

T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

MAST HÜCRE STABİLİZATÖRÜ KROMOLİN SODYUMUN
DENEYSEL KOLESTAZDA OLASI İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Dr. Hanife Yurdakul ERTAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yücel ÜSTÜNDAĞ

ZONGULDAK

2019

T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

MAST HÜCRE STABİLİZATÖRÜ KROMOLİN SODYUMUN
DENEYSEL KOLESTAZDA OLASI İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Dr. Hanife Yurdakul ERTAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yücel ÜSTÜNDAĞ

ZONGULDAK

2019

TEZ ONAY TUTANAĞI

Tezin Teslim Edildiği Üniversite/Fakülte: Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tez Başlığı : Mast Hücre Stabilizatörü Kromolin Sodyumun Deneysel Kolestazda Olası İyileştirici Etkilerinin Araştırılması

Tez Yazarı : Arş. Gör. Dr. Hanife YURDAKUL ERTAN

Tez Savunma Tarihi : 25/02/2019

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Yücel ÜSTÜNDAĞ

Prof.Dr. Yücel ÜSTÜNDAĞ
Jüri Başkanı

Dr.Öğr.Üyesi Muammer BİLİCİ

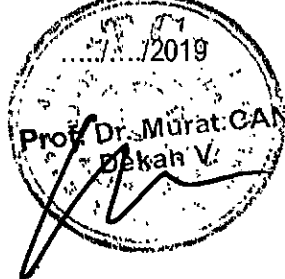
Üye

Doç.Dr.Serkan TORUN

Üye

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi
Doç. Dr. Serkan TORUN
Dip. Tescil No: 8827
İç Hst. A.B.D.
Gastroenteroloji B.D.

UYGUNDUR



ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca değerli bilgi ve birikimleriyle yetişmeme katkıda bulunan başta Dekanımız Prof. Dr. Murat CAN ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Şehmus ERTOP olmak üzere tüm hocalarıma; bilgi ve tecrübeleri ile yolumu aydınlatan, öğrencisi olmaktan ve hekimlik sanatını kendisinden öğrenmekten büyük onur duyduğum, tez danışmanım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Yücel ÜSTÜNDAĞ'a, bu çalışmanın her aşamasında büyük emek ve özverisi ile yanımda olan, varlığı ile güç bulduğum kıymetli hocam Prof. Dr. Günnur ÖZBAKIŞ DENGİZ'e, tez çalışmamın çeşitli aşamalarında benden destek ve yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Figen BARUT'a, Dr. Öğr. Üyesi Muammer BİLİCİ'ye ve ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan kıymetli ablam Uzm. Dr. Yonca YILMAZ ÜRÜN'e teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Yaşamın yoğun, zor ve bir o kadar da eğlenceli aktığı asistanlık yıllarımı paylaşmaktan mutluluk duyduğum asistan doktor arkadaşlarıma; birlikte çalışmaktan keyif aldığım tüm hemşire ekibimize ve sağlık personeline teşekkür ederim.

Sonsuz bir sevgi ve fedakârlıkla beni bugünlere getiren, karşılaştığım tüm zorluklarda en büyük desteğim, heyecan ve mutluluklarımın en büyük ortağı biricik anneme ve babama, bana umut ve enerji veren canım kardeşlerime, sabır ve özveriyle daima yanımda olan değerli eşim Deniz'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Hanife YURDAKUL ERTAN
ZONGULDAK, 2019

ÖZET

Yurdakul Ertan Hanife, Mast Hücre Stabilizatörü Kromolin Sodyumun Deneysel Kolestazda Olası İyileştirici Etkilerinin Araştırılması, Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi, Zonguldak, 2019.

