojik olarak normaldi. Buna karşılık grup 3’teki sıçan karaciğerlerinde belirgin fibrozis görüldü (P=0,0001). Grup 3 (5,62 ± 0,51) ile grup 5 (5,22 ± 0,83)’teki sıçan karaciğerleri arasında fibrozis yönünden istatistiksel bir anlamlılık bulunamadı (P>0,05). Grup 3’e göre grup 4 (2,90 ± 0,31) ve grup 6 (3,28 ± 0,75) arasında fibrozis açısından anlamlı fark bulunurken (P=0,0001), kendi aralarında fibrozis açısından fark saptanmadı (P>0,05).

Sonuç olarak DMN belirgin fibrozis oluşturan hepatotoksik bir ajandır. CAPE, fibrozisi önleyen ve oluşmuş fibrozisi gerileten doğal bir üründür. Bu çalışmayla, CAPE’in insanlarda da benzer mekanizmalarla siroz tedavisinde kullanılabileceği ümidi doğmaktadır

Anahtar Kelimeler: Karaciğer, Fibrozis, Siroz, Propolis, CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester),

ABSTRACT

Dr. Murat Taner Gülşen

Residency Thesis, Department of Internal Medicine

Division of Gastroenterology

Coordinator: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Koruk

November 2007, 84 pages

EFFECTS OF CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER IN EXPERIMENTAL LIVER FIBROSIS

Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), a natural honeybee product, exhibits a spectrum of biological activities including anti-microbial, anti-inflammatory, antioxidant and anti-tumoral effects. In this study, we investigated the effect of CAPE in dimethylnitrosamine (DMN)-induced liver fibrosis..

Adult male Wistar-albino rats (250-300 g) were assigned into six groups randomly (n =10 for each group).

Group 1: Control rats were injected 1 ml saline intraperitoneally (IP).

Group 2 (n=10) were injected 10 µmol/kg CAPE IP

Group 3 (n=10) were injected %1 DMN (10 mg/kg) IP

Group 4 (n=10) were injected 10 µmol/kg CAPE IP, and then %1 DMN (10 mg/kg).

Group 5 (n=10) were injected simultaneously 10 µmol/kg CAPE and %1 DMN (10 mg/kg).

Group 6 (n=10) were injected %1 DMN (10 mg/kg) IP, and then 10 µmol/kg CAPE.

Animals were sacrificed at the end of the experiment, and liver histopathology was evaluated by modified knodell classification (6 point).

Fifty three rats completed the study. Rat livers in Group 1 and 2 showed normal histological appearance, whereas rat livers treated with DMN showed fibrosis (P=0,0001). There were no statistically significant difference in fibrosis between group 3 (5,62 ± 0,51) and 5 (5,22 ± 0,83) (P>0,05). Fibrosis was decreased in group 4 (2,90 ± 0.31) and 6 (3,28 ± 0,75) compared to group 3 (P=0,0001) while there was no significant difference in fibrosis between these groups (P>0,05).

The results of our study indicate that DMN is a hepatotoxic drug, leading to prominent fibrosis, and CAPE prevents and degrades DMN-induced liver damage in rats. The results are promising and the molecule may also be effective in humans.

Key Words: Liver, Fibrosis, Cirrhosis, Propolis, CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester),

KISALTMALAR

CAPE	Caffeic Acid Phenethyl Ester
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CYP	Cytochrome
DDR2	Discoidin Domain Receptor 2
DMN	Dimethylnitrosamine
DB	Direkt Bilirubin
ESM	Ekstraselüler Matriks
ETA - ETB	Endotelin reseptörleri (Endotelin-A, Endotelin-B)
EGF	Epidermal Growth Factor
GSH	Glutathione
HSH	Hepatik Stellate Hücreleri
HGF	Hepatocyte Growth Factor
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecules -1
IκB-alfa	Inhibits NF-kappaB
KC	Karaciğer
MMPs	Metalloproteinases
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein
NCAM-1	Neural Cell Adhesion Molecules
NF- κB	Nuclear Factor-kappaB
pNIIIp	N-terminal propeptide of type III procollagen
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
TNFα	Tumor Necrosis Factor Alpha
TB	Total Bilirubin
TP	Total Protein
TGFβ1	Transforming Growth Factor Beta 1
TIMPs	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
uPA	Uroplasminogen Activator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1

TABLO LİSTESİ

		Sayfa no
Tablo 1	Normal Karaciğer ile Fibrozis olan karaciğer dokusu arasında ekstraselüler matrikste gözlenen farklılıklar	9
Tablo 2	Sakin ve aktive stellate hücredeki değişiklikler	16
Tablo 3	Modifiye Edilmiş Knodell Skorlaması	40
Tablo 4	Gruplar arasındaki fibrozis ortalamaları	45
Tablo 5	Tüm grupların biyokimyasal değerlerin ortalamaları	50
Tablo 6	Tüm grupların biyokimyasal değerlerinin karşılaştırmaları	51

ŞEKİL VE GRAFİK LİSTESİ

		Sayfa no
Şekil 1	Disse mesafesinde bulunan Stellate Hücre	10
Şekil 2	Karaciğerde inflamasyon, nekroz ve fibrozis oluşumu	21
Şekil 3	CAPE'nin kimyasal formülü	32
Şekil 4	Stellate Hücrenin NF-kB tarafından aktive edilişi	34
Şekil 5	CAPE NF-kB'yı inhibe eder	35
Grafik 1	Gruplar arasındaki fibrozis ortalamaları	46

RESİM LİSTESİ

		Sayfa no
Resim 1	Serum Fizyolojik sonrası Karaciğer	41
Resim 2	DMN ile oluşturulmuş sirotik karaciğer	42
Resim 3	Önce CAPE ardından DMN uygulanan karaciğer	43
Resim 4	CAPE ve DMN birlikte uygulanan karaciğer	43
Resim 5	Önce DMN ardından CAPE uygulanan karaciğer	44

DENEYSEL KARACİĞER SİROZUNDA “CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER” (CAPE)’İN ETKİLERİ

GİRİŞ

1.1 GİRİŞ VE AMAÇ:

Fibrozis, vücuttaki diğer yara iyileşmelerinde olduğu gibi skar ve ekstraselüler matriks (ESM) dokuyla sınırlanan bir çeşit yara iyileşmesi reaksiyonudur. Kronik karaciğer (KC) hasarı olan her hastada farklı oranlarda gelişmekte olup lokalize veya diffüz olabilmektedir (1).

Fibrozis gelişimi genellikle aylar-yıllar süren bir sürecin sonucudur, ancak bilinmeyen nedenlerle veno-okluziv hastalık ve mekanik biliyer obstrüksiyon hızla fibroze ilerlemektedir. Bunun aksine, fulminant hepatit gibi kendi kendini sınırlayan karaciğer hasarlarında şiddetli fibrojenik stimulus olmasına rağmen skar dokusu gelişmemektedir, bunun nedeni ise tam olarak bilinmemektedir.

Sebepler ne olursa olsun karaciğerde oluşan skar dokusu yapısal olarak birbirine benzer. Fibrozis en erken, hasarın en çok olduğu karaciğer bölgesinde oluşur. Örneğin perisentral hasar alkolik hepatit için karakteristik bir bulgudur. Sklerozan hiyalin nekrozis veya perivenüler fibrozis de denilen perisentral fibrozisin gelişimi muhtemel bir panlobular siroza ilerlemenin erken bir göstergesidir (2).

Günümüzde artık anlaşılmıştır ki, ESM kompleksleri biyolojik aktiviteye sahiptir ve fibrozis (veya siroz) sadece lobuler çatıyı etkileyen bir oluşum değil temel olarak polarite ve proliferasyon özelliklerini değiştirerek tüm karaciğer hücrelerinin

fonksiyonlarını da etkilemektedir. Bu nedenle karaciğerdeki total kollajen konsantrasyonundaki değişikliklerden ziyade ESM'in bileşimi ve lobulde nerede biriktiği daha fazla önem arz etmektedir.

İlerleyici fibrozis siroza yol açarken başlangıç dönemindeki fibrozisin reversibl olduğu iddia edilmiştir. Ancak fibrozisin hangi döneminde reversibl hangi döneminde irreversibl olduğu konusu henüz tam olarak açıklık kazanmamıştır. Bununla birlikte son zamanlarda erken dönem sirozun da reversibl olabileceği yönünde ciddi deliller bulunmaktadır (3).

Fibrozisin patofizyolojisi ile ilgili bilgiler arttıkça sirozun tedavi edilebilir bir hastalık olabileceği fikri kuvvet kazanmıştır. Bu yönde yapılmış birçok farmakolojik çalışmanın yanı sıra doğal ürünlerle yapılan tedavi yöntemleri de son yıllarda daha çok gündeme gelmiş tedavi metodları arasındadır.

Bal arısının yapmış olduğu propolis adlı maddenin aktif komponenti olan Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)'in, antioksidan, antiinflamatuvar, antimitojenik, antikarsinojenik ve immunomodulator özellikleri olduğu yönünde bir çok çalışma yapılmıştır (4-7). Bu farklı özelliklerin moleküler temeli tam olarak bilinmese de CAPE, tümör nekroz faktör (TNF)'ün yanı sıra phorbol ester, ceramide, hydrogen peroxide ve okadaic acid gibi diğer inflamatuvar ajanların indüklediği NF- κ B aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (5). Ayrıca CAPE'in hem lipooksijenaz aktivitesini inhibe ettiği hem de lipid peroksidasyonunu suprese ettiği gösterilmiştir (6,7). Lipid peroksidasyonu ise deneysel karaciğer modellerinde karaciğer hasarının patogenezinde en önemli mekanizma olarak vurgulanmaktadır (8).

Çeşitli hepatotoksik ajanlarla deneysel olarak oluşturulmuş karaciğer fibrozisine, CAPE'in olumlu etkisine dair deliller mevcuttur (9). Literatürde CAPE'in çeşitli etkilerini ortaya koyan birçok deneysel çalışma yapılmasına rağmen CAPE'in indüklenmiş hepatotoksisitedeki koruyucu etkisine dair pek az çalışma mevcuttur, fibrozisi geri döndürdüğüne dair de herhangi bir çalışma yoktur (10-12). Bu çalışmamızda dimetilnitrozamin (DMN) kullanılarak oluşturulmuş karaciğer sirozunda CAPE'in antifibrotik etkilerini araştırmayı amaçladık.

PRİMER OBJEKTİF: CAPE'in deneysel KC fibrozisindeki antifibrotik etkisini araştırmak.

SEKONDER OBJEKTİF: CAPE'in deneysel KC fibrozisindeki biyokimyasal parametrelere olan etkisini araştırmak.

GENEL BİLGİLER

2.1. KARACİĞER FİBROZİSİ VE PATOGENEZİ

2.1.1 Normal ve Fibrotik Karaciğerde Ekstraselüler Matriks Bileşimi

Yapısal olarak KC diğer dokulardan farklı bir lobuler çatıya sahiptir. Epitel, vasküler aralıktan konnektif bir doku stromasıyla ayrılmıştır ve bu mesafeye Disse aralığı (perisinusoidal space) denir. KC'deki stroma Disse aralığında bulunan ekstraselüler matriks (ESM)'ten oluşmaktadır. Ekstraselüler matriks (ESM) normal ve fibrotik karaciğerin iskeletini oluşturan bir grup makromoleküllerden oluşur. Bunlar, kollojenler, kollojen olmayan glikoproteinler, matrikse bağlı büyüme faktörleri (growth faktörler), glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar ve matriselüler proteinlerden oluşur. Bu aile gün geçtikçe yeni üyeler kazanmakta ve görevleri daha iyi anlaşılmaktadır (13).

ESM yaşla birlikte artar ancak asla histolojik fibrozis düzeyine ulaşmaz. Yaşlılardaki rejenerasyon kabiliyetinin gençlere göre kısmen düşük olmasının sebebi de yine subendotelial matriksteki hafif değişimlerdir (14).

Bunun yanı sıra intersitisiyel veya fibriller ESM de normal KC de bulunmaktadır fakat dağılımı bazal membran komponentlerinin olduğu gibi perisinüzoidal değil portal mesafede ve hatta nadiren de olsa lobuller arası çapraz bantlar şeklinde olabilmektedir. Lobular fibriller portal stroma ve sinüzoidal dallanma noktalarında bulunurlar. Bunların KC'in yapısal bütünlüğüne katkıda bulunduğuna inanılmaktadır.

Matriks moleküllerinin karaciğere bir iskelet çatısı oluşturmanın yanı sıra yeni görevlerinin de olduğu bugün için anlaşılmıştır. Örneğin bazıları ekstraselüler uyarıların "*transmembrane transducers*"i olarak görev yapmaktadır.

Normal karaciğerde, kapsülde, büyük damarların etrafında ve portal triadda esas olarak; kollajen I, III, V ve XI (fibril oluşturan kollajen de denir) bulunmaktadır. Buna karşılık subendotelial aralıkta sadece tip I ve III'ü içeren dağıntık fibriller bulunmaktadır. Daha az olarak da diğer kollajenler olan tip VI, XIV (daha önceleri

undulin deniyordu) ve XVIII bulunabilmektedir. Ayrıca glikoproteinler ve matriselüler proteinler olan fibronektin, laminin, tenascin, SPARC (hücre ile matriks interaksyonunu regüle eden matriselüler bir protein), ve von Willebrand factor'ün subendotelial birikintileri de vardır. Proteoglikanlar esas olarak perlecan gibi heparan sulfat proteoglycanlarından oluşmakla birlikte decorin, biglycan, fibromodulin, aggrecan, glypican, syndecan ve lumican'ın küçük miktarlarında da bulunmaktadır (13).

KC zedelenmesi kronikleştikçe Fibrillar kollajen göze çarpmaya başlar ve Tip-I kollajen konnektif doku bantları olarak organize olurlar. Tip-I kollajen ile Tip-III'ün birbirlerine olan oranları değişir. Normal KC'de Tip-I/Tip-III oranı 1:1 iken sirozda bu oran 4:1 olur. Bu yönüyle siroz tamamen bir skar dokusudur.

Doku remodeling (yeniden yapılanma)'inde fizyolojik değişikliklere ESM'in farklı cevap yetenekleri vardır. Örneğin Laminin-2 yetişkin KC'inde bulunmazken KC gelişiminde ve rejenerasyonda göze çarpar. Yine Tenascin KC gelişim aşamasında, erken kolestatik hasarda ve kolanjiokarsinomada safra yolları etrafında dikkat çeker (15,16). Bu biyolojik değişimlerin anlamı henüz araştırma aşamasındadır.

Karaciğerde fibrozis ilerledikçe ESM'de kalitatif ve kantitatif değişiklikler olur. Total kollajen içeriği 3–10 kat artar ve ESM, bileşim açısından tipik olarak yarı iyileşmesindekine benzer (17). Bu bileşimde fibril oluşturan kollajenler (Tip I, III ve IV), bazı fibril oluşturmeyen kollajenler (Tip IV ve VI), sellular fibronektin, laminin, SPARC, osteonektin, tenascin, von Willebrand factor gibi bir takım glikoproteinler, proteoglikanlar ve perlecan, decorin, aggrecan, lumican ve fibromodulin gibi glikozaminoglikanlar bulunmaktadır (18). Bu proteinlerden birçoğu hücreleri bağlar. KC hastalığının etyolojisine göre ESM bileşiminin kalitatif ve kantitatif değişimlerinin olup olmadığı tam olarak araştırılmamıştır. Bununla birlikte fibrozisten siroza ilerleme sürecinin etyolojiye göre değiştiği bilinmektedir, bu da ESM'nin detayında veya regülasyonunda hastalığa özgü değişikliklerin olduğunu düşündürmektedir.

Özellikle, heparan sulfat içeren glikoproteinlerden kondroitin ve dermatan sulfat içeren proteoglikanlara doğru bir kayma dikkati çeker. Bu da, ekstraselüler matriks tipinde normal düşük dansiteli bazal membran benzeri matriksin intersitisiyel tipe değiştiğinin bir ifadesidir (18). Yüksek dansiteli matriks hepatik stellate hücreyi aktive edip

hepatositlerdeki mikrovilusların ve endotelial fenestrasyonların kaybına yol açar. Böylece sinüzoidlerden hepatositlere solüt madde trasnportu bozular, bu da hepatosit disfonksiyonuna katkıda bulunur (19).

2.1.1.1 Matriks metalloproteinazları (MMPs)

ESM ile bazal membran komponentlerini parçalama yeteneğine sahip olan ve aktif bölgesinde çinko içeren homolog bir enzim ailesidir. Bu enzimler doku yeniden yapılanması, morfogenezis, yara iyileşmesi ve normal gelişimsel süreç gibi fizyolojik durumlarda önemli bir rol oynadıkları gibi tümör hücresi invazyonu, anjiyogenezis ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de yer alırlar.

Matriks metalloproteinaz ailesinin önceden tanımlanmış 7 üyesine birçok yeni metalloproteinazların eklenmesi ile bugün 18 den fazla enzim bildirilmektedir.

MMPs'ını inhibe eden bazı faktörler mevcuttur. Bunlardan “*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*” (metalloproteinazların spesifik doku inhibitörleri) (TIMPs) invivo koşullarda bu enzimlerin aktivitesinin regülasyonunda önemli rol oynarlar.

MMPs ve TIMPs arasında bulunan oran çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde değişmekte ve böylece bunlar arasındaki denge değişik patolojik durumların patogenezinde önemli bir rol oynayabilmektedir. Hepatik dokularda yara iyileşmesi sürecinde TIMP:MMP oranında artış ESM nin MMPs aracılığı ile parçalanmasını önleyerek fibrozisi kolaylaştırabilir.

ESM nin ve bazal membranın parçalanması; nonneoplastik doku yeniden oluşum sürecinde olduğu gibi kanser invazyonunda da önemli rol oynar. MMP’lar santral sinir sistemi, baş boyun, mide, pankreas, kolon, böbrek, deri ve prostatın malign tümörlerinin invazyonunda belirgin bir rol oynar.

Anjiyotensin II myokarda interstisyel kollajen parçalanması için anahtar enzim olan MMP I aktivitesini inhibe ederken, anjiyotensin II ve aldosteronun birlikte kollajen sentezini uyardıkları gösterilmiştir.

Hem kollajen hem de elastik bileşenler aşırı proteolitik aktivite ile uyumlu bir dejenerasyon gösterirler. Özellikle yaşlı dermal fibroblastlar ESM yapısının yaşla ilişkili atrofisini açıklayabilecek şekilde metalloproteinaz aktivitelerini artırır.

2.1.2 Ekstraselüler Matriksin Biyolojik Aktivitesi

Fibrogenez esnasında gözlenen matriks değişiklikleri, hücre membran reseptörleri yoluyla hücrel davranış değişikliklerine de yol açar. Bu membran proteinlerinden en iyi bilinenlerden biri integrinlerdir. İntegrinler, gen ekspresyonu, büyüme ve farklılaşma dâhil birçok hücrel fonksiyonları kontrol eden membran proteinleridir.

2.1.2.1 İntegrinler

İntegrinler alfa ve beta subünitlerinden ibarettir ve bunların ligandları sitokinlerden ziyade matriks moleküllerinden oluşur (21). Stellat hücrede, alfa-1-beta-1, alfa-2-beta-1, alfa-5-beta-1, ve alfa-6-beta-4 dahil birçok integrin tespit edilmiştir. Bu nedenle fibroziste, integrinle ilgili yolların (pathway) bloke edilmesi muhtemel bir tedavi yolu olarak akla gelmiştir. İntegrinler plazma membranından sinyal göndererek ekstraselüler matriksle hücre içi yapıların haberleşmesini sağlar. İntegrinler hücre içinden de sinyaller göndererek ekstraselüler matriks moleküllerinde yapısal değişikliklere neden olur. Hepatositlerde ve parankim dışı hücrelerde birçok integrin reseptörleri tanımlanmıştır (22,23). Fibroziste deneysel modellerde laminin bağlayan reseptörlerde upregülasyon gösterilmiştir (24).

Stellate hücreleri kollajen ve laminin için integrin reseptörlerini ekspresse eder, böylece Kc hasarı esnasında matriks komponentin depolanmasına katkıda bulunabilir (22).

2.1.2.2 Diğer Adezyon Proteinleri ve Hücre Matriks Reseptörleri

Bunlar cadherinler ve selektinlerdir. İnflamatuar hücrelerle endotelial duvar arasındaki etkileşime aracılık ederler (25). Örneğin matriks metalloproteinaz ekspresyonu ve hücre artışına yol açan stellate hücre aktivasyonu esnasında “*Discoidin Domain Receptor 2*” (diskoid bölge reseptör 2) (DDR2) adındaki tirozin kinaz

reseptörünün upregülasyon olduğu gözlenmiştir (26). DDR2'nin ligandı peptik bir ligand olmaktan ziyade bir ESM molekülüdür ve bunun upregülasyonu KC fibrozisinin sürekliliğinde kritik bir öneme sahiptir.

2.1.2.3 Soluble Growth Faktörler (Sitokinler)

ESM, sitokin salgılayarak hücre fonksiyonlarını indirekt olarak etkileyebilir. Bu sitokinler “*platelet derived growth factor*” (PDGF), “*hepatocyte growth factor*” (HGF), “*Connective Tissue Growth Factor*” (konnektif doku growth faktör) (CTGF), “tumor necrosis factor alpha” (TNFa), “basic fibroblast growth factor” (bFGF) ve “vascular endothelial growth factor” (VEGF)’lerdir (13). Bunlar lokal metalloproteinazlar tarafından kontrol altında tutulurlar (27). İşte bu sitokinlerin ESM'den salınmasının kontrolü, sitokin aktivasyonunun regülasyonunda anahtar mekanizmadır.

2.1.3 Ekstraselüler Matriksi Hangi Hücreler Yapar?

Karaciğerde hepatositler, sinüzoidal ve vasküler endotelial hücreler, stellate hücreleri, Kupffer hücreleri, biliyer epitelyal hücreler ve pit hücreleri bulunur. Pit hücreleri KC'e özgü natural killer hücreleridir ve sinüzoidal hücre grubuna dâhildir. Tümör hücrelerine yapışarak onları yok eder. Portal alanda konnektif doku fibroblastlarının görünümüne sahip olan az sayıda mezenkimal hücreler de vardır.

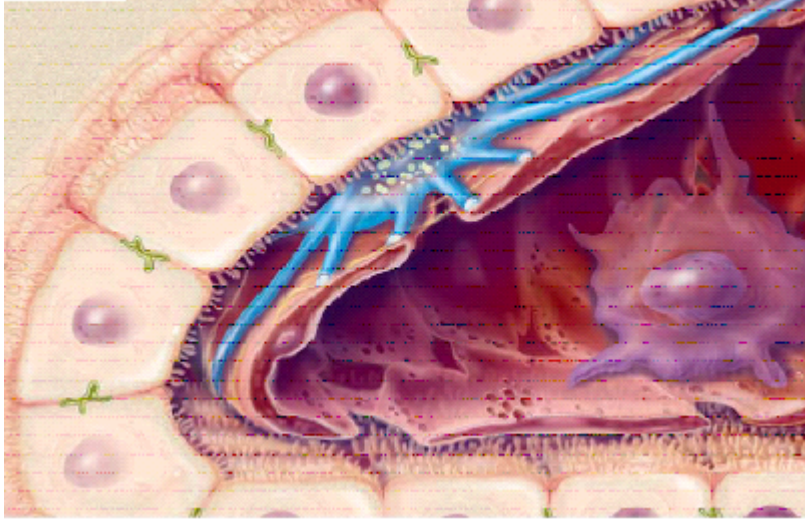
Tablo 1. Normal Karaciğer ile Fibrotik karaciğer dokusu arasında ekstraselüler matrikste gözlenen farklılıklar (20).

		NORMAL KARACİĞER	FİBROTİK KARACİĞER
Fibriller Kollajen	İçerik	Düşük Düzeyde Kollajen Tip-I, III ve Fibronektin	Artmış miktarda kollajen Tip-I, III ve fibronektin
	Lokalizasyon	Bağ dokusu septaları, portal traktusun stroması; santral ven ve az miktarda lobuler sinüzoidler	Lobuler sinüzoidler, bağ dokusu septaları, portal traktusun stroması
	Ana Hücresel Kaynaklar	Fibroblastlar, vasküler ve sinüzoidal endotelial hücreler	Stellate hücreler, sinüzoidal endotelial hücreler, myofibroblastlar
Bazal membran benzeri kollajen	İçerik	Kollajen Tip-IV, Laminin	Kollajen Tip-IV, Laminin
	Lokalizasyon	Portal yapıda sinüzoidler ve doku septaları; bazı safra duktus epiteli	Lobuler sinüzoidler, portal trakt ve doku septaları; safra duktus epitel hücreleri
	Ana Hücresel Kaynaklar	Sinüzoidal endotelial hücreler, fibroblastlar, safra duktus epiteli, vasküler endotelial hücreler	Stellate hücreler, sinüzoidal endotelial hücreler, myofibroblastlar, safra duktus epitel hücreleri

ESM tüm KC'de bulunmasına rağmen üniform olarak tek şekilde bulunmazlar. Tablo 1'de de görüldüğü gibi fibriller matriks ve bazal membran matriksi ayrı ayrı içeriklere sahiptir. Disse mesafesindeki düşük dansiteli kompleks Karaciğer fonksiyonlarını oldukça fazla etkilediğinden ayrı bir öneme sahiptir. KC'deki hücrelerin ESM bileşenlerine katkısı farklı farklıdır (28).

- a) **Hepatositler** esas olarak Laminin glikoproteini ve Kollajen tip XIII,
- b) **Endotelial hücreler** fibronektin ve Tip IV kollajen,
- c) **Bilier epitelial hücreler** bazal membran kollajenlerini ve Tenascin glikoproteinini,
- d) **Stellate Hücreler** tüm matriks bileşenlerini (kollajenler, glikoproteinler ve proteoglikanlar) salgılar (Şekil 1).

STELLATE HÜCRE



Şekil 1. Disse mesafesinde bulunan Stellate Hücre (29)

Hepatik fibrozisin anlaşılmasındaki asıl ilerleme ESM'i yapan hücrenin keşfinden sonra olmuştur. Daha önceden liposit, ito hücresi, yağ depo hücreleri veya perisinüzoidal hücreler olarak da adlandırılmış olan ve 1996'da isminin hepatik stellate hücreleri (HSH) olmasına oy birliği ile karar verilen bu hücreler, normal bir KC'de de fibrotik KC'de de ESM yapımının asıl sorumlusudur (28,30). Portal fibroblastlar gibi diğer hücreler ise bu yapıma minor bir katkı sağlarlar. HSH'leri, sinüzoidal endotel hücreleri ile hepatositler arasındaki subendotelial mesafe olan Disse aralığında bulunurlar. Bunlar normal KC'de parankimal olmayan hücre topluluğunun yaklaşık

1/3'ünü temsil eder ya da başka bir deyişle tüm KC hücrelerinin %15'ini HSH'leri oluşturur. HSH'leri mezengial hücrelerdir ve bunların diğer epitellerdeki karşılığı perisitlerdir. HSH'lerinin düz kas belirleyicisi olan desmin gibi sitokeratin içermesi, bunların arteriol veya venüllerin düz kas tabakalarının bir uzantısı olabileceği sorusunu akla getirmiştir. Karaciğere dal veren otonom sinir liflerinin sonlandığı yer HSH'lerdir (31).

Normal KC'de HSH'leri Vit-A metaboliti olan retinoidlerin depo yeridir. Vücuttaki total retinoidlerin %90'ını içerdiğinden vakuollü bir görünüm oluşturur ve ultraviyole ışığında karakteristik soluk mavi florasan verir. Retinoidlerin çoğu HSH sitoplazmasında retinil ester formunda damlacık şeklinde bulunurlar. Aktivasyon esnasında retinil ester hidrolize olması nedeniyle serbest retinol ortaya çıkar. Birçok çalışma, vitamin-A kaybı ile HSH aktivasyonunu ilişkilendirmeye çalışmıştır ancak sonuçlar çelişkilidir (32,33).

HSH'ler oldukça heterojen bir hücre topluluğundan oluşur ki bunlar fonksiyonel ve anatomik olarak birbirlerine benzeseler de hücre içi elemanları, retinoid içerikleri ve aktivasyon potansiyelleri açısından birbirlerinden farklılıklar gösterir (34). Ayrıca pankreasta da fibrotik potansiyeli olan stellate hücreleri tanımlanmıştır (35).

Aktive olan Stellate hücreleri bir değişime uğrayarak Vit-A depolayan sessiz (quiescent) durumdan, proliferatif, fibrojenik ve kontraktil olan myofibroblast hücreleri durumuna dönüşürler. Bu dönüşüm sonrasında HSH'lerin morfolojisi değişmiş, artık pürtüklü ve büyümüş bir endoplazmik retikulumu olan, içerisindeki Vit-A damlacığı küçülmüş, nükleer membranı büzüşmüş, kontraktil filamanları bulunan bir hücre haline gelmiştir.

Aktive olan HSH'lerdeki en göze çarpan yenilik, alfa-aktin'in düz kas izoformlarının "de novo" olarak ekspresyonudur (SMA). Western blot veya immunohistoloji ile hızla saptanabilen SMA, HSH'leri ortaya koymak için yaygın olarak kullanılmıştır. Fakat SMA (+) fenotipler sadece HSH'lere özgü değildir. Biliyer duktulus ve venüllere komşu düz kas hücrelerinde de vardır. Burada desmin varlığı ayırıcı tanıda kullanılır. Bununla birlikte HSH aktivasyonu için nöral filamentler

(örneğin nestin denen glial fibriller asidik bir protein) veya sinaptofizin daha özgül bir marker olarak kullanılabilir (36).

Sessiz duran ya da aktive olan HSH'lere transizyonel hücreler de denir. En fazla hasar neredeyse, ağırlıklı proliferasyon da orada olur. HSH'lerin fonksiyonları alkolik KC hastalığı, viral hepatitler, hepatoselüler karsinoma, vasküler hastalıklar, hematolojik maligniteler, biliyer hastalıklar, mukopolisakkaridozis, paretamol sürdozajı, leşmaniyazis, allogreft rejeksiyonu ve ilaç bağımlıları dâhil birçok farklı hastalıkta gösterilmiştir (37,38).

Sinüzoidal endotelial hücreler de erken fibrozise önemli ölçüde katkıda bulunurlar. Tıpkı HSH'ler gibi bu hücreler de normal ve fibrotik KC'de önemli düzeyde heterojenite gösterirler. Normal KC'deki endotelial hücreler tip III ve IV kollajen, laminin, syndecan ve fibronektin sentezlerler (39,40). Fibronektinin hücrel izofromlarının bu hücreler tarafından artmış ekspresyonu, akut KC hasarını takip eden erken olaylarda bir anahtardır, çünkü bunların ortaya çıkışı HSH'leri aktive eden bir mikroçevrenin oluşmasına yol açar.

2.1.4 Ekstraselüler Matriksin Degradasyonu

Fibroziste matriks yapımı ile matriks degradasyonu arasında bir denge vardır. ESM'in degradasyonu hepatik fibroziste ana olaydır. Matriks proteazların normal hepatik matrikste erkenden bir aksaklığa neden olması, skar matriksin normal matriks yerini alması işlemine hız kazandırır, bu da hücrel fonksiyonlara zararlı etki yapar. Sonuç olarak bu tip bir matriks degradasyonu patolojiktir. Diğer taraftan kronik KC hastalarındaki fazla matriksin rezorbsiyonu, hepatik disfonksiyon ve portal hipertansiyonun düzelmesi için bir fırsat sağlamaktadır.

Son yıllarda daha iyi anlaşılan matriks remodeling hakkındaki bilgiler arttıkça matriks remodelingteki kritik elementin "matriksinler" olarak da bilinen bir matriks metalloproteinaz ailesi olduğu ortaya konmuştur. Bunlar kollajen ve kollajen olmayan substratları spesifik olarak degrade eden kalsiyum bağımlı çinko içeren enzimlerdir (41). Genel bir kural olarak matriks metalloproteinazlar substrat özgüllüğüne göre 5 ayrı kategoride değerlendirilirler:

- 1) İnterstisiyel kollajenazlar (MMP-1, -8, -13)
- 2) Jelatinazlar (MMP-2,-9 ve fibroblast aktivasyon proteini)
- 3) Stromelisinler (MMP-3, -7, -10, -11)
- 4) Membran tip (MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25)
- 5) Metalloelastaz (MMP-12)

Metalloproteinazlar, periselüler çevrede birçok seviyede regüle edilirler. İnaktif metalloproteinazlar, membran tip matrix metalloproteinaz 1 (MT1-MMP) ya da plasmin tarafından proteolitik bir parçalanma sonucu aktive olabilirken, TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) olarak bilinen metalloproteinazların spesifik inhibitörlerinin bağlanmasıyla inhibe olurlar. Örneğin MT1-MMP ve TIMP-2, MMP-2 ile bir üçlü kompleks oluştururlar. Bu üçlüye MMP-2'nin optimal aktivitesi için gerekli olan avb3 integrin de muhtemelen dahildir (41). Plasmin aktivitesi, aktive edici enzim olan uroplasminogen activator (uPA) ve spesifik inhibitörü olan plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) ile kontrol edilir ve aktif transforming growth factor beta-1 (TGFb1) tarafından stimüle edilebilir.

Böylece, kollajenaz aktivitesi, özellikle TIMP'lar olmak üzere aktive olmuş metalloproteinazlar ve inhibitörlerinin göreceli olarak miktarını yansıtır. Diğer proteaz inhibitörleri de, örneğin A2 makroglobulinler, net degrade edici aktiviteyi etkileyebilir.

2.1.4.1 Patolojik Matriks Degradasyonu: Patolojik matriks degradasyonu normal subendotelial matriksin erkenden aksaklığa uğramasını ifade eder. Bu durum en az 4 enzim sayesinde olmaktadır:

- 1) Matriks metalloproteinaz 2 (MMP2) (jelatinase veya 72 kDA tip IV kollajenaz)

- 2) Tip IV kollajeni degrade eden MMP-9 (jelatinase B veya 92 kDa tip IV kollajenaz)
- 3) Latent MMP2'yi aktive eden Membran tip metalloproteinaz-1 veya -2
- 4) Proteoglikanları ve glikoproteinleri degrade eden ve latent kollajenazları da aktive eden Stromelisin-1

Stellate hücreler MMP-2 ve stromelisinin başlıca kaynağıdır (42,43). Latent MMP-2'nin aktivasyonu hepatositlerle etkileşmeyi gerektirebilir (44). Önemli derecede artmış MMP-2 ekspresyonu sirozun bir karakteristiğidir (45). MMP-9 Kuffer hücrelerinden lokal olarak sekrete edilirler (41).

Fibrotik KC'de başlıca kollajen olan Tip-I kollajeni degrade edebilen asıl proteaz matriks metalloproteinaz-1 (MMP-1)'dir. Bu enzimin kaynağı tip IV kollajenazlar kadar iyi tanımlanmamıştır. Stellate hücreler MMP-1 mRNA ekspresse ederler fakat çok az enzim saptanabilmektedir (43).

Progressif fibrosis TIMP-1 ve TIMP-2'de belirgin bir artış yapıp proteaz aktivitesinde net bir azalmaya yol açar (46,47). TIMP-1 direkt olarak stellate hücre apoptozunu inhibe eder (48). Stellate hücreler bu inhibitörlerin ana kaynağıdır (49).

TIMP-1 ekspresyonunun azalması fibrozisin geri dönüşümü açısından önemli bir ön şart iken devamlı TIMP-1 ekspresyonu progressif fibrosis için önemli bir neden olarak ortaya çıkmaktadır. Stellate hücrelerde TIMP-1 regülasyon mekanizmaları, skar matriksin rezorbsiyonunu hızlandıracak TIMP-1 ekspresyonunun selektif inhibisyonu için potansiyel teşkil eder (50).

2.1.5 Stellate Hücre Aktivasyonu ve Hepatik Fibrozisteki Belli Başlı Olaylar

Deneyisel hücre kültürlerinde birçok bileşiğin HSH'yi aktive ederek fibrogenizi teşvik ettiği bilinmektedir. Bunlar genel olarak hepatositler, Kupffer hücreleri, biliyer hücreler ve ortama gelen inflamatuvar hücreler tarafından salınmakta olup bunlara "Fibrogenizin Soluble Regülatörleri" adı verilir. Aktive HSH'ler başlıca ESM ve Sitokinler olmak üzere iki ana sınıf aktif molekül sentezler. HSH'ler bu aktif fibrillar

ESM'nin yanı sıra aynı zamanda MMP-2'yi de salgıladığından ESM'nin bazal membranının degrade olmasına neden olur.

Hepatik fibrozise yol açan temel faktör hepatik stellate hücre aktivasyonudur. Bu aktivasyon esas olarak 2 ana evreden oluşur:

- a) Başlama (Preinflamatuar stage):** Bu dönemde gen ekspresyonunda ve fenotipte erken bir değişiklik olur ve hücreler diğer sitokinlere ve stimuluslara duyarlı hale gelir. Başlama dönemi çoğu kez parakrin stimulus sonucudur (34).
- b) Süreklilik:** Süreklilik, aktive olmuş fenotiplerin ve fibrozis gelişiminin devamına yönelik olan bu stimulusların etkilerinin bir sonucudur. Bu süreç, hem otokrin hem de parakrin etkileri içermektedir.

2.1.5.1 Başlama

Stellate hücre aktivasyonu esnasında gözlenen en erken değişiklikler komşu hücreler olan sinusoidal endotel, Kuffer hücreleri, hepatositler ve trombositler tarafından oluşturulmuş parakrin stimülasyonun bir sonucudur. Daha önce de bahsedildiği gibi, endotelial hücrelerdeki erken hasarlanma selüler fibronektin oluşumunu stimüle eder. Fibronektin ise stellate hücreler üzerinde aktive edici bir etkiye sahiptir. Endotelial hücreler ayrıca TGFb'nın latent formdan aktif olan fibrojenik forma dönüşümüne de katılabilirler. Trombositler ise "*platelet derived growth factor*" (PDGF), "*Transforming growth factor beta 1*" (TGFb1) ve "*epidermal growth factor*" (EGF) yoluyla parakrin stimulus yapan bir diğer önemli kaynaktır (51). PDGF sessiz HSH'de bulunmaz (Tablo 2). Aktivasyon esnasında ortaya çıkar ve PDGF ile ilişkili HSH proliferasyonuna yol açar. TGF'ün Tip 1 ve Tip 2 şeklinde 2 ana sub-ünite vardır. Her ikisi de hem sessiz hem de transizyonel HSH'de var ancak aktive olan HSH'de bu sub ünitlerin oranı Tip 1 lehine bozulur. Tıpkı bunun gibi "Endotelin" in sub-grubu olan ET_A ve ET_B, aktivasyonda ET_B lehine bozulur. Yine Hücre adezyon moleküllerinden İnterselüler adezyon molekül-1 (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekül (VCAM-1) ve nöral hücre adezyon molekülü (NCAM-1)'in HSH'nin myofibroblastta dönüşümü ile arttığı gösterilmiştir (52).

Kuffer hücreleri, sitokinler (özellikle TGF β 1), reaktif oksijen intermediatları/lipid peroksidazlar sayesinde stellate hücreyi uyararak matriks sentezini, hücre proliferasyonunu ve stellate hücreden retinoid salıverilmesini stimüle ederler. Böylece stellate hücre aktivasyonuna katkıda bulunurlar. Öte yandan aktive Kuffer hücreleri farklı mekanizmalarla stellate hücre apoptozuna da yol açmaktadır (53).

Hepatositler de potent bir fibrojenik lipid peroksidaz kaynağıdır. Bir hasarlanmayı takiben gelişen hepatosit apoptozu da, apoptozda rol oynayan bir protein olan Fas aracılığıyla stellate hücrede başlangıç döneminin oluşmasına neden olur (54).

Hepatik stellate hücreleri stimüle eden reaktif oksijen türlerinin oluşmasında Sitokrom CYP2E1 önemli bir role sahip olabilir (55). CYP2E1 ekspresse eden E47 hücrelerinin varlığında geliştirilmiş kültüre hepatik stellate hücreler kollajen yapımını arttırlar. Antioksidanlar veya CYP2E1 inhibitörleri bu etkiyi önler (55). Bu bilgilere dayanarak CYP2E1'den türeyen reaktif oksijen türleri artmış kollajen sentezinden sorumludur denebilir. Benzer şekilde, yapılan deneyler göstermiştir ki; hepatik stellate ve E47 hücrelerinin birlikte yapılan kültürlerine ilave olarak araşidonik asid ve oksidatif stresi potansiyelize eden ferrik nitrilotriasetat, indüklenmiş kollajen protein sentezini arttırmaktadır (56). Bu bulgular, CYP2E1 alkolle indüklenebilir olduğundan dolayı, alkolik Karaciğer hastalığında KC hasarının pataogenezini açıklamaya yardım edebileceği söylenebilir.

Tablo 2. Sakin ve aktive stellate hücredeki değişiklikler

	SAKİN STELLATE HÜCRE	AKTİVE STELLATE HÜCRE
PDGF	-	+
TGF (Tip1/Tip2)	Normal	Tip1 lehine artmış
Endotelin (ET_A/ET_B)	Normal	ET _B lehine artmış
ICAM-1, VCAM-1, NCAM-1	Normal	Artmış
Retinoidler	Retinil Ester	Retinol

2.1.5.2 Süreklilik

Stellate hücre (SH) aktivasyonunun sürekliliği için hücre davranışında en az 7 farklı değişiklik olmalıdır;

- | | |
|------------------|---------------------------------------------------|
| a) Proliferasyon | d) Kontraktilite |
| b) Kemotaksis | e) Matriks degradasyonu |
| c) Fibrojenesis | f) Retinoid kaybı |
| | g) Lökosit kemoatraktanı ve sitokin salıverilmesi |

Bu değişimlerin net etkisi ekstraselüler matriksteki artıştır. Örneğin proliferasyon ve kemotaksis, hem kollajen üreten hücre sayısında bir artışa hem de her bir hücrenin daha fazla matriks üretmesine yol açar. HSH'ler tarafından sitokin salıverilmesi inflamatuvar ve fibrojenik doku yanıtını artırarak matriks proteazlarının normal matriks yerine tipik bir yara skarındaki matriks oluşumunu hızlandırabilir.

2.1.5.2.1 Proliferasyon

En güçlü HSH mitojeni platelet kaynaklı growth faktör (PDGF)'dür. HSH aktivasyonundaki PDGF resöptörlerinin erken indüksiyonu bu güçlü mitojenlere duyarlılığı artırır (57). PDGF ayrıca Na^+/H^+ değişimini de stümüle eder, bu nedenle bu iyon transportunun bloke edilmesi terapötik yaklaşımlara zemin hazırlamaktadır (58,59).

Stellate Hücredeki mitojen aktiviteye sahip diğer bileşenler trombin, trombin reseptörleri, EGF, TGF α , bFGF ve leptin'dir (60-62). Bunlar ve diğer mitojenler için olan uyarı yolları terapötik yaklaşımlar için potansiyel alan teşkil etmektedir (63).

2.1.5.2.2 Kemotaksis

HSH türevi kemokinler mononükleer hücreler ve nötrofilleri buldukları alana çektikleri gibi HSH'nin bizzat kendisine de kemotaktik etki gösterir. Böylece HSH'ler sitokin kemoatraktanlara (kimyasal maddeleri kendisine çeken) doğru göç ederler (64).

Bu da, in vivo olarak HSH'ler neden inflamatuvar septalarla aynı sıraya girdiğini kısmen açıklıyor.

2.1.5.2.3 Fibrojenesis

HSH'lerin fibrozisi doğrudan doğruya etkilediği en önemli yol matriks ve skar formasyonunu arttırmasıdır. Hepatik skardaki en iyi çalışılmış öge Tip I kollajendir. Bu kollajenin ekspresyonu HSH'lerde posttranskripsiyonel olarak düzenlenir. Tip I kollajen üretiminin en güçlü stimulanı TGFb'dir ve bu hem parakrin hem de otokrin kaynaklardan türemiştir. TGFb ayrıca selüler fibronektin ve proteoglikanların dâhil olduğu diğer matriks bileşenlerinin üretilmesini de stimüle etmektedir (18,65).

Kültürde aktive edilmiş HSH'ler tarafından Tip I kollajeni stimüle eden diğer faktörler retinoidler, anjiotensin II, interlökin 1-b, tümör nekroz faktör ve asetaldehiden oluşmaktadır (66). Fakat bunlardan hiç birisi TGFb1 kadar güçlü değildir. Ekspresyonunun artışından sorumlu protein faktörler bağlanmadan Tip I kollajen mRNA'nın 5' untranslated bölgesindeki korunmuş bir stem-loop'a kadar bloke edildiğinde Tip I kollajen ekspresyonu inhibe olabilir. Bu nedenle, bu bölgenin HSH kollajen sentezinin düzenlenmesinde önemli olduğu düşünülmektedir (67). TGFb1 hydrogen peroxide ve C/EBPb bağımlı mekanizma vasıtasıyla HSH'de kollajeni stümüle eder (68).

Daha önce de bahsedildiği gibi, lipid peroksidasyon ürünleri ekstraselüler matriks üretimine yönelik önemli stimuluslar çıkarmaktadır (69). Bunların her aktivasyonunda HSH'nin antioksidan kapasite kaybı artmakta ve böylece bunların etkileri daha da artabilmektedir (70). Bu önemli bilgiler ışığında birçok KC hastalığının tedavisinde antioksidanların kullanımının akıllıca olduğu düşünülmektedir.

Hepatik demir konsantrasyonu da, en azından hepatit-C'li hastalarda, fibrojenisi etkileyebilir. KC demir depoları bu tip hastalarda histolojik olarak hastalığın ciddiyeti ve HSH sayısı ile ilişkilidir (71).

2.1.5.2.4 Kontraksiyon

KC fibrozisi sürecinde portal dirençteki erken ve geç artışın en belirgin belirleyicisi HSH'nin kontraksiyonu olabilir. Tipik olarak son dönem sirozda kollajen bantlar çok sayıda aktive HSH'leri içerirler (72). Bunlar kendi sinüzoidlerini büzerek ve sirotik KC'i kasarak portal kan akımını engellerler. HSH aktivasyonu HSH'nin kontraktıl bir fenotip kazanması kültür ve in vivo ortamında gösterilmiştir ve kısmen ekstraselüler matriksle etkileşen reseptörlerle ilişkilidir (63).

Kontraktilite yeteneğinin oluşma aşamasında HSH'ler sitoskeletal protein alfa düz kas aktin ekspresyonunu arttırırlar. Eğer düz kas aktini kontraksiyon için gerekiyorsa o zaman bunun inaktivasyonu portal hipertansiyon tedavisi için terapötik bir hedef anlamına gelebilir.

HSH kontraksiyonu için asıl stimulus endotelin-1'dir. Endotelin-1 reseptörleri hem sessiz duran HSH'de hem de aktif HSH'de ekspresse edilmektedir (73). PDGF'den farklı olarak, HSH aktivasyonu reseptör ekspresyonu artmaz fakat endotelin reseptörünün predominant tipine bir şift ve otokrin endotelin-1'e karşı artmış bir duyarlılık oluşur (72,74). Özellikle Nitrik oksid gibi lokal olarak üretilen vasodilatör maddeler endotelin-1'in konstrüksiyon yapıcı etkilerini önleyebilir (72). İn vivo çalışmalar göstermiştir ki karbonmonoksit de HSH'deki etkilerinden, sinusoidal relaksasyona eşlik eder (75).

2.1.5.2.5 Matriks Degradasyon

Yukarıda da bahsedildiği gibi, matriks proteaz aktivitesindeki kantitatif ve kalitatif değişiklikler, KC'i fibrozise uğratan hasarlanmalarla birlikte ekstraselüler matriks remodeling'inde önemli bir role sahiptir. HSH'ler patolojik matriks degradasyonu için neredeyse gerekli tüm öğelerini ekspresse ettiğinden, yalnız matriks üretiminde değil aynı zamanda matriks degradasyonunda da çok önemli bir role sahiptir.

2.1.5.2.6 Retinoid Kaybı

HSH aktivasyonuna, karakteristik perinükleer retinoid (Vitamin A) damlacıklarının kaybolması eşlik etmektedir. Kültürde retinoid, retinil ester olarak depo

edilir, oysa aktivasyon esnasında hücre dışına salınan retinoid formu retinoldur, bu da dışarı atılmadan önce esterlerin intraselüler hidrolize edildiğini akla getirmektedir (37). Retinoid kaybının HSH'lerin aktive olması için gerekli olup olmadığı ve retinoidlerin, aktivasyonu hızlandırabileceği ya da önleyebileceği tam olarak anlaşılabilmiş değildir.

HSH'lerde birçok nükleer retinoid reseptör saptanmıştır (76). Bu moleküller intraselüler retinoid ligantlarını bağlar ve gen ekspresyonunu düzenler, fakat bunların fibrojenizde düzenleyici bir role sahip olup olmadıkları şüphelidir. Retinoidlerin terapötik olarak kullanılma çabalarından dolayı bu soru ciddi bir klinik öneme sahiptir.

HSH'lerde "*Peroxisome proliferator activated receptor*" (PPAR)'ler, özellikle PPAR γ saptanmıştır ve bunların ekspresyonu, aktivasyonla artmaktadır (77,78). Yeni tanımlanmış nükleer reseptör ailesi için olan ligandlar, HSH aktivasyonunu downregüle eder (78).

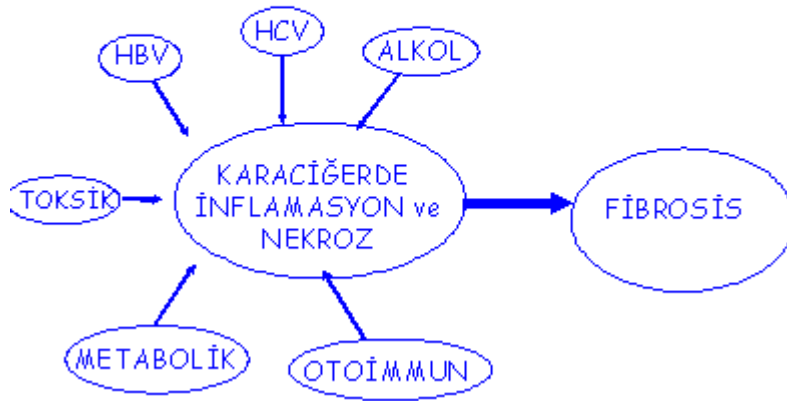
2.1.5.2.7 Lökosit Kemoatraktanı ve Sitokin Salıverilmesi

HSH aktivasyonunun otokrin ve parakrin sürekliliği için sitokinlerin artmış üretimi ve/veya aktivitesi kritik olabilir. HSH matriks üretiminde ve kontraktilitedeki direkt etkiler sırasıyla otokrin TGF β ve endotelin-1' e bağlanmıştır. HSH'ler mono- ve polimorfonükleer lökositlerin infiltrasyonunu indükleyerek inflamatuvar yanıtı güçlendirebilirler. Trombinin stimüle ettiği aktif HSH'ler, "*monocyte chemotactic protein-1*" (MCP-1) yaparlar (60). HSH'ler ayrıca nötrofil kemoatraktanlarını da yaparak alkolik KC hastalığının karakteristik nötrofilik akümülyasyonuna katkıda bulunabilirler (64).

2.1.6 Fibrozisin Süresi

Karaciğer, çeşitli etyolojik uyarılara inflamasyon ve nekroz ile yanıt verir ve karaciğer yaralanması meydana gelir (Liver injury). Etiyolojik neden ne olursa olsun karaciğer dokusu yara iyileşmesi sürecine fibrozis ile girmektedir (Şekil 2).

Yara İyileşme Cevabı



Şekil 2. Karaciğerde inflamasyon, nekroz ve fibrozis oluşumu

Fibroziste ilerleme süresi etkene, çevresel faktörlere ve genetiğe göre değişir. Örneğin malign biliyer bir obstrüksiyonda sarığin başlangıcından yaklaşık 10 ay sonra siroz gelişirken, kronik Hepatit-C infeksiyonunda alkol yoksa siroza ilerleme yaklaşık 20 yılı almaktadır. Yine erkeklerde fibrozis gelişimi kadınlara göre daha hızlıdır. Bunun nedeni östrojenin antifibrojenik olması ile açıklanmıştır (79,80). Gençlerde ve yaşlılardaki fibrozis gelişme oranında fark yoktur. Ancak gençlerde bazal ESM miktarı daha az olduğundan belirgin fibrozis seviyesine ulaşması için yaşlılara göre bir süre daha gecikebilir.

2.1.7 Fibrozisin Geri Dönüşümü

Fibrozis geri dönüşümlüdür. Bu birçok Kronik KC hastalığında, etyolojik faktörün elemine edilmesiyle gösterilmiş olmakla birlikte bu konuda belki de en iyi belgelenmiş örnek Kr. Hepatit-C infeksiyonunun tedavisi ile (supresyon veya eliminasyon) histolojik düzelme sağlanmasıdır (81). Eğer siroz hızla oluşmuşsa tamamıyla düzelme ihtimali vardır. Buna örnek; karbon tetraklorür veya safra yolları ligasyonu ile fare KC'de oluşturulmuş fibrozisin, etken kaldırıldığında tamamen düzelmesidir (82). Maruziyet 20 haftayı geçtiğinde siroz artık oturmuş olduğundan geri

dönüşüm söz konusu olmazken bu süre 14 hafta ile sınırlı olduğunda, 3 ay gibi bir sürede siroz tamamen ortadan kalkmaktadır. Bu bilgiye dayanarak; fibrozis veya sirozun geridönüşümsüzlüğü tamamen süreye bağlıdır denebilir. Bunun nedeni kronik maruziyette matriks proteinazların azalmış ekspresyonları veya zaman aşımının kolajenin degradasyonuna direnç oluşturan kollajen fibrillerin çapraz bağları ile izah edilmektedir (83,84). Fibrozisin uzun süreden beri mi yoksa yakın zamanlarda mı birikmeye başladığını ayıran bir test çok faydalı olabilirdi ancak maalesef henüz böyle bir test mevcut değildir.

Bir de sessiz seyirli siroz vardır ki bunlarda standart KC testleri esas olarak normal bulunmaktadır. Buna en iyi örnek alkoliklerdir. Alkol alımı KC’de kalıcı hasar hatta siroz oluşturmuş olabilir. Fakat alkol alımı kesildiğinde KC fonksiyonları eski haline geri döner. KC’de oluşmuş skarlar devam etmekle birlikte eğer portal hipertansiyon bulguları gelişmemişse klinik olarak sessiz seyreder.

2.1.8 Fibrozisin Değerlendirilmesi

Fibrozisin değerlendirilmesinde histoloji altın standarttır ve genellikle iğne biyopsisi ile örnek alınır. Biyopsi esnasında iğne, sirotik nodülün fibroz kapsülüne değil parankimine girebileceğinden, mikroskopta hem normal görünümlü hepatosit görülmesi ile hem de portal triat için yetersiz örnek olması nedeniyle zaman zaman işlemin tekniğine bağlı zorluklar yaşanır. Fibrozis için spesifik boyalar kullanılmaktadır; retikülin boyası ile esas olarak ESM’in glikoprotein içeriği boyanırken, trikrom ile kollajenler boyanmaktadır. Fibrozisin niceliksel değerlendirmesi için birçok skorlama sistemi mevcuttur. Picrosirius kırmızısı kollajenin herhangi bir tipine spesifik olarak bağlanır ve spektrofotometre ile niceliksel olarak hesaplanır, ya da bilgisayarlı imaj analiz ile fibrotik dokunun büyüklüğü bulunabilir.

Karaciğer biyopsisindeki riskler göz önüne alındığında fibrozisin değerlendirilmesinde görüntüleme metodları ve noninvaziv kan testlerinin kullanılması düşünülmüştür. Ultrasonografi (USG); karaciğerde makroskopik nodülleri göstermesi, portal hipertansiyon bulgularının elde edilmesi açısından kullanılmaktadır ancak düşük dereceli fibrozisi ayırt edememektedir. Bilgisayarlı tomografi ve radyoizotop taramalar da USG ile aynı sınırlamalara sahiptir. Magnetik rezonans (MR) ise, fibrozis ile birlikte

olan demir yükünü saptayabilmektedir ancak spesifik olarak fibrozisi görüntüleyememektedir.

Kanda dolaşan fibrogenezis göstergelerinin saptanması için bugüne dek çok çaba sarfedilmiştir ki üzerinde en çok çalışılanı ESM proteinlerinin parçacıklarıdır. Bunlar ekstraselüler kollajenin bir yan ürünüdür. Kollajen tip-I ve tip-III, N ve C terminal uzantıları ile prokollajen olarak salınmaktadır. Molekülün stabil olan fibril formuna dönüşmesi için bu uzantılardan kurtulması gerekmektedir. Yeni yapılan ESM proteinleri degradasyona uğrayarak bu parçacıkların dolaşıma geçmesine neden olur. Bu parçacıkların tespiti için birçok immunoassay testler geliştirilmiştir. Bunlar arasında en sık kullanılanı prokollajen III'ün N-terminal peptidi için olanıdır (pNIIIp). KC inflamasyonunda bu parçacığın plazma düzeyinin yüksek bulunması prokollajen III salınımının olduğunu düşündürmektedir. Buna rağmen, aktif fibrozis esnasında bile KC'den kaynaklanan kollajen tüm vücudun sadece küçük bir kısmını temsil etmektedir. Dahası bazı romatolojik hastalıklar bir yana bırakılırsa pNIIIp'nin dikkate değer yüksekliği sadece KC fonksiyonları bozulmuş olan KC hastalıklarında olmaktadır. Seviyeler hemokromatoziste düşük veya normaldir, çünkü hemokromatoziste karakteristik olarak genelde iyi korunmuş KC fonksiyonları ve minimal inflamasyonla birlikte fibrozis olmaktadır.

Tüm bu bulgular, dolaşımdaki pNIIIp düzeyinin esas olarak KC'de fazla yapımdan ziyade, azalmış KC klirensinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir (28). pNIIIp'nin dolaşan parçacıkları farklı boyut ve antikor özgüllüğündedir. Büyük parçalar KC tarafından küçükler ise böbrek tarafından temizlenmektedir.

Hyaluronik asid, spesifik bir enzim ile matriksten koparılan bir matriks bileşenidir. Temizlenmesi ise KC'de sinüzoidal endotel tarafından olmaktadır. Perisinüzoidal fibrozis geliştiğinde endotel hücre fonksiyonları olumsuz etkilenir ve Hyaluronik asid'in klirensinin azalması ile sonuçlanır. Hepatik fibrozisin derecesi arttıkça plazma Hyaluronik asid seviyesi artar, ciddi artışlar ise genellikle siroz lehine alınır (85).

2.1.9 Fibrozisin Tedavisi

İlerleyici fibrozis olan hatta siroz olan her hasta tedaviye adaydır. Tedavideki başlangıç noktası hasar oluşturan ajanın elemine edilmesi ya da suprese edilmesi olmalıdır. Hasar oluşturan faktör durdurulursa doku kendi kendini onaracak, fazla ESM'i degrade edecek ve aktive HSH'i apoptozise uğratarak normal KC yapısını tekrar oluşturacaktır. İkincil tedavi yolları ise hasar cevabını düzenleyen ajanların kullanılmasıdır. Birçok kronik KC hastalığının etkili bir tedavisinin olmadığı göz önüne alınacak olursa bu son yöntemin daha popüler olması beklenebilir.

Fibrozisin hücrel patogenezi üzerindeki çalışmalar yeni tedavi yaklaşımları doğurmuştur, bunları başlıklar halinde şöyle sıralayabiliriz;

- a) İmmünomodülatör bileşikler
- b) Stellate hücre aktivasyonunu inhibe edenler
- c) Antioksidanlar ve sitoprotektif ajanlar
- d) Kollajen sentezinin ve degradasyonunun modulatorleri
- e) Diğerleri

Birçok ajan yukarıda sayılan yollardan birden fazlasını kullanarak etki eder. Genelde İmmünomodülatör bileşikler ve Stellate hücre aktivasyonunu inhibe eden ajanlar tedavi etkinliği açısından daha ümit verici gibi görünmektedir.

2.1.9.1 İmmünomodülatör Bileşikler

2.1.9.1.1 Kortikosteroidler

Özellikle otoimmün hastalıklarda ve alkolik KC hastalığında uzun yıllar antiinflamatuvar ajan olarak kullanılmıştır. Gerçekten de otoimmün hastalıklarda kullanılan steroid fibrozis ya da siroza ilerlemeyi yavaşlatmaktadır. Alkolik hepatitlerde ise kısa dönem survivali düzeltmekte ancak uzun sürede fibrozis veya siroza ilerlemeye etkisine olan dair olan bilgiler yetersizdir.

2.1.9.1.2 Kolşisin

Antiinflamatuvar ve kollajenolitik özellikleri vardır ve fibrozis ile seyreden KC hastalıklarında kullanılmıştır. Ancak sonuçlar çelişkilidir (86). Primer Biliyer sirozlu vakalarda biyoşimik faydaları gösterilmişken survivale etkisi yoktur (87).

2.1.9.1.3 İnterferon alfa

İlk kez Castilla ve arkadaşları İnterferon alfa'nın antifibrotik etkisi olduğunu ortaya atmış ve 8 HCV'li hastanın 6'sında aktif fibrogenezin durduğunu ve serum pNIIIp'in normalleştiğini göstermiştir (88). Hayvan deneyleri İnterferon alfanın viral olmayan KC fibrozisinde de etkili olduğunu göstermiştir (89,90). İnterferon alfanın anti-viral etkisinden bağımsız olarak antifibrotik etkinliğinin olup olmadığı halen araştırma konusudur. İnterferon gama da birçok mezenkimal hücre tipini süprese eder ve HSH'nin proliferasyonunu ve aktivasyonunu sınırlar (91).

2.1.9.1.4 Diğer immünmodülatör sitokinler

Bunlar arasında IL-12 ve IL-10 sayılabilir. IL-12 murine schistosomiasis'te başarı ile kullanılmıştır (92). IL-10 ise potansiyel antiinflamatuvar ajandır. IL-10'un yokluğu, hayvan modellerinde artmış fibrogenez ile kendini göstermiştir (93). Küçük bir HCV'li hasta grubunda denenen IL-10 ile 90 günlük tedavi ile %28 hastada fibroziste regresyon olduğu gözlenmiştir (94).

2.1.9.2 Stellate Hücre Aktivasyonunu İnhibe Edenler

2.1.9.2.1 TGFβ inhibisyonu

Antifibrotik tedavi yaklaşımları içerisinde en kapsamlı araştırılan gruptur. Bu sitokinin aktivasyonu reseptör düzeyinde anti-TGFβ antikoları veya proteoglikan decorin gibi TGFβ'ya bağlanan ya da soluble- TGFβ reseptörü ve dominant-negatif reseptör gibi yarışmalı olan reseptör antagonistleri ile bloke edilmiştir. Yarışmacı reseptör antagonistlerinin KC hasarının başlangıcında ve kronik KC hastalığı esnasındaki uygulamalarının etkili olduğu bildirilmiştir (95,96). TGFβ'yı hedef alan tedavilerin başarısı tartışmalıdır, çünkü TGFβ birçok hücre için antiproliferatiftir ve

TGF β 'in disregülasyonu bazı kolon kanserleri ve epitelyal neoplazmların temelinde yatmaktadır.

2.1.9.2.2 Endotelin aktivitesinin inhibisyonu

Kültürde indüklenmiş HSH aktivasyonunu önemli derecede azaltır (97). Hayvan modellerinde endotelin reseptörleri olan ET_A ve ET_B nin birlikte ya da sadece ET_A nın tek başına reseptör antagonistinin kullanımı, fibrozis başladıktan sonra bile %50 oranında KC kollajeninde azalmaya yol açmıştır (28).

2.1.9.2.3P entoksifilin

Bir TNF antagonisti olarak antiinflamatuvar etkinliğe sahip olmakla birlikte aynı zamanda kültür fibroblastlarında antiproliferatif ve antifibrotik bir ajan olarak da bilinmektedir. Bu ilaç HSH'lerde serumun ve PDGF'nin aracılık ettiği DNA sentezini, kollajen sentezini ve gen ekspresyonunu inhibe eder. Pentoksifilin ile sınırlı sayıda hayvan deneyleri tecrübesi olup, antifibrotik olarak yapılmış hiç insan çalışması bulunmamaktadır (98,99).

2.1.9.2.4 Halofuginon

Bu bileşik kültür fibroblastlarda kollajen sentezi ve gen ekspresyonunu inhibe eder (100). Sıçanlarda deneysel KC fibrozisinde bu etkileri gösterilmiştir (101,102). Postoperatif adezyonu önleyici etkileri için insanlarda kullanılmışsa da KC hastalığında yapılmış bir çalışma mevcut değildir (28).

2.1.9.2.5 Fumagillin ve analogu TNP-470

Kültürde HSH aktivasyonunu azaltır. Sıçanlarda in vivo kullanılan bu iki ajanın CCl₄ veya dimetilnitrozamin ile indüklenmiş fibrozisin ilerlemesini önlediği gösterilmiştir (103).

2.1.9.2.6 Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitörleri

Antifibrotik ajan olarak çalışılmıştır. Kaptopril, sıçanlarda safra yolları ligasyonu ile oluşacak fibrozisi yavaşlatmıştır (104). Bir ACE inhibitörü olan

perindopril hem fibrozisi önleme hem de geri çevirmede etkili bulunmuştur. Angiotensin-II reseptör blokeri olan Candesartan da benzer etkilere sahiptir.

2.1.9.3 Antioksidantlar ve Sitoprotektif Ajanlar

2.1.9.3.1 Vitamin-E

CCl_4 ile oluşturulmuş KC fibrozisini sınırlamada etkili bulunmuştur. Aşırı demir yükleyerek oluşturulmuş KC hasarını önleyici etkisi araştırılmıştır ancak sonuçlar çelişkilidir (105).

2.1.9.3.2 Silymarin

Devedikeni sütünden elde edilmiş bir flavonoiddir. Silymarin ya da onun esas aktif bileşiği olan silybinin birçok hepatotoksine karşı lipid peroksidasyonunu ve akut KC hasarını azaltır. Hayvanlarda fibrozisi döndürebilse de insan çalışmalarında sonuçlar çelişkilidir (106).

2.1.9.3.3 Polyenoylphosphatidylcholine (PPC)

Fibrozise karşı birçok potansiyel aktivite şekillerine sahip poliansatüre bir lipiddir. PPC sitokrom p450 2E1'i inhibe eder ve KC lipid peroksidasyonunu azaltır. Hücre kültürlerinde HSH aktivasyonunu yavaşlatır ve kollajenolitik aktiviteyi stümüle eder (107). İlaç aynı zamanda Kupffer hücre aktivasyonunu da sınırlayabilir (108). KC'in toksik ve immün hastalıklarında faydalı bulunmuştur (109).

2.1.9.3.4 “Sho-saiko-to”

Glycyrrhizin, glycyrrhetic acid, baicalin ve baicalein içeren bitkisel bir Japon karışımıdır. Akut ve Kr KC hastalıklarında faydalı olduğu ve antitümör etkilerinin de mevcut olduğu bildirilmiştir. Serbest radikalleri temizler ve interferon gamayı indükler. Bileşim, kültürde HSH aktivasyonunu ve proliferasyonunu direkt olarak inhibe eder (110).

2.1.9.3.5 Ursodeoxycholic acid (UDCA)

Antifibrotik aktivite gösteren sitoprotektif bir ajandır. Doğal safra asidlerinin hepatosit apoptozis yapıcı etkilerini bloke ederek toksisitelerini sınırlamaktadır. Hayvan modellerinde, biliyer obstrüksiyonda gelişen hepatik fibrogenezi önemli ölçüde azaltmaktadır (111).

2.1.9.3.6 Prostaglandinler (PG)

Özellikle “E” serileri sitoprotektif ve antiinflamatuvar etki göstermektedirler. PGE1 ve PGE2 hayvan modellerinde fibrogenezi azaltmakta ancak insanlarda hiçbir etki göstermemektedir (112). Biliyer fibrozisi olan sıçan modellerinde PGE1 kollajen gen ekspresyonunu azaltmaktadır.

2.1.9.3.7 Malotilate

Asetaminofen, bromobenzen, CCl₄, dimetilnitrozamin dâhil birçok toksinin yol açtığı KC hasarını inhibe eden bir bileşimdir. Etki mekanizmasının, bu sayılan toksik bileşimleri, toksik ara ürünlere metabolize eden sitokrom p450 2E1’i suprese ederek olduğu düşünülmektedir. Ayrıca ilacın antiinflamatuvar etkinliğinin de olduğu söylenmektedir. Deneysel hayvan modellerinde ümit verici etkilerine rağmen insanlarda etkinliği gösterilememiştir (113).

2.1.9.4 Kollajen Sentezinin ve Degradasyonunun Modulatorleri

Kollajenin 3’lü helikal formda stabilizasyonu için prolin rezidülerinin hidroksilasyonu kritik bir öneme sahiptir. Kollajen 3’lü heliksinin destabilizasyonu kollajen degradasyonuna yol açar.

2.1.9.4.1 Prolilhidroksilaz İnhibitörleri (HOE 077)

Antifibrotik olarak kullanılmaktadır. Bu sınıfın yegane bileşimi HOE 077 (pyridine-2,4-dicarboxylic-di [2-methoxyethyl] amide) olarak adlandırılan bir moleküldür ve bir pro drug olarak hepatosit tarafından alınarak aktif inhibitörlerine dönüştürülür. Deneysel hayvan modellerinde biyokimyasal ve histolojik düzelme

sağlayıp, kollajen gen ekspresyonunda dramatik etkiler gösterir (114). In vivo koşullarda SMA'nın sınırlı ekspresyonu, ilacın prolilhidroksilaz aktivasyonundan bağımsız olarak HSH aktivasyonunu suprese ettiğini akla getirmektedir.

2.1.9.4.2 Safironil

HOE 077'in bir varyantıdır. Prolilhidroksilaz'a karşı inaktiftir fakat in vivo olarak hepatik fibrogenezin önlenmesinde HOE 077 kadar potenttir. Hem HOE 077 hem de Safironil, kültürde HSH aktivasyonunu bloke etmektedir. Bu nedenle her ikisinin de etki mekanizmalarının prolilhidroksilaz'ı inhibe etmekten ziyade HSH'i inhibe etmek olduğu düşünülmektedir (115).

2.1.9.5 Diğerleri

2.1.9.5.1 Hepatocyte growth factor (HGF)

Uzun yıllardır HSH'nin bir ürünü olarak bilindi. Kültürde HSH aktivasyonu ile HGF ekspresyonunun azalmış olması bu hücrelerdeki growth faktörle fibrogenez arasında resiprokal bir ilişkinin olabileceğini düşündürmektedir. KC hasarı olan sıçanlarda antifibrotik aktivite yönünden HGF test edilmiş ve KC kollajen içeriğinin %25-50'sini, kollajeni ve TGF β genini suprese ettiği bulunmuştur (116). Bazı araştırmacılar da HGF'nin KC'de kollajenaz aktivitesini artırarak sirozun rezolüsyonunu sağladığı ve survivali uzattığını iddia etmişlerdir (117).

2.1.9.5.2 Trichostatin A

Streptomyces mantarının bir ürünüdür ve histondeasetilaz'ın spesifik bir inhibitörüdür. Histon'un hiperasetilasyonu genel olarak hücrelerin farklılaşması ile ilişkilidir. Sıçan deneylerinde primer kültürde yeterli dozda trichostatin A ile tedavide histonun hiperasetilasyonu sağlanmış ve bunun da HSH aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Herhangi bir toksisitesi olmayan bu bileşimin in vivo olarak fibrogenezde bir etkisinin olduğu tam olarak gösterilememiştir.

2.1.9.5.3 Octreotid

Portal hipertansiyondaki bilinen etkilerinin yanı sıra antiinflamatuvar etkilere de sahiptirler ve anti fibrotik olarak yıllar önce önerilmişlerdir (28). Sıçanlarda 100 µg/kg sabah akşam subkutan uygulama ile %33 civarında fibrogenezin azaldığı görülmüştür (118).

2.1.9.5.4 Hücre hedefli antifibrotik ajanlar

HSH'lerdeki spesifik reseptörler hedef alınmaktadır. Bunlar arasında "mannose-6-phosphate/insulin-like growth faktor II" (M6P/IGF-II) reseptörü ve Tip VI kollajen reseptörü sayılabilir. Bu reseptörleri bağlayıcı olan antifibrotik ajanların kullanımı da bir sonraki basamak olarak planlanmaktadır (28).

2.1.9.5.5 Flavonoidler

Flavonoidler fenilalaninden sentez edilen bitki pigmentleridir ve genel olarak bitkinin taç yaprağının renklerini yansıttığından harika renklere sahiptirler. Son zamanlarda hakkında daha çok bilimsel makalenin ortaya çıktığı doğal bileşimler sınıfının bir üyesidir ve botanistler tarafından "taxonomic" sınıflandırma için kullanılmaktadır. Flavonoidlerin mutajenik olduklarına dair çeşitli bilgiler bulunsa da hayvanlarda çok düşük toksisite tespit edilmiştir (119).

Flavonoidler hem "Auxin indolyl acetic acid" in "exocytosis" ini inhibe ederek hem de gen ekspresyon indüksiyonu ve çeşitli yollarla diğer biyolojik hücreleri etkileyerek bitki büyümesini regüle etmektedir. Flavonoidler birçok bakteriye bakteriostatik ya da bakteriositik etki göstermekte, reverse transcriptase ve protease gibi önemli viral enzimleri inhibe etmekte ve bazı patolojik protozonları yok etmektedir.

Flavonoidler, tıbbi kullanım için hazırlanmış, propolis gibi birçok bitkisel ilacın yapısındaki ana fonksiyonel bileşendir. Antik çağdan beri bilinen propolis başta olmak üzere flavonoidlerin kullanımını, günümüz otör doktorları bir çok sık görülen hastalığın tedavisinde gün geçtikçe daha fazla önermektedir, buna sebep olarak da; kanıtlanmış spesifik enzim inhibe edici özelliklerinin bulunmasını, bazı hormon ve

nörotransmitterlerin stimülasyonunu ve serbest radikalleri temizleme özelliklerinin bulunmasını göstermektedir (119).

2.1.9.5.5.1. Propolis ve Cape

Propolis Yunanca'dan türemiş bir terimdir. "Pro" önünde-girişinde, "polis" ise topluluk-şehir anlamında bir kelime olup arı kovanının savunmasında kullanılan bir madde olarak bilinmektedir. Propolis veya bal arısı zankı (Bee glue), işçi arıların huş (betula), kavak, kızılağaç, söğüt, hurma gibi birçok ağacın yapraklarının tomurcuklarından topladıkları kahverengimsi sakızsız bir maddedir. Bal arıları bu maddeyi imal etmek için bitkilerden aktif olarak sekrete edilen materyali veya bitkilerdeki zedelenmelerden ötürü dışarı sızan maddeleri kullanabilirler (lipophylic materyal, mucilages, çikletler, reçineler vs gibi). Bu materyalleri toplayan arılar daha sonra salya ve enzimatik sekresyonlarla bunu zenginleştirir ve kovanın duvarını örtmek, çatlakları ve boşlukları doldurmak ve yuvaya saldıran ve öldürülmüş olan böcekleri mumyalamak için kullanır (120).

Modern "herbalist"ler propolisi antibakterial, antifungal, antiviral, hepatoprotektif, antiinflamatuvar, vücut direncini arttırıcı özellikleri ve gastroduodenal ulserleri tedavi edici özelliklerinden dolayı önermişlerdir. Haricen cilde uygulandığında bakteri ve mantarın neden olduğu çeşitli dermatitlere iyileştirici etki gösterirler. Bugün propolis kapsül, krem ve toz formlarında, ağız bakımında, boğaz pastili şeklinde çeşitli ticari formları mevcuttur.

a) Kimyasal Yapı

Propolisin yapısında şimdiye kadar esas olarak polifenoller olmak üzere 180'den fazla bileşik saptanmıştır. Asıl polifenoller ise Flavonoidler olup buna fenolik asidler ve esterler, fenolik aldehitler, ketonlar vs eşlik eder. Propolisteki diğer bileşimler; % 5–10 civarında uçucu yağlar ve aromatik asidler, %30–40 bal mumu olup geri kalanında reçineler, pelesenkler (melisa, oğul otu) ve içerisinde magnezyum, nikel, kalsiyum, demir ve çinko gibi önemli elementlerden zengin polen zerrecikleri bulunur (121). Yeni bileşimler ise propolisin Brezilya (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) ve Çin (octacosanol) örneklerinden izole edilmiştir. Son yıllarda propolisin kimyasal

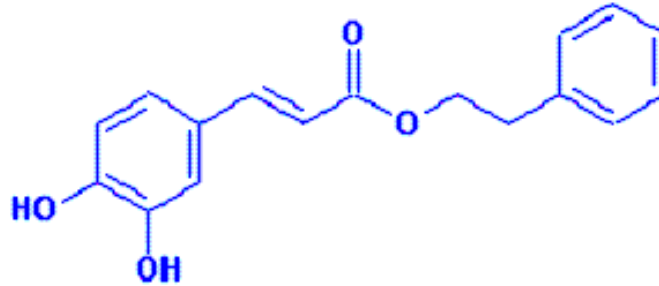
kompozisyonu bir ölçüde aydınlatılmış olsa da arının dolaştığı bölgelerdeki topladığı örneklerin oldukça farklı olmasından dolayı propolisin kimyasal kompozisyonu da önemli farklılıklar arz eder.

Propolisin antimikrobiyal özellikleri esas olarak pinocembrin, galangin ve pinobanksin adlı flavonoidlere bağlanmaktadır. Pinocembrin'in aynı zamanda antifungal özelliği de vardır. Diğer aktif bileşimleri ise "coumaric ester" ve "caffeic acid"lerdir. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) tümör hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermektedir (şekil 3). Diğer bileşimler arasında olan "prenylated p-coumaric" ve "diterpenic acid"ler antibakteriyel ve sitotoksik aktiviteye sahiptirler. "Caffeoylquinic acid" türevleri ise immünmodülatör ve hepatoprotektif etki gösterir.

MOLEKÜL FORMÜLÜ: C₁₇H₁₆O₄

MOLEKÜL AĞIRLIĞI: 284.3

Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE)



Şekil 3. CAPE'in kimyasal formülü (122).

b) Farmakolojik Özellikleri

Propolis preparatları in vitro ortamda antimikrobiyal etki gösteriyor olup esas olarak Gram pozitif (Staphylococci ve Streptococci türleri) ve Gram negatif bakterilere (E. coli, K. pneumoniae, P. vulgaris ve P. aeruginosa), Helicobacter pylori, protozoa (T.

cruzi), mantar (*Candida albicans*) ve virusler (HIV, Herpes viruses or influenza viruses) etki gösterirler. Bir çalışmada propolisi çözmek için kullanılan ekstraktın propolisin antimikrobiyal potansiyelini etkileyebileceği gösterilmiştir (123). Gerçekten de yağlı preparatlar geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Gliserin solüsyonları Gram (+) bakterilerde çok az inhibisyon gösterirken etanol ve propilen glikol solüsyonları mantarlara karşı iyi aktivite göstermektedir. Çalışmalar, propolisin streptomisin ve cloxacillin'in antibakteriyel aktivitesi ile belirgin sinerjik etkileşim gösterdiğini, kloramfenikol, cefradine ve polymyxin B'nin antibakteriyel aktivitesinde de orta derecede sinerjik etki gösterdiğini ortaya koymuştur (124).

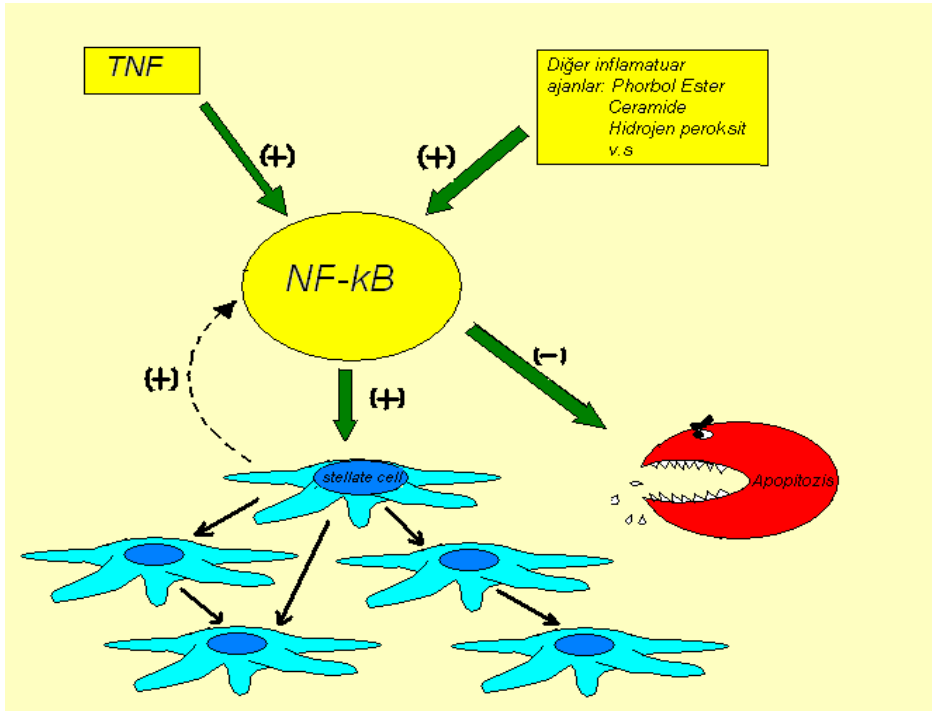
Propolisin akut ve kronik hastalıklarda antiinflamatuvar etkinliği vardır fakat bunu nasıl gerçekleştirdiği hala netlik kazanmamıştır. Son zamanlarda, Rossi ve arkadaşları propolisin konsantrasyon-bağımlı şekilde COX aktivitesini inhibe ettiğini göstermişlerdir (125). Test edilen bileşimler arasında sadece CAPE ve galanin'in propolisin antiinflamatuvar aktivitesinde payı olduğu ve bunlardan da CAPE'in katkısının daha fazla olduğu gösterilmiştir.

Propolisinin sıçanlarda *in vivo* olarak CD4/CD8 T lenfosit oranını arttırdığı ve *in vitro* olarak ise makrofajlarda immünostimülatör ve immünomodülatör etki gösterdiği ortaya konmuştur (126-128). Bu etki sahası propolisin akut ve kronik inflamasyonlarda ağızda, üst ve alt solunum yolları infeksiyonlarında, deri ülserlerinde kullanımının mantıklı olduğunu izah edebilir (129). Ayrıca propolis sıçanlarda Karbon tetraklorür veya parasetamol ile oluşturulmuş akut karaciğer hasarında hepatoprotektif etki göstermektedir (130).

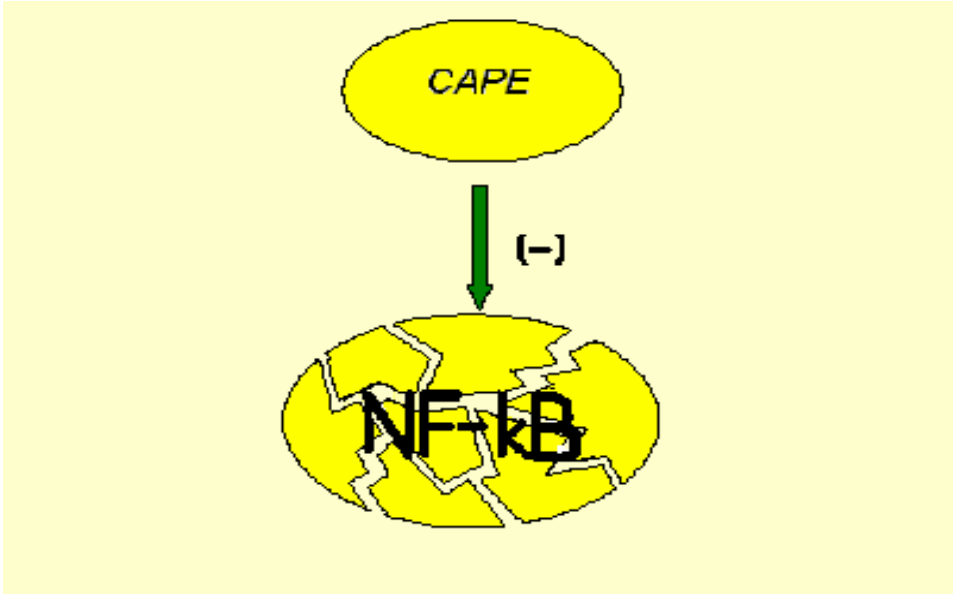
Bilindiği gibi "glutathione" (GSH), kimyasallarla oluşturulmuş hücre hasarına karşı protektif bir role sahiptir. GSH karaciğerde en önemli antioksidan moleküllerden biri olup fizyolojik konsantrasyonları, hücrelerin normal redox işlerinin devamına katkıda bulunmaktadır. Propolis de sıçanlarda, parasetamolün indüklediği GSH tüketimini geri çevirebilmekte ve böylece hücre ölümünü önlemektedir. Propolis ayrıca oksijen radikallerini de temizlemektedir (131). Son çalışmalar propolisin β -mercaptoethanol'ün "autoxidation"ı sırasında üretilen superoxide anion formasyonunu inhibe edebileceğini göstermiştir (132). Bu çalışmalarda CAPE'in bu inhibisyonu sağlamada galangin'den daha aktif olduğu bulunmuştur. CAPE ayrıca tavşanlarda

infrarenal aortik oklüzyon sonrasında gelişen iskemik spinal kord hasarına karşı da koruyucudur. Bu deneysel çalışmaların sonuçları, torasik veya torakoabdominal aort anevrizmalarının cerrahisi onarımı esnasında bu komplikasyonlardan korunmak için propolis ve propolisin aktif komponenti olan CAPE'in proflaktik kullanımını akla getirmektedir (133).

Propolis ayrıca kokainle benzer anestezi bir etkiye sahiptir ve biyolojik dokularda rejeneratif etki gösterip birçok kanser hücrelerine karşı da antineoplastik aktivite gösterir (128-133). Hücre bölünmesini ve protein sentezini de inhibe etmektedir (134). CAPE, tümör nekroz faktör (TNF)'ün yanı sıra phorbol ester, ceramide, hydrogen peroxide ve okadaic acid gibi diğer inflamatuvar ajanların indüklediği NF- κ B aktivasyonunu da inhibe etmektedir (Şekil 4 ve 5). CAPE propolis içerisinde kemopreventif (kimyasal önleyici) ve antitümöral etkinliği olan major aktif bileşimlerden biri olarak saptanmıştır (135). Bununla birlikte propolis ve aktif komponenti olan CAPE'in kanser tedavisindeki olumlu etkisinin mekanizması tam olarak anlaşılmış değildir ve daha ileri deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.



Şekil 4. Stellate Hücrenin NF- κ B tarafından aktive edilişi



Şekil 5. CAPE NF- κ B 'yı inhibe eder

c) Yan Etkileri

Propolis düşük dozlarda kullanıldığında güvenli olarak bilinirken, 15 g/gün dozundan fazla kullanıldığında yan etki sıklığı artmaktadır. En sık yan etkiler alerjik reaksiyonlar, cilt ve müköz membran irritasyonu olarak bildirildiğinden astım hastaları, egzemalı ve ürtikerli hastalar tedavi edilirken dikkatli olunmalıdır.

d) Gelecekteki Ümitler

Propolisin kan basıncını ve kolesterol seviyesini düşürdüğü, hatta ilaç kesildikten haftalar sonrasına dek kolesterol düşürücü etkisinin devam edebileceği rapor edilmiştir (136). Bilindiği gibi aterosklerozun patogeneğinde, mikroorganizmaların lipopolisakkaritler, hücresel adezyon molekülleri ve sitokinler aracılığı ile katkıda bulunduğu ve gün geçtikçe daha çok kabul gören inflamatuvar ve immünolojik mekanizmalar söz konusudur. Propolisin yukarıda bahsedilen antihipertansif ve antilipid etkilerinin yanı sıra antibakteriyel ve antiinflamatuvar özelliklerinin de oluşu, onu aterosklerozdan koruyucu ve tedavi edici bir ilaç olarak gündeme taşımıştır (127). Bu

nedenden dolayı propolisin, aterosklerozun önlenmesi ve tedavi edilmesi amacıyla kullanılması düşünülmüştür.

e) CAPE ile NF- κ B ilişkisi

Kanatlılardan memelilere dek dizilmiş çeşitli organizmalarda transkripsiyon faktör NF- κ B ailesinin üyeleri tanımlanmıştır. Memelilerde en yaygın dağılımlı NF κ B bağlayıcı faktör p50 ve p65 (Rel-A)'dan oluşan bir heterodimerdir. Bu transkripsiyon faktörü birçok cevapta esas rol oynayıp gen ekspresyonunun hızlı indüksiyonu ile konakçı savunmasına yol açar. Özellikle çeşitli inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu, major histokompatibilite kompleks genlerini ve tümör metastazlarında olan adezyon moleküllerini kontrol eder. NF- κ B'nin ve ona bağımlı genlerin disregülasyonu toksiseptik şok, graft versus host reaksiyonu, akut inflamatuvar durumlar, akut faz yanıtları, viral replikasyon, radyasyon hasarı, ateroskleroz ve kanserin dâhil olduğu çeşitli patolojik durumlarla beraberdir.

Diğer transkripsiyon faktörlerinden farklı olarak NF- κ B proteinleri, I κ B-alfa adındaki bir inhibitör subünit tarafından inaktif bir şekilde stoplazmada tutulur. I κ B'nin fosforilasyonu ve onun daha sonraki degradasyonu NF- κ B'nin nükleusa translokasyonuna izin vermektedir. Bu aktivasyon, inflamatuvar sitokinler [yani tumor necrosis factor (TNF), lymphotoxin ve interleukin 1], mitojenler, bakteriyel ürünler, protein sentez inhibitörleri, oxidative stress (H₂O₂), ultraviyole ışığı ve phorbol esterler gibi birçok ajan tarafından indüklenir (137). NF- κ B'nin aktivasyonunu downmodulate yapabilen ajanlar terapotik müdahaleler için bir potansiyele sahiptir.

CAPE'in antiviral, antiinflamatuvar ve immunomodulatör özelliklere sahip olduğu ve farklı tiplere dönüşmüş hücrelerin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (4,138). CAPE'in, dönüşüme uğramış hücrelerde "redox" tepkimesini değiştirerek apoptozisi indüklediği öne sürülmektedir (139). Yine CAPE'in lipid peroksidasyonunu suprese ederek antioksidan aktivite gösterdiği ve ornitin dekarboksilaz, protein tirozin kinaz ve lipooksijenaz aktivitelerini inhibe ettiği rapor edilmiştir (140,6). Ayrıca CAPE'in, phorbol esterin indüklediği H₂O₂ üretimini ve tümör teşvikini de inhibe ettiği iddia edilmektedir (141).

CAPE'e atfedilmiş birçok aktivitenin moleküler bir temeli tanımlanmamasına rağmen, CAPE'in inhibe ettiği aktivitelerin birçoğunda NF- κ B'nin aktivasyonu gerekmektedir. İnsan histiyositik hücre dizilerinde (The human histiocytic cell line U937 cells) yapılmış bir çalışmada CAPE'in doza bağımlı olarak NF- κ B'yi yüksek oranda inhibe ettiği gösterilmiştir (5).

Literatürde CAPE'in gerek karaciğerde gerekse karaciğer dışı organlardaki fibrozisi önleyici özelliği olduğu sınırlı sayıda yapılmış çalışmalarla vurgulanmıştır (142). Ancak genel olarak karaciğer fibrozisini önleyici etkisinin olduğu yönünde pek az çalışma mevcuttur (10). CAPE'in fibrozisi nasıl önlediğine dair çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Bu yönde yapılmış bir in vitro çalışmada CAPE'in dozuna bağlı olarak HSH'nin proliferasyonunu ve kollajen sentezini inhibe ettiği ya da apoptozunu indüklediği gösterilmiştir (143). Burada CAPE'in reaktif oksijen intermediate'lerini azaltarak HSH'nin proliferasyon ve kollajen sentezini inhibe ettiği düşünülmektedir (7,144). Bir başka mekanizmanın ise bu etkiyi COX-2 ekspresyonunun ve NF- κ B aktivasyonunun inhibisyonunu sağlayarak gerçekleştirdiği sanılmaktadır (145). Bir fenolik türev olan CAPE'in bu antioksidan özelliğinin diğer fenolik bileşimler gibi "inositol phosphate" metabolizması, "tyrosine" ve "protein kinase" activationunu suprese ederek gerçekleştirdiği öne sürülmektedir (146).

Mekanizması ister anti-oksidasyon ister HSH inhibisyonu üzerinden olsun CAPE'in artık fibrozisi önleyici etkisi olduğu literatürde tartışılmaya başlamıştır. Bununla birlikte karaciğerde deneysel olarak oluşturulmuş fibrozisin CAPE ile gerilediği gösterilen bir çalışma bulunmamaktadır. CAPE'in hem fibrozis gelişimine olan önleyici etkisini araştırmak hem de oluşmuş fibrozisi geriletici etkisinin olup olmadığını ortaya koymak ve böylece literatüre katkı sağlamak amacıyla bu çalışma tasarlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç ve Yöntem

Bu deneysel çalışma, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Komitesinden 06.Mayıs.2005 tarihinde onay alınarak Fizyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmaya alınan sıçanlarda deneylerin tüm aşamalarında ‘Guide for the Care and Use of Laboratory Animals’ (NIH Publication 86–23, revised 1985) kurallarına uyulmuştur.

CAPE, propolisden usulüne uygun olarak ekstrakte edildi (4). Dimetilnitrozamin, ticari ürün olarak Sigma’dan (Louis, MO) alındı. DMN ile siroz oluşturma modeli, literatürde tarif edildiği gibi tasarlandı (147).

3.1.1 Eksperimental düzenleme (Çalışma Tasarımı)

Bu çalışmada ortalama ağırlıkları 250–300 g arasında olan 60 adet Wistar-Albino erkek sıçan kullanıldı ve her grupta 10 tane sıçan olmak üzere toplam 6 gruba randomize edildi.

1. **Grup;** Bu gruptaki hayvanlar “sham” grubu olarak alındı. Haftanın ardışık 3 gününde toplam 4 hafta boyunca intraperitoneal olarak serum fizyolojik injekte edildi (saline intraperitoneal (ip) / haftanın ilk 3 günü / 4 hafta)
2. **Grup;** Bu gruptaki hayvanlara CAPE 10 µmol/kg/ip/ haftanın ilk 3 günü / 4 hafta uygulandı.
3. **Grup;** Bu gruptaki hayvanlara dimetilnitrozamin (DMN) %1’lik 10 mg/kg ip / haftanın ilk 3 günü / 4 hafta uygulandı.
4. **Grup;** Bu gruptaki hayvanlara önce CAPE 10 µmol/kg/ip/ haftanın ilk 3 günü 1 hafta verildikten sonra DMN %1’lik 10 mg/kg ip / haftanın ilk 3 günü / 4 hafta uygulandı.

5. **Grup;** Bu gruptaki hayvanlara eş zamanlı olarak CAPE 10 µmol/kg/ip ve DMN %1'lik 10 mg/kg/ip haftanın ilk 3 günü / 4 hafta uygulandı.
6. **Grup;** Bu gruptaki hayvanlara önce DMN %1'lik 10 mg/kg ip / haftanın ilk 3 günü / 4 hafta verildi, daha sonra CAPE 10 µmol/kg/ip/ haftanın ilk 3 günü 1 hafta uygulandı.

3.1.2 Hayvanlar ve Bakımı

Çalışmaya alınan hayvanlar 21 °C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık siklusü olan bir ortamda tutuldu. Hayvanların ağırlığı 250–300 g arasında olup standart sıçan yemi ile beslendi. Çalışmaya başlamadan önce yapılan muayenede sağlık durumu elverişli olmayan sıçanlar çalışmanın dışında bırakıldı. Her hayvanın kuyruğu, grubuna göre bir renkle boyandı ve çizgi sayısı ile numaralandırıldı. Çalışma sonunda hayvanlara 50 mg/kg /IP Ketamin ile anestezi sağlandı. Toraks açılarak kalpten kan örneği alındı. Alınan kanlar EDTA'lı ve kırmızı başlıklı kuru tüplere konuldu. Daha sonra tüm hayvanlar dekapitasyonla sakrifiye edilerek karaciğerleri çıkartıldı. Karaciğer doku örnekleri %10'luk nötral tamponize formalin solüsyonunda patoloji laboratuvarına teslim edildi.

3.1.3 Biyokimyasal Ölçümler

Düz tüplere konulan kan örnekleri “Hermle-Z328” santrafüj cihazı ile 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek serumlarına ayrıştırıldı. “Moduler Analyzers” (Roche/Hitachi 917) ve “SISMEX 2000i” cihazlarında analiz öncesi kalibre kontrol değerleri çalışılarak cihaz spesifitesi kontrol edildi. Biyokimyasal tetkikler “Moduler” cihazında spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Ayrıştırılan serumlar “moduler” cihazının özel “sample” kaplarına yerleştirilerek serumlarda aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), gama glutamil transpeptidaz (GGT), total bilirubin (TB), direkt bilirubin (DB), total protein (TP) ve albumin düzeylerine bakıldı. EDTA'lı tüpe alınan kan örnekleri “SISMEX 2000i” cihazının özel raklarına yerleştirilip flowcytometrik yöntemle okutularak tam kan sayımı yapıldı.

3.1.4 Karaciğerin Histopatolojik Değerlendirmesi

Karaciğer doku örnekleri %10'luk nötral formalin solüsyonu içerisinde 24 saat fikse edildikten sonra karaciğerlerden en az 3 kesit alınarak sırasıyla alkol ve ksilol solüsyonlarından geçirilip parafin içerisinde gömüldü. Parafin bloklar oluşturularak 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Hematoxylin-Eosin (H&E) ve Masson-Trikrom boyaları ile histokimyasal boyamadan sonra ışık mikroskopu ile incelendi. Preparatlar hepatolojide tecrübeli bir patolog tarafından modifiye Knodell skorlamasına göre, fibrozis düzeyi 0 ile 6 arasında olmak üzere 7 stage üzerinden kör olarak değerlendirildi (148,149,150) (Tablo 3).

Tablo 3. Modifiye Edilmiş Knodell Skorlaması

Değişiklik	Skor
Fibrozis Yok	0
Bazı portal alanlarda kısa fibroz, septumlu veya septumsuz fibroz genişleme	1
Çoğu portal alanlarda kısa fibroz, septumlu veya septumsuz fibroz genişleme	2
Çoğu portal alanlarda kısa fibroz genişleme, nadir porto-portal köprüleşme	3
Portal alanlarda belirgin köprüleşmeyle birlikte hem porto-portal hem porto-sentral köprüleşme	4
Nadir nodüllerle birlikte belirgin köprüleşme (porto-portal ve/veya porto-sentral köprüleşme) (inkomplet)	5
Diffüz fibrozis ve nodül oluşumu (Siroz)	6

3.1.5 İstatistiksel analiz

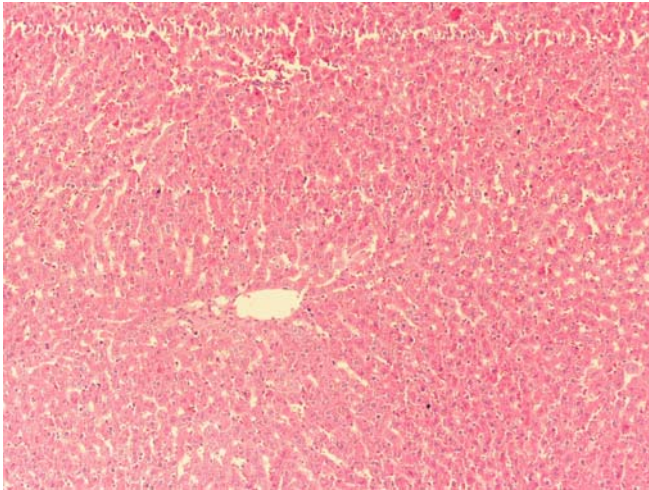
Tüm değerlendirmeler SPSS 11.0 windows software ile yapıldı. Kruskal-Wallis Testi kullanılarak gruplar çoklu olarak karşılaştırıldı. Anlamlı çıkan değerlerde, anlamlılığı oluşturan grubu bulmak için ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney-U Testi ile yapıldı. P değerinin <0.05 olması anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

4.1 Bulgular

Çalışmaya alınan toplam 60 sıçandan 7 tanesi çalışma süresini tamamlayamadan öldü. Çalışma, geriye kalan 53 sıçanla yürütüldü.

Grup-1: Çalışmaya 10 sıçanla başlandı ve 10 sıçanla tamamlandı. Çalışma sonuna dek sıçanlarda genel durumda bozulma, kilo kaybı gibi yan etkiler gözlenmedi. Çalışma sonunda patolojik incelemede normal karaciğer dokusu görüldü (Resim 1).

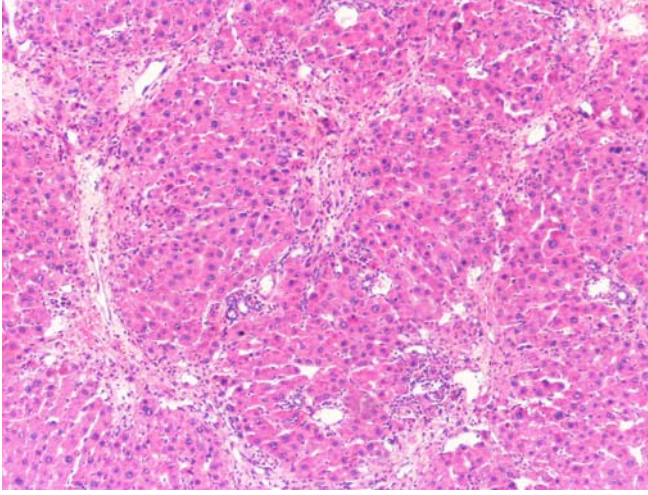


Resim 1. Serum Fizyolojik sonrası Karaciğer (X200)

Grup-2: Çalışmanın 10 sıçanla yapılması planlandı ancak 1 sıçana herhangi bir enjeksiyon yapılmadan çalışma günü kafesinde ölü bulunduğundan çalışma 9 sıçan ile yürütüldü. Çalışma sonuna dek sıçanlarda genel durumda bozulma, kilo kaybı gibi yan etkiler gözlenmedi. Çalışma sonunda patolojik incelemede normal karaciğer dokusu görüldü.

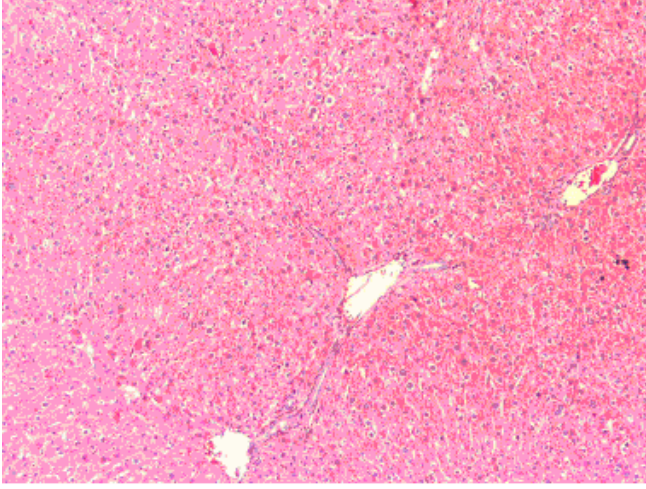
Grup-3: Çalışmaya 10 sıçanla başlandı. Çalışmanın 10. gününde 1 sıçan kafeste ölü bulundu. Karaciğerinin makroskopik olarak tamamen siyahlaştığı izlendi. Patolojik

incelemede koagülasyon nekrozunun yanı sıra fibrozisin kısmen seçilebildiği görüldü. Uygulamanın 15.gününde 1 sıçanın daha öldüğü görüldü. Bu sıçanın idrarının koyu sarı renkte geliyor olması dikkat çekti. Patolojik incelemede ilk ölen sıçanın karaciğeri gibi koagülasyon nekrozunun olduğu ancak fibrozisin daha belirginleştiği görüldü. Çalışmayı tamamlayan toplam 8 sıçanın genel durumlarının her geçen gün daha bozuluyor olması dikkat çekti ve bu sıçanların zayıfladığı ve ortalama kilosunun 187 ± 8 gram (Yaklaşık %30 kilo kaybı) olduğu görüldü. Çalışma sonunda patolojik incelemede portal çatının bozulduğu, düzensiz olarak portal-portal, portal-santral fibrozis ve sentrilobuler nekrozisin olduğu ve erken rejenerasyon nodüllerinin ortaya çıktığı izlendi (Resim 2).



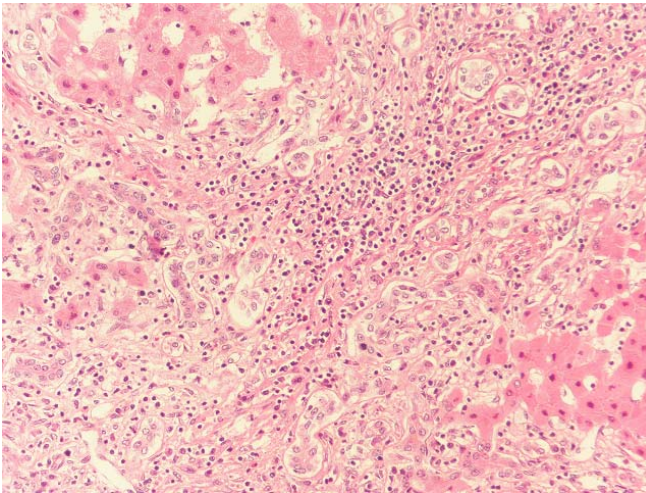
Resim 2 DMN ile oluşturulmuş sirotik karaciğer (X100)

Grup-4: Çalışmaya 10 sıçanla başlandı ve 10 sıçanla tamamlandı. Çalışma sonuna dek sıçanlarda genel durumda bozulma olmadı ancak kısmen kilo kaybı görüldü. Çalışma sonunda ortalama ağırlık 234 ± 7 gram (Yaklaşık %10 kilo kaybı) olduğu görüldü. Patolojik incelemede portal çatının bozulmadığı ve yer yer rastlanan ince düzensiz portal-portal fibrotik bantların varlığı dikkat çekti (Resim 3).



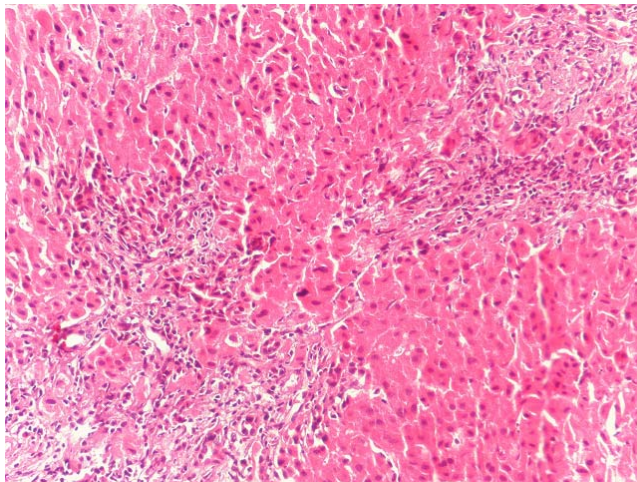
Resim 3 Önce CAPE ardından DMN uygulanan karaciğer (X100)

Grup-5: Çalışmaya 10 sıçanla başlandı. Çalışmanın 16. günü 1 sıçan kafesinde ölü bulundu. Bu sıçanın son 2 gündür koyu sarı renkli idrar çıkardığı ve genel durumunun bozulduğu görülmüştü. Patolojik incelemede portal çatinın bozulduğu, düzensiz olarak portal-portal, portal-santral fibrozisin olduğu ve erken rejenerasyon nodüllerinin ortaya çıktığı izlendi (Resim 4). Diğer 9 sıçanda genel durumda bozulma ve zayıflama dikkat çekti. Çalışma sonunda sıçanlar ortalama 185 ± 9 gram (Yaklaşık %35 kilo kaybı) olduğu görüldü.



Resim 4 CAPE ve DMN birlikte uygulanan karaciğer (X200)

Grup-6: Çalışmaya 10 sıçanla başlandı. Çalışmanın 17. günü 1 sıçan, 18. günü 2 sıçan kafesinde ölü olarak bulundu. Patolojik incelemede sıçan karaciğerlerinin portal çatısının kısmen bozulduğu, düzensiz olarak portal-portal, portal-santral hafif fibrozisin ortaya çıktığı izlendi (Resim 5). Çalışmayı tamamlayan toplam 7 sıçanın genel durumlarının her geçen gün daha bozuluyor olması dikkat çekti ve bu sıçanların zayıfladığı ve ortalama kilosunun 186 ± 5 gram (Yaklaşık %40 kilo kaybı) olduğu görüldü



Resim 5 Önce DMN ardından CAPE uygulanan karaciğer (X200)

Çalışma sonunda patolojik değerlendirme ile fibrozis miktarı yarı kantitatif olarak hesaplanan sirotik sıçanların fibrozis ortalamaları tablo ve grafik halinde aşağıda verilmiştir (Tablo 4, Grafik 1).

4.1.1 Fibrozis

Gruplar arasındaki fibrozis düzeyleri karşılaştırılmış olup Grup 1 ve Grup 2 arasında fibrozis açısından fark bulunamadı ($p=1,000$). Bu gruplarla diğer tüm gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p=0,000$). Grup 3 ile Grup 5 arasında ve Grup 4 ile Grup 6 arasında fark bulunamadı ($p>0,05$). Grup 3 ile Grup 4 arasında ve Grup 4 ile Grup 5

arasında anlamlı fark bulundu ($p=0,000$). Grup 3 ile Grup 6 arasında ve Grup 5 ile Grup 6 arasında anlamlı fark bulundu ($p=0,001$) (Tablo 4).

Tablo 4. Gruplar arasındaki fibrozis ortalamaları

Gruplar	Sayı	Fibrozis ortalamaları
Grup 1	10	0 ^Δ
Grup 2	9	0 ^Δ
Grup 3	8	5,62 ± 0,51 ^a
Grup 4	10	2,90 ± 0,31 ^b
Grup 5	9	5,22 ± 0,83 ^c
Grup 6	7	3,28 ± 0,75 ^d

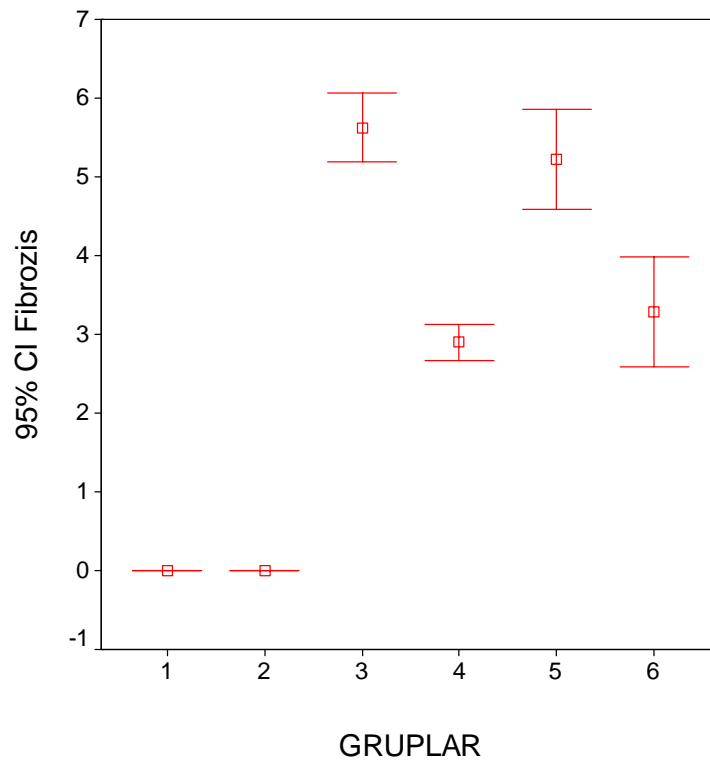
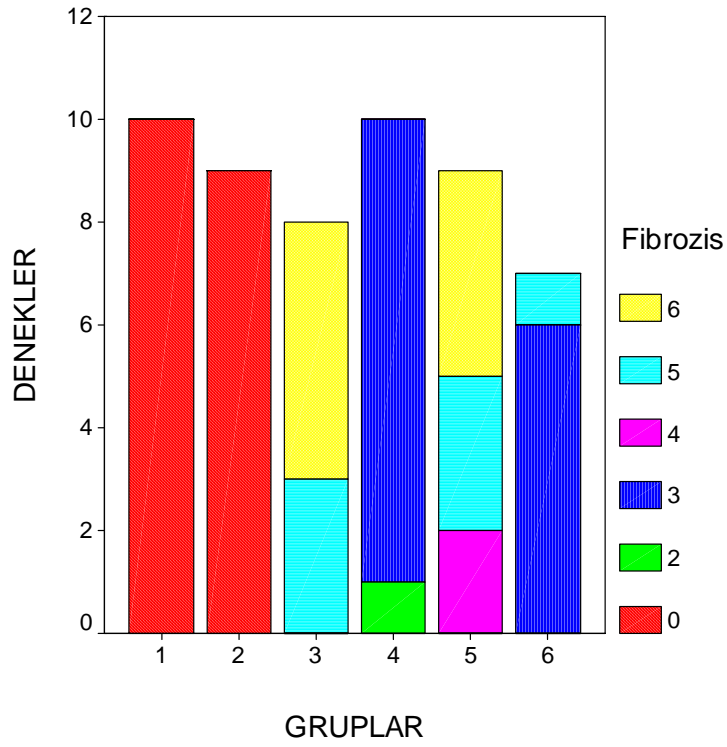
Δ; Tüm gruplarda $p= 0,000$

ac ve bd; $p>0,05$

ab ve bc; $p=0,000$

ad ve cd; $p=0,001$

Grafik 1. Gruplar arasındaki fibrozis ortalamaları



4.1.2 Biyokimyasal Değerler

Tüm grupların biyokimyasal değerlerinin ortalamaları toplu olarak Tablo 5'te gösterilmiş olup bu değerlerin istatistiksel olarak karşılaştırmaları da Tablo 6'da yer almıştır. Tablo 6'da, karşılaştırmalarda bulunan p değeri rakam olarak belirtilmiş olup karşılaştırma yapılmasına gerek olmayan gruplar için (Kruskal-Wallis Testinde $p > 0,05$ olması) sadece $p > 0,05$ ifadesi kullanılmıştır. Bu tabloya göre AST, GGT, Lökosit (WBC) ve Trombosit (PLT) düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmada anlamlı derecede farklı olmadıkları görüldü.

4.1.3 Total Protein

Tek başına CAPE uygulanan Grup 2'deki total protein (TP) miktarının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artmış olduğu bulundu ($p = 0,033$). DMN verilen tüm gruplarda TP miktarının kontrol grubuna göre azaldığı, bu azalmanın Grup 3 ve Grup 6'da anlamlı düzeyde olduğu ($p = 0,005$), Grup 4 ve Grup 5'de anlamlı düzeyde olmadığı görüldü (sırasıyla $p = 0,138$ ve $p = 0,327$). CAPE uygulamakla tüm gruplarda TP miktarının arttığı ancak bu artışın DMN grubuna göre Grup 2 ve Grup 5'de anlamlı düzeyde olduğu (sırasıyla $p = 0,004$ ve $p = 0,044$), Grup 4 ve Grup 6'da ise anlamlı düzeyde olmadığı bulundu (sırasıyla $p = 0,082$ ve $p = 0,886$).

4.1.4 Albumin

Tek başına CAPE uygulanan Grup 2'deki albumin miktarının kontrol grubuna göre azalmış olduğu ancak bu azalmanın anlamlı düzeyde olmadığı bulundu ($p = 0,145$). DMN verilen tüm gruplarda albumin miktarının kontrol grubuna göre azaldığı, bu azalmanın Grup 3-5-6'da ($p = 0,001$) ve Grup 4'de ($p = 0,000$) anlamlı olduğu bulundu. CAPE uygulamakla Grup 6 hariç tüm gruplarda albumin miktarının arttığı ancak bu artışın DMN grubuna göre Grup 2'de anlamlı olduğu ($p = 0,003$), Grup 4-5-6'da anlamlı olmadığı bulundu (sırasıyla $p = 0,210$, $p = 0,516$, $p = 0,517$).

4.1.5 Bilirubin

Tek başına CAPE uygulanan Grup 2'deki TB miktarının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmış olduğu bulundu ($p=0,000$). DMN verilen tüm gruplarda TB miktarının kontrol grubuna göre arttığı, bu artışın Grup 3-4-5-6'da anlamlı olduğu bulundu (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,004$, $p=0,002$, $p=0,038$). CAPE uygulamakla tüm gruplarda DMN grubuna göre TB miktarının azaldığı, bu azalmanın Grup 2-4-6'da anlamlı olduğu (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,006$, $p=0,017$), Grup 5'de ise anlamsız düzeyde olduğu bulundu ($p=0,337$).

Tek başına CAPE uygulanan Grup 2'deki direkt bilirubin miktarının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmış olduğu bulundu ($p=0,003$). DMN verilen Grup 3'de direkt bilirubin düzeyi artmış olmakla birlikte bu artışın anlamlı düzeyde olmadığı bulunmuştur ($p=0,343$). Diğer gruplarda artış gözlenmeyip bilakis kontrol grubuna göre azalma tespit edilmiş ve bu azalmanın Grup 2 ve 4'de anlamlı düzeyde olduğu (sırasıyla $p=0,003$ ve $p=0,005$), Grup 5 ve 6'da anlamlı düzeyde olmadığı bulunmuştur (sırasıyla $p=0,439$ ve $p=0,287$). CAPE uygulamakla Grup 2 ve 4'de DMN grubuna göre anlamlı düzeyde (sırasıyla $p=0,012$ ve $p=0,025$), Grup 5 ve 6'da anlamlı olmayan bir azalma tespit edilmiştir (sırasıyla $p=0,203$ ve $p=0,306$).

4.1.6 Alanine Aminotransferase (ALT)

Tek başına CAPE uygulanan Grup 2'deki ALT miktarının kontrol grubuna göre anlamlı olmayan düzeyde artmış olduğu bulundu ($p=0,086$). DMN verilen tüm gruplarda ALT miktarının kontrol grubuna göre arttığı, bu artışın Grup 3'de ve Grup 4-5-6'da anlamlı olduğu bulundu (sırasıyla $p=0,032$, $p=0,001$). CAPE uygulamakla ALT miktarında DMN grubuna göre Grup 2-4'de azalma (sırasıyla $p=0,239$, $p=0,922$), Grup 5-6'da artma olduğu (sırasıyla $p=0,370$, $p=0,949$) ancak bu değişimlerin anlamlı olmadığı bulundu.

4.1.7 Alkalen Fosfataz

Tek başına CAPE uygulanan Grup 2'deki alkalen fosfataz miktarının kontrol grubuna göre anlamlı olmayan düzeyde azalmış olduğu bulundu ($p=0,566$). DMN verilen tüm gruplarda alkalen fosfataz miktarının kontrol grubuna göre arttığı, bu artışın Grup 3-4-6'da anlamlı olduğu (sırasıyla $p=0,002$, $p=0,016$, $p=0,001$), Grup 5'de ise

anlamli düzeyde olmadigi bulundu ($p=0,769$). CAPE uygulamakla tum gruplarda alkalin fosfataz miktarinin DMN grubuna gore azaldisi, bu azalmanin Grup 2-4-5'de anlamli düzeyde olduğu (sirasıyla $p=0,002$, $p=0,025$, $p=0,022$), Grup 6'da ise anlamli düzeyde olmadigi bulundu ($p=1,000$).

4.1.8 Hemoglobin

Tek basina CAPE uygulanan Grup 2'deki hemoglobin (Hb) miktarinin kontrol grubuna gore anlamli olmayan düzeyde azalmis olduğu bulundu ($p=0,539$). DMN verilen tum gruplarda Hb miktarinin kontrol grubuna gore azaldisi, bu azalmanin Grup 3-4-5-6'da anlamli olduğu (sirasıyla $p=0,019$, $p=0,002$, $p=0,001$, $p=0,001$) bulundu. CAPE uygulamakla DMN grubuna gore Grup 2'de anlamli düzeyde ($p= 0,05$), Grup 4-5-6'da anlamli olmayan değişiklikler izlendi (sirasıyla $p=0,464$, $p=0,655$, $p=0,565$).

4.1.9 Gruplar Arasında İstatistiksel Olarak Fark Görülmeyen Biyokimyasal Değerler

Serum aspartate aminotransferase (AST), gamaglutamil transpeptidaz (GGT), Lökosit (WBC) ve Trombosit (PLT) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamli değişiklikler olmadı (Tablo 6).

Tablo 5. Tüm grupların biyokimyasal değerlerin ortalamaları

Laboratuvar	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6
Total Protein g/dl	6,96 ± 0,32	7,32 ± 0,47	5,81 ± 1,02	6,65 ± 0,46	6,84 ± 0,40	5,91 ± 0,71
Albumin g/dl	3,39 ± 0,09	3,27 ± 0,34	2,28 ± 0,54	2,61 ± 0,47	2,48 ± 0,44	2,17 ± 0,37
Total Bilirubin mg/dl	0,08 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,42 ± 0,27	0,14 ± 0,05	0,31 ± 0,23	0,15 ± 0,33
Direkt Bilirubin mg/dl	0,033 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,10 ± 0,10	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,04	0,03 ± 0,05
AST U/L	136,2 ± 32,28	168,11 ± 79,01	203,00 ± 106,02	144,20 ± 42,32	227,42 ± 127,02	256,28 ± 312,83
ALT U/L	57,80 ± 9,10	82,88 ± 38,59	101,14 ± 54,84	94,30 ± 22,07	126,57 ± 27,95	135,85 ± 131,86
ALP U/L	10,40 ± 9,00	7,77 ± 6,96	141,16 ± 136,39	28,77 ± 18,18	46,28 ± 104,06	138,14 ± 111,13
GGT U/L	4,30 ± 9,74	1,22 ± 0,66	3,83 ± 2,13	2,11 ± 1,05	2,85 ± 2,85	2,57 ± 4,15
WBC mm ³ /dl	9680,50 ± 4290,95	9140 ± 5581,89	11354,29 ± 4945,04	10990,00 ± 5067,27	10891 ± 6876,07	9284,28 ± 6332,44
Hb g/dl	14,72 ± 0,55	14,12 ± 1,46	10,88 ± 4,22	12,74 ± 1,65	11,11 ± 2,87	10,74 ± 2,61
Trombosit mm ³ /dl	788900 ± 362072,87	580888 ± 479551,20	382571,4 ± 246324,89	837400,00 ± 455188,89	583285,71 ± 415957,41	783571,42 ± 543732,42

Tablo 6 Tüm grupların biyokimyasal değerlerinin karşılaştırmaları

Gruplar	T.Prot. p değeri	Album p değeri	T.Bil p değeri	D.Bil p değeri	AST p değeri	ALT p değeri	ALP p değeri	GGT p değeri	WBC p değeri	Hb p değeri	Tromb. p değeri
1-2	0,033	0,145	0,000	0,003	p>0,05	0,086	0,566	p>0,05	p>0,05	0,539	p>0,05
1-3	0,005	0,001	0,001	0,343	p>0,05	0,032	0,002	p>0,05	p>0,05	0,019	p>0,05
1-4	0,138	0,000	0,004	0,005	p>0,05	0,001	0,016	p>0,05	p>0,05	0,002	p>0,05
1-5	0,327	0,001	0,002	0,439	p>0,05	0,001	0,769	p>0,05	p>0,05	0,001	p>0,05
1-6	0,005	0,001	0,038	0,287	p>0,05	0,001	0,001	p>0,05	p>0,05	0,001	p>0,05
2-3	0,004	0,003	0,001	0,012	p>0,05	0,289	0,002	p>0,05	p>0,05	0,050	p>0,05
2-4	0,006	0,007	0,000	0,343	p>0,05	0,102	0,003	p>0,05	p>0,05	0,072	p>0,05
2-5	0,071	0,004	0,001	0,098	p>0,05	0,030	0,489	p>0,05	p>0,05	0,023	p>0,05
2-6	0,002	0,001	0,481	0,036	p>0,05	0,184	0,001	p>0,05	p>0,05	0,011	p>0,05
3-4	0,082	0,210	0,006	0,025	p>0,05	0,922	0,025	p>0,05	p>0,05	0,464	p>0,05
3-5	0,044	0,516	0,337	0,203	p>0,05	0,370	0,022	p>0,05	p>0,05	0,655	p>0,05
3-6	0,886	0,517	0,017	0,306	p>0,05	0,949	1,000	p>0,05	p>0,05	0,565	p>0,05
4-5	0,405	0,557	0,079	0,271	p>0,05	0,032	0,044	p>0,05	p>0,05	0,221	p>0,05
4-6	0,035	0,049	0,019	0,101	p>0,05	0,696	0,003	p>0,05	p>0,05	0,107	p>0,05
5-6	0,040	0,139	0,025	0,710	p>0,05	0,063	0,018	p>0,05	p>0,05	0,609	p>0,05

TARTIŞMA

Fibrozis gelişiminde en çok suçlanan hücre, disse mesafesinde yerleşmiş olan Stellate hücreleridir (Şekil 1). Bu nedenle HSH'ler KC fibrozis tedavisinde ana hedeflerdir. HSH'yi inhibe ederek fibrozisin gerilemesini sağlayan çeşitli tedavi modaliteleri vardır, bunlar arasında; TGF β inhibisyonu, Endotelin aktivitesinin inhibisyonu, Pentoksifilin, Halofuginon, Fumagillin ve analogu olan TNP-470, Angiotensin converting enzyme inhibitörleri (ACE) sayılabilir (28). Antifibrotik tedavi yaklaşımları içerisinde en kapsamlı araştırılan grup TGF β inhibisyonu yapan tedavi modaliteleridir. Çünkü birçok araştırmada TGF β vasıtasıyla HSH'nin aktive olduğu ve bu stimülasyonla Tip I kollajen sentezlendiği gösterilmiştir (68). Kültürde aktive edilmiş HSH'ler tarafından Tip I kollajeni stimüle eden diğer faktörler retinoidler, anjiotensin II, interlökin 1b, TNF ve asetaldehitten oluşmaktadır (66). Fakat bunlardan hiç birisi TGF β -1 kadar güçlü değildir. TGF β -1 hydrogen peroxide ve C/EBP β bağımlı mekanizma vasıtasıyla HSH'de kollajeni stümüle eder (68). Bu sitokinin aktivasyonu reseptör düzeyinde anti-TGF β antikoları veya proteoglikan decorin gibi TGF β 'ya bağlanan ya da soluble- TGF β reseptörü ve dominant-negatif reseptör gibi yarışmalı olan reseptör antagonistleri ile bloke edilebilir. Yarışmacı reseptör antagonistlerinin KC hasarının başlangıcında ve kronik KC hastalığı esnasındaki uygulamalarının etkili olduğu bildirilmiştir (95,96). Bununla birlikte TGF β 'yı hedef alan tedavilerin başarısını tartışmalı bulan yazarlar da vardır, buna delil olarak; TGF β 'nın birçok hücre için antiproliferatif olması ve TGF β 'in disregülasyonu ile bazı kolon kanserleri ve epitelyal neoplazmların ortaya çıkması gösterilmektedir (28).

HSH'yi inhibe eden doğal antifibrotikler de vardır. Deneysel fibrozis modellerinde bu ürünlerin etkinlikleri in vivo olarak gösterilmiştir. Bunlar arasında deve dikeninden elde edilmiş "silymarin" ve aktif maddesi glycyrrhizin, glycyrrhetic acid, baicalin ve baicalein'den oluşan "sho-saiko" sayılabilir. Bunlar kültür ortamında HSH'yi direkt olarak bloke edebilmektedirler (110,151). Ayrıca "histone deacetylase"ı

bloke eden “Streptomyces fungus”unun bir ürünü olan “Trichostatin A”, herhangi bir toksisiteye yol açmadan HSH’yi inhibe edebilmektedir (152).

Son yıllarda deneysel hayvan modellerinde HSH’yi inhibe ederek fibrozisi durdurmayı amaçlayan doğal maddeler arasında fenolik bir bileşik olan “Caffeic acid phenethyl ester” (CAPE) de bildirilmektedir (142). CAPE, bal arısının bir ürünü olan propolisin aktif maddesi olarak bilinmektedir ve etkinliği antimitojenik, antikarsinojenik, antiinflamatuvar, immunomodulator ve antioksidan olarak bilinmektedir (4,138). Antioksidan fenolik bileşikler temel olarak inositol fosfat metabolizmasını, tirozin ve protein kinaz aktivasyonunu süprese ederek proliferasyon ve kollajen sentezini azaltır (146,153). CAPE’e atfedilmiş birçok aktivitenin moleküler bir temeli tanımlanmamasına rağmen, CAPE’in inhibe ettiği aktivitelerin birçoğunda NF- κ B’nin aktivasyonu gerekmektedir. Fibrozis sürecinde aktive olan NF- κ B bir yandan HSH proliferasyonuna yol açarken bir yandan da HSH’nin apoptozunu engellemektedir (Şekil 4). CAPE doğrudan doğruya HSH’yi inhibe ettiği gibi NF- κ B ’yı inhibe ederek hem HSH’nin proliferasyonunu durdurmakta hem de apoptozisini sağlamaktadır (143).

Kanatlılardan memelilere dek dizilmiş çeşitli organizmalarda transkripsiyon faktör NF- κ B ailesinin üyeleri tanımlanmıştır. Bunlar birçok cevapta esas rol oynayıp gen ekspresyonunun hızlı indüksiyonu ile konakçı savunmasına yol açar. Özellikle çeşitli inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu, major histokompatibilite kompleks genlerini ve tümör metastazlarında olan adezyon moleküllerini kontrol eder. Diğer transkripsiyon faktörlerinden farklı olarak NF- κ B proteinleri, I κ B-alfa adındaki bir inhibitör subünit tarafından inaktif bir şekilde stoplazmada tutulur. I κ B’nin fosforilasyonu ve onun daha sonraki degradasyonu NF- κ B’nin nükleusa translokasyonuna izin vermektedir. Bu aktivasyon, inflamatuvar sitokinler (yani tumor necrosis factor (TNF), lymphotoxin, ve interleukin 1), mitojenler, bakteriyel ürünler, protein sentez inhibitörleri, oksidatif stress (H₂O₂), ultraviyole ışığı ve phorbol esterler gibi bir çok ajan tarafından indüklenir (137,154).

NF- κ B’nin aktivasyonunu downmodulate yapabilen ajanlar terapötik müdahaleler için bir potansiyele sahiptir. İnsan histiyositik hücre dizilerinde (The human histiocytic cell line U937 cells) yapılmış bir çalışmada CAPE’in doza ve uygulama süresine bağımlı olarak NF- κ B’yi yüksek oranda inhibe ettiği gösterilmiştir

(5). CAPE, düşük dozlarda HSH'lerin proliferasyonunu ve kollajen sentezini inhibe ederken, yüksek dozlarda HSH'lerin apoptozunu indüklemektedir (143).

Serbest oksijen radikallerinin (SOR) (süperoksit ve hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit vs) hücre solunumu sırasında elektron transport sistemini bozduğu, membran lipid peroksidasyonuna neden olduğu, sülfidril enzim inaktivasyonu yaptığı, protein çapraz bağları ve DNA kırıkları oluşturarak hücreye hasar verdiği bilinmektedir. SOR'nin kaynağı hasarlı KC hücrelerinden ziyade nötrofiller olması nedeniyle KC dokusu daha da hasar görebilir (155). Bu moleküller normal olarak antioksidan sistem tarafından etkisiz hale getirilir. Ancak SOR'nin artması ya da antioksidan sistemlerin bunlarla baş edememesi sonucu hücre hasar görür. Literatürde SOR'ni arttırarak CAPE'in antioksidan etkisi deneysel modellerde araştırılmıştır (156,157). Farmakolojik olarak güvenli olduğu gösterilmiş bir bileşik olan CAPE'in, lipid peroksidasyonunu suprese ettiği, buna karşılık antioksidan moleküller olan "catalase", "total glutathion" ve "superoxide dismutase" enzimlerinin seviyelerini artırdığı gösterilmiştir (156). Böylece CAPE'in SOR temizleyicisi olduğu ve hücreyi koruyucu etkisi olduğu söylenebilir.

Nitrozaminler çevresel kimyasallar sınıfından olup çevrede çeşitli endüstriyel kaynaklarda bulunurlar (örneğin sigara dumanı) ve birçok dokuda makromolekülleri alkilerler. DMN, nitrozamin sınıfının potent bir üyesi olup hepatotoksik ve karsinojenik potansiyele sahiptir. KC, DMN metabolizması ve toksisitesi için birincil hedef olup böbrek, akciğer ve özofagus ikincil hedefler arasındadır (158). DMN sadece reaktif metabolitler yoluyla hepatosite direkt toksik etki yapmakla sınırlı kalmayıp aynı zamanda "cytolytic" ve SOR veya membran lipid peroksidanları gibi proinflatuar ajanlar üreterek de KC'e hasar verir (158). Bu nedenle antioksidan kapasiteye sahip CAPE'in, DMN'ye bağlı KC hasarına olumlu etkilerinin olması beklenebilir.

Sıçanlarda fibrozis modeli oluşturmak için DMN, "Carbon tetrachloride" (CCl₄), Cisplatin ve sigara dumanı gibi çeşitli hepatotoksik ajanlar kullanılmaktadır (9,155,157,159). Düşük doz dimethylnitrosamine (DMN) ile fibrozis oluşturma modeli literatürde açık olarak gösterilmiştir (147,160). DMN uygulamasının 4. haftasında, hızlı septa formasyonlu santral nekroz ve mikronodüler siroz yapması nedeniyle, DMN siroz modeli oluşturmada sıklıkla kullanılmaktadır (159).

DMN uygulanan model deney hayvanlarında yapılan bir çalışmada DMN uygulamasını takip eden 1. haftada HSH'lerin S-faz oranlarında pik olduğu

gözlenmiştir. Bu çalışma DMN'ye bağlı karaciğer hasarında 1. haftada HSH proliferasyonunun hayli fazla olduğunu düşündürmüştür. Aynı çalışmada proliferen olan HSH'lerin 4 hafta zarfında matriks üreten myofibroblastlara dönüştüğü ve karaciğer fibrozisine neden olduğu ifade edilmektedir (159,161). Çalışmamızda, kısa süreli düşük doz uygulamış olduğumuz DMN ile dördüncü haftada karaciğerde fibrozis, septal oluşumlar ve regenerasyon nodülleri görülerek örnek model elde edilmiştir.

Bu çalışmada DMN ile deneysel fibrozis oluşturulmuş sıçanlara DMN öncesinde (Grup 4) ve DMN sonrasında (Grup 6) CAPE uygulanarak, CAPE'in (Grup 4)'de fibrozisi anlamlı düzeyde önlediği, (Grup 6)'da da anlamlı düzeyde geriletmediği tespit edilmiştir. Ancak CAPE ve DMN'nin birlikte verildiği (Grup 5) hayvanlarında fibrozis gelişiminde herhangi bir gerileme olmadığı saptanmıştır. Bu durum, CAPE'in, hepatotoksik bir ajan olan DMN ile eş zamanlı kullanılmadığı zaman fibrozisi önlemede ve oluşmuş fibrozisi geriletmede başarılı olduğu sonucuna götürmektedir. Birlikte uygulandığında neden fibrozise etkisinin az olduğu sorusunun yanıtı ise CAPE'in DMN ile aynı ortamda (intraperitoneal) etkileşimi sonucu bozunması ya da DMN'nin CAPE emilimini bozarak toksik etkinin koruyucu etkiden önde gelmesi şeklinde speküle edilebilir.

Karaciğer fibrozisi kronik karaciğer hastalıklarının sınıflandırılmasında, tanı ve evrelemede ana histolojik parametredir. Bununla birlikte hem deneysel modellerde hem de klinik çalışmalarda karaciğerin patolojik tetkikinde fibroz dokunun kantitatif olarak kesin miktarı oldukça önem arz etmektedir. Kollajen içeriğinin saptanmasında "colorimetric" değerlendirmeler, dijital olarak fibrozis miktarını belirleyen tamamen bilgisayarlı "Photoshop software" programı ile çalışan metodlar ve "High Performance Liquid Chromatography" analiz sistemi ile perkütan biyopside alınan KC dokusunda fibrozis oranları büyük oranda doğruluk yüzdeleriyle bakılabilir (159,162). fibrozis düzeyini tespit etmede yarı kantitatif skor sistemleri hala güvenle kullanılmaktadır (148,163,164). Hangi metodun daha kullanışlı ve güvenilir olduğuna dair ulaşılmış bir fikir birliği henüz mevcut değildir (164).

Fibrozis düzeyini tespit etmede birçok histolojik sınıflandırma önerisi yapılmış olup bu konuda bir standart getirilmesine ve belirsizliğin minimize edilmesine çalışılmıştır. Bunlar arasında kalitatif yöntemler de olmakla beraber istatistiksel analize daha uyumlu olduğundan sıklıkla kantitatif sistemler kullanılmaktadır (165). Kantitatif

sistemler arasında Metavir ve İshak sistemleri sıklıkla kullanılmaktadır ancak en sık kullanılanı “Knodell score”dur. (148). Patologların kendi aralarında ve kendi içlerinde yapılan (inter-and intraobserver reliability) fibrozis güvenilirlik testlerinde kullanılan yöntem olan Metavir sistem ile Knodell sisteminin arasında fark olmadığı bulunmuştur (166).

Fibroz dokunun kantitatif olarak değerlendirilmesi patologların kendi aralarında ve kendi içlerinde yapılan güvenilirlik testlerinde farklı sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilir (167). Knodell sisteminin kullanılmasını sınırlayan bu durum daha çok hepatit aktivite indeksi hesaplanırken olur. Knodell’in orijinal tanımında HAI skorunun standart sapması 2.4 olarak belirtilmiştir. Bu yönüyle, 2.4’ün altındaki değişikliklerin histolojik paternde gerçek bir farklılık olarak yansıtılmaması gerekirken bu durum klinik çalışmaları bağlamayıp 1 puanlık oynamalar dahi istatistiksel olarak anlamlı bulunabilmektedir. Burada patologlar arasındaki korelasyon da düşüktür. Mükemmel korelasyon katsayısı 1 kabul edilirse, kapa katsayısı 0,25 ile 0,46 arasında olup patalogların birbirleri ile uyumlu sonuçları vermesi adına Knodell’in başarısı düşüktür denebilir (166). Ancak bu çalışma Hepatit C’li hastalar üzerinde yapılmıştır ve Knodell sisteminin hepatit C’li hastalarda zaten eksikliğinin bulunduğu bilinmektedir. Çünkü Hepatit C’li bir hastada Knodell sistemine göre HAI hesaplanırken sıklıkla gözlenen lenfoid agregatlar, safra kanal hasarı ve makroveziküler yağlanma dikkate alınmaz (168). Bu nedenle Hepatit C’li hastaların HAI patalogdan pataloga farklı rakamları yansıtır. Bunun yanı sıra Knodell’in fibrozis skoru yaklaşık 0.80’lik bir kapa katsayısı ile iyi bir güvenilirliğe sahiptir (169). Bu nedenle aynı preparatı değerlendiren patologlar arasında benzer sonuçlar bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda fibrozis skoru hesaplanırken modifiye Knodell kullanıldı ve hepatolojide tecrübeli bir patalog tarafından 6 puan üzerinden değerlendirildi.

Karaciğer fibrozisinin patofizyolojisi hakkında son 20 yıldır artan hücresel ve moleküler bilgiler sayesinde fibrozisin eskiden bilindiğinin aksine irreversibl olmadığı, ekstraselüler matriks ve skar doku birikiminin statik değil dinamik ve regüle edilebilen bir süreç olduğu anlaşılmıştır. Fibrozisin hatta aşikâr sirozun tedavi ile gerilediğine dair ciddi kanıtlar mevcuttur (3). Buna, alkolik sirozlarda alkolün bırakılması, otoimmün hepatitlerde immünsüpresif tedavi kullanılması, hemokromatoziste flebotomi yapılması, Hepatit B’de lamivudin, Hepatit C’de ve Hepatit D’de interferon kullanılması, primer

biliyer sirozda ursodeoksikolik asid ve metotreksat kullanılması ile aşikâr sirozun gerileyebildiği örnekleri sayılabilir (3). Hatta kronik pankreatit ve koledok stenozu nedeniyle karaciğer sirozu olan hastalarda biliyer drenaj ile fibrozisin gerilediği gösterilmiştir (170). Çalışmamızda bir ay DMN verildikten sonra CAPE uygulanan Grup 6 sıçanlardaki fibrozis düzeyinin DMN grubundan anlamlı düzeyde düşük bulunmuş olması, oluşmuş erken evre fibrozisi geriletmesi anlamında CAPE’i umut verici kılmaktadır.

Henüz hakkındaki şüpheler tam olarak giderilememiş olsa da genellikle erken sirozun (reversibl dönem) gerileyebildiğine, buna karşılık ilerlemiş sirozun (irreversibl dönem) gerilemediğine inanılmaktadır. Gerçekten de carbon tetrachloride ile yapılan bir çalışmada, fibrozis oluşturan maddeye olan maruziyet süresi uzadıkça fibrozis düzeyinin arttığı, maruziyet erken kesilirse oluşan fibrozisin spontan olarak gerilediği ve maruziyet süresinin uzamasının doğrudan doğruya regresyonu da geciktirdiği gösterilmiştir (171). Maruziyet 20 haftayı geçtiğinde siroz artık oturmuş olduğundan geri dönüşüm söz konusu olmazken bu süre 14 hafta ile sınırlı olduğunda, 3 ay gibi bir sürede siroz tamamen ortadan kalkmaktadır. Bu bilgiye dayanarak; fibrozis veya sirozun geri dönüşümsüzlüğü tamamen süreye bağlıdır denebilir. Bunun nedeni kronik maruziyette matriks proteinazların azalmış ekspresyonları veya zaman aşımının kollajenin degradasyonuna direnç oluşturan kollajen fibrillerin çapraz bağları ile izah edilmektedir (83,84). Fibrozisin uzun süreden beri mi yoksa yakın zamanlarda mı birikmeye başladığını ayıran bir test çok faydalı olabilirdi ancak maalesef henüz böyle bir test mevcut değildir. Bizim çalışmamızda, siroz oluşturulduktan sonra hiç tedavi (CAPE) verilmeden spontan regresyona bırakılan bir grup oluşturulmadı ve siroz oluştuktan sonra (DMN grubu) ileri dönem siroz olması için uzun süre beklenip daha sonra CAPE uygulanan ve böylece CAPE’in erken ve geç sirozdaki bulguları değerlendirilmedi. Bu nedenle CAPE’in başarısı erken dönem sirozlarda söz konusudur denebilir. İlacın geç dönemdeki başarısını da görmek için başka çalışmalara gereksinim vardır.

Karaciğer sirozunda hastalığın evresine ve etyolojisine ve sirozun aktif olup olmamasına göre biyokimyasal parametreler değişiklikler gösterir. Bilirubin, ALT, AST, ALP, GGT normal veya yükselmiş olabilir. Karaciğerin sentez fonksiyonlarını gösteren diğer bir parametre olan Albümin azalmıştır. Bunun yanısıra portal

hipertansiyon nedeniyle oluşan splenomegali ve hipersplenizm sonucunda lökopeni ve trombositopeni oluşabilir. Son yıllarda AST/ALT oranının artması da siroz oluşumunun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (172). Literatürde alkolle indüklenen KC hasarına CAPE'in oldukça olumlu etkisinin olduğu, KC enzimlerini ve bilirubinleri neredeyse normale döndürdüğü ifade edilmektedir (173). Bizim çalışmamızda AST, ALT ve TB düzeyi DMN verilen tüm gruplarda artmış olup (artış AST için istatistiksel olarak anlamsız ALT için anlamlı), CAPE uygulaması ile AST ve ALT'deki artışın önlenemediği, TB düzeyinde ise bu artışların azaldığı, özellikle CAPE'in DMN'den önce ya da sonra verilmesinin TB üzerinde olumlu etki sağladığı tespit edildi. Bu bağlamda sadece CAPE uygulanan grup 2 deki sıçanların TB düzeyinin de kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunması CAPE'in bilirubin birikimine engel teşkil ettiği yönünde bir spekülasyonu akla getirmektedir.

Çalışmamızda DMN verilince TP miktarı düşmekte ancak CAPE ile birlikte DMN verilince TP miktarındaki düşüş önlenmekteydi. Zaten sadece CAPE verilen grupta da kontrol grubuna göre TP miktarının anlamlı düzeyde yüksek bulunması CAPE'in protein düşmesini önleyici etkisinin yanı sıra yapımına da katkı sağladığını akla getirmektedir (CAPE'in immünomodülatör etkisinin olması). Fakat CAPE'in DMN'den önce ya da sonra verildiği gruplarda TP miktarındaki düşmenin neden önlenemediği ise yoruma açık bırakılmıştır. Bununla birlikte CAPE'in TP'deki bu olumlu etkisi muhtemelen albumin sentezini artırması ile değil globulin sentezini artırması yönünde olabilir, zira CAPE uygulamakla DMN verilen diğer gruplardaki Albumin düşüşleri önlenememiştir. Albumin seviyelerindeki düşmenin aynı zamanda albuminin negatif akut faz reaktanı olması nedeniyle de olabileceği düşünüldü.

Çalışmamızda, sıçanlara DMN uygulandıktan sonra Hb düzeylerinde azalma olduğu görüldü. Çalışma süresince hiçbir denekte hematemez ya da melena gözlenmediğinden anemi sebebi olarak gastrointestinal kanama düşünülmedi. Sıçanlardan kan alırken teknik bir hata nedeniyle kanlar hemolize uğramış olsaydı bu durum düz tüp örneklerinin santrifüjü sonucu elde edilen serumlarda gözle görülebilirdi, ancak böyle bir durum söz konusu olmadı. İntravasküler hemolizin dolaylı göstergeleri olan indirekt bilirubin ve AST seviyesinde tanı koydurucu değişiklikler gözlenmediğinden hemoliz ihtimalinden uzaklaşıldı. Bu bağlamda serum Laktat Dehidrogenaz (LDH) düzeylerine bakılmış olsaydı intravasküler hemoliz yönünden daha anlamlı yorumlar yapılabilirdi

ancak çalışmamızda serum LDH düzeyine bakılmadı. En son olarak Hb düzeyindeki düşmenin bizzat siroz gelişimi ile ilişkilendirilebileceği fikri ağırlıklı olarak düşünüldü. Zira KC vücutta eritropoetin üreten ikinci derecede önemli bir organdır ve ağır KC hastalıklarında aneminin bu nedenle sık olarak görüldüğü bilinmektedir (174). Çalışmamızda CAPE'in Hb düzeyindeki bu azalmayı önleyemediği görülmüştür.

Sonuç olarak DMN belirgin fibrozis oluşturan hepatotoksik bir ajandır. CAPE, etki mekanizması tam olarak ortaya konamamış olsa da fibrozisi önleyen ve oluşmuş fibrozisi geriletan doğal bir üründür. Bu çalışmayla, CAPE'in insanlarda da benzer mekanizmalarla siroz tedavisinde kullanılabileceği ümidi doğmaktadır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Karaciğer fibrozisinin nasıl oluştuğu henüz tam olarak bilinmemektedir. Çeşitli hepatotoksik ajanlar kullanılarak deneysel olarak fibrozis oluşturulmakta ve bu oluşturulan model üzerinde tedaviye dair çeşitli ilaçlar denenmektedir. Yaptığımız çalışma ile dimethylnitrosamine (DMN)'in siroz oluşturmada başarılı bir ajan olduğunu gördük. Çalışmamızda, kısa süreli düşük doz uygulamış olduğumuz DMN ile dördüncü haftada karaciğerde fibrozis, septal oluşumlar ve regenerasyon nodülleri görülerek örnek model elde edilmiştir.

CAPE'in bugüne kadar antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antioksidan ve antitümöral etkisi olduğuna dair birçok yayın bulunmaktadır. Ancak antifibrotik etkileri hakkında sınırlı sayıda yazı mevcuttur. Bu çalışma ile CAPE'in karaciğerde antifibrotik etkilerinin olduğu bir kez daha vurgulanmış olup, DMN ile intraperitoneal olarak eş zamanlı verilmediği sürece fibrozis oluşumunu engellediği ve oluşmuş fibrozisi de geriletebildiği görülmüştür.

DMN uygulanan gruplarda AST ve ALT düzeylerinin arttığı ancak CAPE'in bu artışı önleyemediği bulundu. Bununla birlikte DMN uygulanan gruplarda TB seviyelerindeki artışa özellikle CAPE'in DMN'den önce ya da sonra verilmesinin olumlu etki sağladığı tespit edildi. Bu durum, CAPE'in bilirubin birikimine engel teşkil edebileceği sorusunu akla getirdi.

DMN verilen gruplarda TP miktarının düştüğü ancak CAPE ile birlikte DMN verilince TP miktarındaki düşüşün önlendiği görüldü. Sadece CAPE verilen grupta kontrol grubuna göre TP miktarının anlamlı düzeyde yüksek bulunması CAPE'in protein düşmesini önleyici etkisinin yanı sıra bilinen immünomodülatör etkisiyle globulin yapımına da katkı sağladığını düşündürdü. Fakat CAPE'in DMN'den önce ya da sonra verildiği gruplarda TP miktarındaki düşmenin neden önlenemediği sorusu ise yoruma açık bırakıldı.

CAPE uygulamakla DMN verilen gruplarda Albumin seviyelerindeki düşmenin önlenemediği görüldü. Albumin seviyelerindeki düşme siroz gelişimi nedeniyle olabileceği gibi albuminin negatif akut faz reaktanı olmasının da buna katkı sağlamış olabileceği düşünüldü.

DMN uygulandıktan sonra Hb düzeylerinde azalma olduğu görüldü. Hb seviyesindeki düşmenin bizzat siroz gelişimi nedeni ile KC'in eritropoetin üretemeyişine bağlandı. CAPE'in Hb düzeyindeki bu azalmayı önleyemediği görüldü.

Bu çalışmada, siroz oluşturulduktan sonra hiç tedavi (CAPE) verilmeden spontan regresyona bırakılan bir grup oluşturulmadı ve siroz oluştuktan sonra (DMN grubu) ileri dönem siroz olması için uzun süre beklenip daha sonra CAPE uygulanan ve böylece CAPE'in erken ve geç sirozdaki bulguları değerlendirilmedi. Bu nedenle çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar CAPE'in erken dönem sirozlarda başarılı olacağı yönündedir. İlacın geç dönemdeki başarısını da görmek için başka çalışmalara gereksinim vardır.

Sonuç olarak DMN belirgin fibrozis oluşturan hepatotoksik bir ajandır. CAPE, etki mekanizması tam olarak ortaya konamamış olsa da fibrozisi önleyen ve oluşmuş fibrozisi geriletken doğal bir üründür. Bu çalışmayla, CAPE'in insanlarda da benzer mekanizmalarla siroz tedavisinde kullanılabileceği ümidi doğmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Poynard T, Mathurin P, Lai CL, Guyader D, Poupon R, Tainturier MH et al Capron F; Chedid A; Bedossa P. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2003 Mar;38(3):257-265.
2. Ismail MG, Stieger B, Cattori V, Hagenbuch B, Fried M, Meier PJ et al. Hepatic uptake of cholecystinin octapeptide by organic anion-transporting polypeptides OATP4 and OATP8 of rat and human liver. *Gastroenterology* 2001 Nov;121(5):1185-1190
3. Bonis, PA, Friedman, SL, Kaplan, MM. Is liver fibrosis reversible? *N Engl J Med* 2001; 344:452-454
4. Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, et al. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*. 1988 mar 15;44(3):230-232
5. Natarajan K, Singh S, Burke TR Jr, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 20;93(17):9090-9095.
6. Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett* 1993;329:21-4

7. Son S, Lewis BA. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *J Agric Food Chem* 2002;50:468–472
8. Demirdag K, Bakcecioglu IH, Ozercan IH, Ozden M, Yilmaz S, Kalkan A. Role of L-carnitine in the prevention of acute liver damage induced by carbon tetrachloride in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:333–338
9. Kus I, Colakoglu N, Pekmez H, Seckin D, Ogeturk M, Sarsilmaz M. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Acta Histochem.* 2004;106(4):289-297
10. Mahran LG, El-Khatib AS, Agha AM, Khayyal MT. The protective effect of aqueous propolis extract on isolated rat hepatocytes against carbon tetrachloride toxicity. *Drugs Exp Clin Res* 1996;22:309–316
11. Merino N, Gonzales R, Gonzalez A, Ramirez D. Histopathological evaluation on the effect of red propolis on liver damage induced by CCl₄ in rats. *Arch Med Res* 1996;27:285–289
12. Sharma M, Pillai KK, Husain SZ, Giri DK. Protective role of propolis against alcohol-carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Indian J Pharmacol* 1997;29: 76–81
13. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001 Aug;21(3):351-372
14. Kim TH, Mars WM, Stolz DB, Petersen BE, Michalopoulos GK. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology.* 1997 Oct;26(4):896-904

15. Miyazaki H, Van Eyken P, Roskams T, De Vos R, Desmet VJ. Transient expression of tenascin in experimentally induced cholestatic fibrosis in rat liver: an immunohistochemical study. *J Hepatol.* 1993 Nov;19(3):353-366
16. Terada T, Nakanuma Y. Expression of tenascin, type IV collagen and laminin during human intrahepatic bile duct development and in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology.* 1994 Aug;25(2):143-150
17. Rojkind, M, Giambrone, MA, Biempica, L. Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology* 1979; 76:710
18. Gressner, AM. The cell biology of liver fibrogenesis - an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell Tissue Res* 1998; 292:447-452
19. McGuire, RF, Bissell, DM, Boyles, J, Roll, FJ. Role of extracellular matrix in regulating fenestrations of sinusoidal endothelial cells isolated from normal rat liver. *Hepatology* 1992; 15:989-997
20. Yükselen V. Karaciğer Fibrozis: tanım ve etioloji. *Türkiye Klinikleri, Dahili Tıp Bilimleri Gastroenterohepatoloji* 2005; Karaciğer Fibrozisi Özel sayısı; Vol:1, Sayı: 16; 1-4
21. Ruoslahti, E, Engvall, E. Integrins and vascular extracellular matrix assembly. *J Clin Invest.* 1997 Dec 1;100(11 Suppl):53-56
22. Carloni, V, Romanelli, RG, Pinzani, M, et al. Expression and function of integrin receptors for collagen and laminin in cultured human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1996; 110(4):1127-1136

23. Scoazec JY, Flejou JF, D'Errico A. Focal nodular hyperplasia of the liver: Composition of the extracellular matrix and expression of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules. *Hum Pathol* 1995; 26:1114
24. Couvelard A, Scoazec JY, Feldmann G. Expression of cell-cell and cell-matrix adhesion proteins by sinusoidal endothelial cells in the normal and cirrhotic human liver. *Am J Pathol* 1993; 143(3):738-752
25. Adams, DH, Hubscher, SG, Fisher, Williams A, Robinson M. Expression of E-selectin and E-selectin ligands in human liver inflammation. *Hepatology* 1996; 24(3):533-538
26. Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, Xu L, Wang LH, Lin HC, et al. DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J Clin Invest* 2001; 108:1369-1378
27. Vlodavsky I, Miao HQ, Medalion B, Danagher P, Ron D. Involvement of heparan sulfate and related molecules in sequestration and growth promoting activity of fibroblast growth factor. *Cancer Metastasis Rev* 1996; 15:177-186
28. Bissell DM, Maher JJ. Hepatic fibrosis and cirrhosis. In Zakim, Boyer (eds). *Hepatology: a Textbook of Liver Disease*, 4th edition. Philadelphia: Saunders, 2003: 395-416
29. Friedman SL. Mechanism of Disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Gastroenterol Hepatol*. 2004 Dec;98-105
30. Friedman SL. Pathogenesis Of Hepatic Fibrosis. In: Rose BD, ed. *UpToDate*, 12.1, CD version. UpToDate Inc, 2005
31. Bioulac-Sage P, Lafon ME, Saric J, Balabaud C. Nerves and perisinusoidal cells in human liver. *J Hepatol*. 1990 Jan;10(1):105-112

32. Davis BH, Kramer RT, Davidson NO. Retinoic acid modulates rat Ito cell proliferation, collagen, and transforming growth factor beta production. *J Clin Invest.* 1990 Dec;86(6):2062-2070
33. Okuno M, Moriwaki H, Imai S, Muto Y, Kawada N, Suzuki Y et al. Retinoids exacerbate rat liver fibrosis by inducing the activation of latent TGF-beta in liver stellate cells. *Hepatology.* 1997 Oct;26(4):913-921
34. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275:2247-2250
35. Bachem MG, Schneider E, Gross H, et al. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 1998; 115:421-432
36. Buniatian G, Gebhardt R, Schrenk D, Hamprecht B. Colocalization of three types of intermediate filament proteins in perisinusoidal stellate cells: glial fibrillary acidic protein as a new cellular marker. *Eur J Cell Biol.* 1996 May;70(1):23-32
37. Friedman, SL. Hepatic stellate cells. *Prog Liver Dis* 1996; 14:101
38. Schmitt-Gräff A, Krüger S, Bochard F, Gabbiani G, Denk H. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. *Am J Pathol* 1991; 138:1233-1242
39. Maher JJ, McGuire RF. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. *J Clin Invest* 1990; 86(5):1641-1648

40. Roskams T, Moshage H, De Vos R, et al. Heparan sulfate proteoglycan expression in normal human liver. *Hepatology* 1995; 21:950
41. Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21:373-384
42. Arthur MJ, Stanley A, Iredale JP. Secretion of 72 kDa type IV collagenase/gelatinase by cultured human lipocytes. Analysis of gene expression, protein synthesis and proteinase activity. *Biochem J* 1992; 287 (Pt 3):701
43. Milani S, Herbst H, Schuppan D, Grappone C, Pellegrini G, Pinzani M et al. Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 1994; 144:528-537
44. Theret N, Musso O, L'Helgoualc'h A, Clement B. Activation of matrix metalloproteinase-2 from hepatic stellate cells requires interactions with hepatocytes. *Am J Pathol* 1997; 150:51-58
45. Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJ. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 1996; 110:821-831
46. Murawaki Y, Ikuta Y, Idobe Y et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the liver of patients with chronic liver disease. *J Hepatol* 1997; 26:1213
47. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 102:538-549
48. Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of

- metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition. Implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002; 277:11069-11076
49. Iredale, JP. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis* 2001; 21:427-436
50. Trim JE, Samra SK, Arthur MJ. Upstream tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) element-1, a novel and essential regulatory DNA motif in the human TIMP-1 gene promoter, directly interacts with a 30-kDa nuclear protein. *J Biol Chem* 2000; 275:6657
51. Bachem MG, Melchior R, Gressner AM. The role of thrombocytes in liver fibrogenesis: effects of platelet lysate and thrombocyte-derived growth factors on the mitogenic activity and glycosaminoglycan synthesis of cultured rat liver fat storing cells. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; 27:555-565
52. Knittel T, Aurisch S, Neubauer K, Eichhorst S, Ramadori G. Cell-type-specific expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in Ito cells of rat liver. Up-regulation during in vitro activation and in hepatic tissue repair. *Am J Pathol.* 1996 Aug;149(2):449-462
53. Fischer R, Cariers A, Reinehr R, Haussinger D. Caspase 9-dependent killing of hepatic stellate cells by activated Kupffer cells. *Gastroenterology* 2002; 123:845-861
54. Canbay A, Higuchi H, Bronk SF, Taniai M, Sebo TJ, Gores GJ. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology* 2002; 123:1323-1330

55. Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Cytochrome P450 2E1-derived Reactive Oxygen Species Mediate Paracrine Stimulation of Collagen I Protein Synthesis by Hepatic Stellate Cells. *J Biol Chem* 2002; 277:9853-9864
56. Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology* 2002; 35:62-73
57. Wong VS, Wight DG, Palmer CR, Alexander GJ. Fibrosis and other histological features in chronic hepatitis C virus infection: a statistical model. *J Clin Pathol* 1996; 49:465-469
58. Di Sario A, Bendia E, Svegliati Baroni G, Ridolfi F, Bolognini L, Feliciangeli G et al A. Intracellular pathways mediating Na⁺/H⁺ exchange activation by platelet-derived growth factor in rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1999; 116:1155-1166
59. Benedetti A, Di Sario A, Casini A, Ridolfi F, Bendia E, Pignini P et al. Inhibition of the NA(+)/H(+) exchanger reduces rat hepatic stellate cell activity and liver fibrosis: An in vitro and in vivo study. *Gastroenterology* 2001; 120:545-556
60. Marra F, Grandaliano G, Valente AJ, Abboud HE. Thrombin stimulates proliferation of liver fat-storing cells and expression of monocyte chemotactic protein-1: Potential role in liver injury. *Hepatology* 1995; 22:780-787
61. Marra F, DeFranco R, Grappone C, Milani S, Pinzani M, Pellegrini G et al. Expression of the thrombin receptor in human liver: Up-regulation during acute and chronic injury. *Hepatology* 1998; 27:462-471

62. Saxena NK, Ikeda K, Rockey DC, Freidman SL, Anania FA. Leptin in hepatic fibrosis: Evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice. *Hepatology* 2002; 35:762-771
63. Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21:397-416
64. Maher, JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis* 2001; 21:417-426
65. George J, Wang SS, Sevcsik AM, Sanicola M, Cate RL, Koteliensky VE, et al. Transforming growth factor-beta initiates wound repair in rat liver through induction of the EIIIA-fibronectin splice isoform. *Am J Pathol* 2000; 156:115-124
66. Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112:1383-1194
67. Stefanovic B, Schnabl B, Brenner DA. Inhibition of collagen alpha 1(I) expression by the 5' stem-loop as a molecular decoy. *J Biol Chem* 2002; 277:18229
68. Garcia-Trevijano ER, Iraburu MJ, Fontana, L. Transforming growth factor beta1 induces the expression of alpha1(I) procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBPbeta-dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; 29:960
69. Svegliati Baroni G, D'Ambrosio L, Ferretti G, Casini A, Di Sario A, Salzano R et al. Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1998; 27:720-726

70. Whalen R, Rockey DC, Friedman SL, Boyer TD. Activation of rat hepatic stellate cells leads to loss of glutathione S-transferases and their enzymatic activity against products of oxidative stress. *Hepatology* 1999; 30:927-933
71. Rigamonti C, Andorno S, Maduli E, Morelli S, Pittau S, Nicosia G et al. Iron, hepatic stellate cells and fibrosis in chronic hepatitis C. *Eur J Clin Invest* 2002; 32 Suppl 1:28-35
72. Rockey DC. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis* 2001; 21:337-349
73. Housset C, Rockey DC, Bissell DM. Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:9266
74. Reinehr RM, Kubitz R, Peters-Regehr T, Bode JG, Häussinger D. Activation of rat hepatic stellate cells in culture is associated with increased sensitivity to endothelin 1. *Hepatology* 1998; 28:1566-1577
75. Suematsu M, Goda N, Sano T, Kashiwagi S, Egawa T, Shinoda Y et al. Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J Clin Invest* 1995; 96:2431-2437
76. Ohata M, Lin M, Satre M, Tsukamoto H. Diminished retinoic acid signaling in hepatic stellate cells in cholestatic liver fibrosis. *Am J Physiol* 1997; 272:G589-596
77. Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee HF Jr, Motomura K et al. Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* 2000; 275:35715-35722

78. Marra F, Efsen E, Romanelli RG, Caligiuri A, Pastacaldi S, Batignani G, et al. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulate profibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 119:466-478
79. Shimizu I, Mizobuchi Y, Yasuda M, Shiba M, Ma YR, Horie T et al. Inhibitory effect of oestradiol on activation of rat hepatic stellate cells in vivo and in vitro. *Gut*. 1999 Jan;44(1):127-136
80. Yasuda M, Shimizu I, Shiba M, Ito S. Suppressive effects of estradiol on dimethylnitrosamine-induced fibrosis of the liver in rats. *Hepatology*. 1999 Mar;29(3):719-727
81. Poynard T, Bedossa P, Chevallier M, Mathurin P, Lemonnier C, Trepo C et al. A comparison of three interferon alfa-2b regimens for the long-term treatment of chronic non-A, non-B hepatitis. Multicenter Study Group. *N Engl J Med*. 1995 Jun 1;332(22):1457-62. Erratum in: *N Engl J Med* 1996 Apr 25;334(17):1143
82. Abdel-Aziz G, Lebeau G, Rescan PY, Clement B, Rissel M, Deugnier Y et al. Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat. *Am J Pathol*. 1990 Dec;137(6):1333-1342
83. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest*. 1998 Aug 1;102(3):538-549
84. Vater CA, Harris ED Jr, Siegel RC. Native cross-links in collagen fibrils induce resistance to human synovial collagenase. *Biochem J*. 1979 Sep 1;181(3):639-645

85. Pares A, Deulofeu R, Gimenez A, Caballeria L, Bruguera M, Caballeria J et al. Serum hyaluronate reflects hepatic fibrogenesis in alcoholic liver disease and is useful as a marker of fibrosis. *Hepatology*. 1996 Dec;24(6):1399-1403
86. Kershenobich D, Vargas F, Garcia-Tsao G, Perez Tamayo R, Gent M, Rojkind M. Colchicine in the treatment of cirrhosis of the liver. *N Engl J Med*. 1988 Jun 30;318(26):1709-1713
87. Kaplan MM, Schmid C, Provenzale D, Sharma A, Dickstein G, McKusick A. A prospective trial of colchicine and methotrexate in the treatment of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 1999 Nov;117(5):1173-1180
88. Castilla A, Prieto J, Fausto N. Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy. *N Engl J Med*. 1991 Apr 4;324(14):933-940
89. Muriel P. Alpha-interferon prevents liver collagen deposition and damage induced by prolonged bile duct obstruction in the rat. *J Hepatol*. 1996 May;24(5):614-621
90. Fort J, Pilette C, Veal N, Oberti F, Gallois Y, Douay O et al. Effects of long-term administration of interferon alpha in two models of liver fibrosis in rats. *J Hepatol*. 1998 Aug;29(2):263-270
91. Rockey DC, Chung JJ. Interferon gamma inhibits lipocyte activation and extracellular matrix mRNA expression during experimental liver injury: implications for treatment of hepatic fibrosis. *J Investig Med*. 1994 Dec;42(4):660-670
92. Wynn TA, Cheever AW, Jankovic D, Poindexter RW, Caspar P, Lewis FA et al. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature*. 1995 Aug 17;376(6541):594-596

93. Thompson K, Maltby J, Fallowfield J, McAulay M, Millward-Sadler H, Sheron N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology*. 1998 Dec;28(6):1597-1606
94. Nelson DR, Lauwers GY, Lau JY, Davis GL. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology*. 2000 Apr;118(4):655-660
95. George J, Roulot D, Koteliansky VE, Bissell DM. In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 26;96(22):12719-12724
96. Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, Takeshita A, Ueno H. Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 2;96(5):2345-2349
97. Rokey DC, Chung JJ. Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing. *J Clin Invest*. 1996 Sep 15;98(6):1381-1388
98. Peterson TC, Neumeister M. Effect of pentoxifylline in rat and swine models of hepatic fibrosis: role of fibroproliferation in its mechanism. *Immunopharmacology*. 1996;31:183-193
99. Desmouliere A, Xu G, Costa AM, Yousef IM, Gabbiani G, Tuchweber B. Effect of pentoxifylline on early proliferation and phenotypic modulation of fibrogenic cells in two rat models of liver fibrosis and on cultured hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 1999 Apr;30(4):621-631

100. Halevy O, Nagler A, Levi-Schaffer F, Genina O, Pines M. Inhibition of collagen type I synthesis by skin fibroblasts of graft versus host disease and scleroderma patients: effect of halofuginone. *Biochem Pharmacol.* 1996 Oct 11;52(7):1057-1063
101. Bruck R, Genina O, Aeed H, Alexiev R, Nagler A, Avni Y et al. Halofuginone to prevent and treat thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Hepatology.* 2001 Feb;33(2):379-386
102. Pines M, Knopov V, Genina O, Lavelin I, Nagler A. Halofuginone, a specific inhibitor of collagen type I synthesis, prevents dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis. *J Hepatol.* 1997 Aug;27(2):391-398
103. Wang YQ, Ikeda K, Ikebe T, Hirakawa K, Sowa M, Nakatani K et al. Inhibition of hepatic stellate cell proliferation and activation by the semisynthetic analogue of fumagillin TNP-470 in rats. *Hepatology.* 2000 Nov;32(5):980-989
104. Jonsson JR, Clouston AD, Ando Y, Kelemen LI, Horn MJ, Adamson MD et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology.* 2001 Jul;121(1):148-155
105. Pietrangelo A, Borella F, Casalgrandi G, Montosi G, Ceccarelli D, Gallesi D et al. Antioxidant activity of silybin in vivo during long-term iron overload in rats. *Gastroenterology.* 1995 Dec;109(6):1941-1949
106. Boigk G, Stroedter L, Herbst H, Waldschmidt J, Riecken EO, Schuppan D. Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. *Hepatology.* 1997 Sep;26(3):643-649

107. Li J, Kim CI, Leo MA. Polyunsaturated lecithin prevents acetaldehyde-mediated hepatic collagen accumulation by stimulating collagenase activity in cultured lipocytes. *Hepatology* 1992;15:373
108. Oneta CM, Mak KM, Lieber CS. Dilinoleoylphosphatidylcholine selectively modulates lipopolysaccharide-induced Kupffer cell activation. *J Lab Clin Med.* 1999 Nov;134(5):466-470
109. Ma X, Zhao J, Lieber CS. Polyenylphosphatidylcholine attenuates non-alcoholic hepatic fibrosis and accelerates its regression. *J Hepatol.* 1996 May;24(5):604-613
110. Kayano K, Sakaida I, Uchida K, Okita K. Inhibitory effects of the herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) on cell proliferation and procollagen gene expressions in cultured rat hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 1998 Oct;29(4):642-649
111. Poo JL, Feldmann G, Erlinger S, Braillon A, Gaudin C, Dumont M et al. Ursodeoxycholic acid limits liver histologic alterations and portal hypertension induced by bile duct ligation in the rat. *Gastroenterology.* 1992 May;102(5):1752-1759
112. Beno DW, Espinal R, Edelstein BM, Davis BH. Administration of prostaglandin E1 analog reduces rat hepatic and Ito cell collagen gene expression and collagen accumulation after bile duct ligation injury. *Hepatology.* 1993 Apr;17(4):707-714
113. Keiding S, Badsberg JH, Becker U, Bentsen KD, Bonnevie O, Caballeria J et al. The prognosis of patients with alcoholic liver disease. An international randomized, placebo-controlled trial on the effect of malotilate on survival. *J Hepatol.* 1994 Apr;20(4):454-460

114. Sakaida I, Matsumura Y, Kubota M, Kayano K, Takenaka K, Okita K. The prolyl 4-hydroxylase inhibitor HOE 077 prevents activation of Ito cells, reducing procollagen gene expression in rat liver fibrosis induced by choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Hepatology*. 1996 Apr;23(4):755-763

115. Wang YJ, Wang SS, Bickel M, Guenzler V, Gerl M, Bissell DM. Two novel antifibrotics, HOE 077 and Safironil, modulate stellate cell activation in rat liver injury: differential effects in males and females. *Am J Pathol*. 1998 Jan;152(1):279-287

116. Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, Nakanishi K, Sawa Y, Morishita R et al. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med*. 1999 Feb;5(2):226-230

117. Matsuda Y, Matsumoto K, Yamada A, Ichida T, Asakura H, Komoriya Y et al. Preventive and therapeutic effects in rats of hepatocyte growth factor infusion on liver fibrosis/cirrhosis. *Hepatology*. 1997 Jul;26(1):81-89

118. Fort J, Oberti F, Pilette C, Veal N, Gallois Y, Douay O et al. Antifibrotic and hemodynamic effects of the early and chronic administration of octreotide in two models of liver fibrosis in rats. *Hepatology*. 1998 Dec;28(6):1525-1531

119. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*. 2002 Nov-Dec;96(2-3):67-202. Review

120. Bankova VS, De Castro SL, Marcucci MC. (2000) Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31, 3-15

121. Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SA, Dandiya PC. Antibacterial, antifungal, antiamoebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol*. 1991 Oct;35(1):77-82

122. Hishikawa K, Nakaki T. [NF-kappa B as a therapeutic drug target]. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 2001 Sep;118(3):197-202. Review. Japanese
123. Tosi B, Donini A, Romagnoli C, Bruni A. Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytother Res* 10 (1996) 335–336
124. Krol W, Scheller S, Shani J, Pietsz G, Czuba Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of staphylococcus aureus. *Arzneimittelforschung*. 1993 May;43(5):607-609
125. Rossi A, Longo R, Russo A, Borrelli F, Sautebin L. The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. *Fitoterapia*. 2002 Nov;73 Suppl 1:30-7
126. Dimov V, Ivanovska N, Bankova V, Popov S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivative. *Vaccine*. 1992;10(12):817-823
127. Claus R, Kinscherf R, Gehrke C, Bonaterra G, Basnet P, Metz J et al. Antiapoptotic effects of propolis extract and propol on human macrophages exposed to minimally modified low density lipoprotein. *Arzneimittelforschung*. 2000 Apr;50(4):373-379
128. Kimoto T, Arai S, Kohguchi M, Aga M, Nomura Y, Micallef MJ et al. Apoptosis and suppression of tumor growth by artemillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect Prev*. 1998;22(6):506-515
129. Kosenko SV, Kosovich TIu. [The treatment of periodontitis with prolonged-action propolis preparations (clinical x-ray research)] *Stomatologiya (Mosk)*. 1990 Mar-Apr;69(2):27-29. Russian

130. Gonzalez R, Corcho I, Ramirez D. Hepatoprotective effects of propolis extract on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Phytother Res* 1995;9:14–7
131. Pascual C, Gonzalez R, Torricella RG. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol*. 1994 Jan;41(1-2):9-13
132. Russo A, Izzo AA, Cardile V, Borrelli F, Vanella A. Indian medicinal plants as antiradicals and DNA cleavage protectors. *Phytomedicine*. 2001 Mar;8(2):125-132
133. Ilhan A, Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Ciralik H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999 Oct;16(4):458-463
134. Takaisi-Kikuni NB, Schilcher H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med*. 1994 Jun;60(3):222-227
135. Lee YJ, Liao PH, Chen WK, Yang CY. Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. *Cancer Lett*. 2000 May 29;153(1-2):51-56
136. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002 Nov;73 Suppl 1:S1-6. Review
137. Baeuerle PA. The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta*. 1991 Apr 16;1072(1):63-80. Review
138. Burke TR Jr, Fesen MR, Mazumder A, Wang J, Carothers AM, Grunberger D et al. Hydroxylated aromatic inhibitors of HIV-1 integrase. *J Med Chem*. 1995 Oct 13;38(21):4171-4178

139. Chiao C, Carothers AM, Grunberger D, Solomon G, Preston GA, Barrett JC. Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in transformed rat fibroblast cells. *Cancer Res.* 1995 Aug 15;55(16):3576-3583
140. Rao CV, Desai D, Kaul B, Amin S, Reddy BS. Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. *Chem Biol Interact.* 1992 Nov 16;84(3):277-29024
141. Bhimani RS, Troll W, Grunberger D, Frenkel K. Inhibition of oxidative stress in HeLa cells by chemopreventive agents. *Cancer Res.* 1993 Oct 1;53(19):4528-4533
142. Ozyurt H, Sogut S, Yildirim Z, Kart L, Iraz M, Armutcu F et al Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on bleomycine-induced lung fibrosis in rats. *Clin Chim Acta.* 2004 Jan;339(1-2):65-75
143. Zhao WX, Zhao J, Liang CL, Zhao B, Pang RQ, Pan XH. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells in vitro. *World J Gastroenterol.* 2003 Jun;9(6):1278-1281
144. Uz E, Sogut S, Sahin S, Var A, Ozyurt H, Gulec M, Akyol O. The protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *World J Urol* 2002; 20: 264-270
145. Gallois C, Habib A, Tao J, Moulin S, Maclouf J, Mallat A et al Role of NF- κ B in the antiproliferative effect of endothelin-1 and tumor necrosis factor- α in human hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 23183-23190
146. Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T. Effect of antioxidants, reveratrol, quercetin and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and kupffer cells. *Hepatology* 1998;27: 1265-1274

147. Jezequel AM, Mancini R, Rinaldesi ML, Macarri G, Venturini C, Orlandi F. A morphological study of the early stages of hepatic fibrosis induced by low doses of dimethylnitrosamine in the rat. *J Hepatol* 1987;5:174-181
148. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:431-435
149. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*. 1995 Jun;22(6):696-9
150. Laura W. Lamps, Kay Washington. Acute and Chronic Hepatitis. In: Robert D. Odze, John R Goldblum, James M Crawford (eds). *Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract, and Pancreas*. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders, 2004:783-810
151. Sakaida I, Matsumura Y, Akiyama S, Hayashi K, Ishige A, Okita K. Herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) prevents liver fibrosis and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *J Hepatol* 1998;28:298-306
152. Niki T, Rombouts K, De Bleser P, De Smet K, Rogiers V, Schuppan D, et al. A histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, suppresses myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells in primary culture. *Hepatology* 1999;29:858-867
153. Nagaoka T, Banskota AH, Tezuka Y, Saiki I, Kadota S. Selective antiproliferative activity of caffeic acid phenethyl ester analogues on highly liver-

- metastatic murine colon 26-L5 carcinoma cell line. *Bioorg Med Chem* 2002; 10: 3351-3359
154. Grilli M, Chiu JJ, Lenardo MJ. NF-kappa B and Rel: participants in a multifunctional transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol.* 1993;143:1-62. Review
155. Iraz M, Ozerol E, Gulec M, Tasdemir S, Idiz N, Fadillioglu E, et al. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) administration on cisplatin-induced oxidative damage to liver in rat. *Cell Biochem Funct.* 2006 Jul-Aug;24(4):357-361
156. Ates B, Dogru MI, Gul M, Erdogan A, Dogru AK, Yilmaz I, et al. Protective role of caffeic acid phenethyl ester in the liver of rats exposed to cold stress. *Fundam Clin Pharmacol.* 2006 Jun;20(3):283-289
157. Pekmez H, Kus I, Colakoglu N, Ogeturk M, Ozyurt H, Turkoglu AO, et al. The protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against liver damage induced by cigarette smoke inhalation in rats. *Cell Biochem Funct.* 2007 Jul-Aug;25(4):395-400
158. Bhattacharjee A, Lappi VR, Rutherford MS, Schook LB. Molecular dissection of dimethylnitrosamine (DMN)-induced hepatotoxicity by mRNA differential display. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998 May;150(1):186-195
159. Kim MR, Kim HS, Lee MS, Lee MJ, Jang JJ. Cell cycle protein profile of the hepatic stellate cells (HSCs) in dimethylnitrosamine-induced rat hepatic fibrosis. *Exp Mol Med.* 2005 Aug 31;37(4):335-342
160. Jenkins SA, Grandison A, Baxter JN, Day DW, Taylor I, Shields R. A dimethylnitrosamine-induced model of cirrhosis and portal hypertension in the rat. *J Hepatol* 1985;1:489-499

161. Paolucci F, Mancini R, Marucci L, Benedetti A, Jezequel AM, Orlandi F. Immunohistochemical identification of proliferating cells following dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Liver* 1990;10:278-281
162. Dahab GM, Kheriza MM, El-Beltagi HM, Fouda AM, El-Din OA. Digital quantification of fibrosis in liver biopsy sections: description of a new method by Photoshop software. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004 Jan;19(1):78-85
163. Chevallier M, Guerret S, Chossegros E, Gerard F, Grimaud J-A. A histological semi-quantitative scoring system for evaluation of hepatic fibrosis in needle liver biopsy specimens: comparison with morphometric studies. *Hepatology* 1994; 20: 349–355
164. Bonis PA, MD Histologic scoring systems for chronic hepatitis. In: Rose BD, ed. UpToDate, 12.1, CD version. UpToDate Inc, 2005
165. Bonis PA, Ioannidis JP, Cappelleri JC, Kaplan MM, Lau J. Correlation of biochemical response to interferon alfa with histological improvement in hepatitis C: A meta-analysis of diagnostic test characteristics. *Hepatology* 1997; 26:1035-1044
166. No authors listed. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1994; 15-20
167. Soloway RD, Baggenstoss AH, Schoenfield LJ, Summerskill WH. Observer error and sampling variability tested in evaluation of hepatitis and cirrhosis by liver biopsy. *Am J Dig Dis* 1971; 16:1082-1086
168. Banner BF, Barton AL, Cable EE, Smith L, Bonkovsky HL. A detailed analysis of the Knodell score and other histologic parameters as predictors of response to interferon therapy in chronic hepatitis C. *Mod Pathol* 1995; 8:232-238

169. Marshall M Kaplan, Peter A L Bonis. Histologic scoring systems for chronic liver disease. In: Rose BD, ed. UpToDate, 15..3, CD version. UpToDate Inc, 2007
170. Hammel P, Couvelard A, O'Toole D. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N Engl J Med* 2001;344:418-423
171. Lee HS, Huang GT, Chen CH, Chiou LL, Lee CC, Yang PM, et al. Less reversal of liver fibrosis after prolonged carbon tetrachloride injection. *Hepatogastroenterology*. 2001 Sep-Oct;48(41):1312-1315
172. Attallah AM, Shiha GE, Omran MM, Zalata KR. A discriminant score based on four routine laboratory blood tests for accurate diagnosis of severe fibrosis and/or liver cirrhosis in Egyptian patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res*. 2006 Feb 11
173. Pari L, Karthikesan K. Protective role of caffeic acid against alcohol-induced biochemical changes in rats. *Fundam Clin Pharmacol*. 2007 Aug;21(4):355-361
174. Streiff MB, Spivak JL. The Liver and Hematopoiesis.. In Zakim, Boyer (eds). *Hepatology: a Textbook of Liver Disease*, 4th edition. Philadelphia: Saunders, 2003: 537-547