Giriş ve Amaç: Kolestaz; hepatosellüler hasar, duktus hücre proliferasyonu ve karaciğer fibrozisine neden olmaktadır. Mast hücreleri hepatobiliyer hastalıklarda sayıca artarak fibrotik değişikliklerin oluşumunda rol oynamaktadır. Kolestatik kaşıntı oluşumunda çeşitli mekanizmalar tanımlanmış olsa da patogenez kesinlik kazanmamıştır. Bu çalışmamızda koledok ligasyonu ile deneysel kolestaz oluşturulan rat modelinde, mast hücre stabilizatörü bir ajan olan kromolin sodyumun deneysel kolestazda biyokimyasal ve histopatolojik olası iyileştirici etkilerini incelemeyi, kolestatik kaşıntı üzerine etkinliğini araştırmayı ve bu etkinliğin derecesini bu alanda kullanılan bir grup terapötik ajanın etkinliği ile karşılaştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Ağırlıkları 193-296 gram arasında değişen, Spraque Dawley cinsi 69 adet erkek rat; randomize bir şekilde 8 gruba ayrıldı. Cerrahi işlem öncesi ağırlıkları ölçülen ratlara post-operatif 10 gün süreyle, ardışık her gün belirlenen tedaviler uygulandı. Laparotomi yapılan sham grubuna (n=9) koledok ligasyonu (KL) uygulanmadı, tedavi verilmedi. Kontrol grubuna (n=12) koledok ligasyonu uygulandı ve tedavide intraperitoneal (ip) serum fizyolojik verildi. Diğer 6 gruba da koledok ligasyonu uygulandı. Bu gruplardan KL+KROM grubuna (n=9) ip kromolin sodyum, KL+KFA grubuna (n=8) ip klorfeniramin maleat, KL+SERT grubuna (n=8) oral sertralin, KL+OND grubuna (n=8) ip ondansetron, KL+UDKA grubuna (n=7) oral ursodeoksikolik asit ve KL+NAL grubuna (n=8) ip naloksan uygulandı. Deneyin 5. ve 10. günü denekler 5'er dakika boyunca kaşınma davranışı yönünden gözlemlendi. 10 günün sonunda ağırlıkları ölçülen deneklerin genel anestezi altında kan örnekleri alındıktan sonra sakrifikasyon ile histopatolojik çalışmalar için doku (cilt-cilt altı, periton zarı, karaciğer) örnekleri alındı.

Bulgular: KL+KROM grubunda kontrol grubuna göre, plazma AST ve ALT değerleri dışındaki biyokimyasal parametrelerde (serum histamin ve ototaksin, plazma total safra asitleri, ALP, GGT, total ve direkt bilirubin düzeyleri) anlamlı azalma izlendi ($p<0.05$) ve sayıca en çok parametrenin anlamlı azalma gösterdiği

grup KL+KROM grubu idi. Karaciğer spesmenleri histopatolojik açıdan değerlendirildiğinde, medikal tedavi gruplarından KL+KROM ve KL+SERT grubunda portal inflamasyon, lobuler inflamasyon, safra duktus proliferasyonu, nekroz ve fibrozis açısından kontrol grubuna göre anlamlı histopatolojik iyileşme izlendi ($p<0.05$). Kolestaz ile birlikte karaciğer, cilt ve periton mast hücre sayılarının arttığı görüldü. KL+KROM grubunda; karaciğer ve periton mast hücrelerindeki azalma kontrol grubuna göre anlamlı iken (sırasıyla $p=0.003$, $p=0.004$), cilt mast hücre sayılarındaki azalma anlamlı bulunmadı ($p=0.09$). Deneyin 5. gün ve 10. gün kaşınma davranışı izleminde tüm grupların kaşınma süreleri ortalamaları kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük izlendi (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.05$). Kaşınma sürelerinin kontrol, sham, KL+OND ve KL+NAL gruplarında 5. günden 10. güne artmış olduğu; KL+KFA, KL+SERT, KL+UDKA ve KL+KROM gruplarında ise azalmış olduğu görüldü.

Sonuç: Çalışmamız göstermiştir ki; kolestatik kaşıntıda daha önce denenmemiş bir ajan olan mast hücre stabilizatörü kromolin sodyum, umut vadeci anti-pruritik etkinliğe sahiptir ve kolestazda biyokimyasal ve histopatolojik iyileşme sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Kolestaz, kolestatik kaşıntı, mast hücreleri, kromolin sodyum, ototaksin

ABSTRACT

Yurdakul Ertan Hanife, An Investigation of Potential Healing Effects of Cromolyn Sodium on Experimental Cholestasis, Zonguldak Bülent Ecevit University, Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine Thesis, Zonguldak, 2019.

Background and Aim:Cholestasis produces hepatocellular injury, ductular cell proliferation and fibrosis of liver parenchyma. Mast cells have been shown to play a role in various hepatobiliary diseases and mast cell numbers are markedly increased in advanced liver fibrosis. Although various mechanisms have been defined in the formation of cholestatic pruritus, pathogenesis of the pruritus is still unclear. In this study, we aimed to investigate the possible effects of cromolyn sodium, a mast cell stabilizer, on biochemical and histopathological potential healing effects in experimental cholestasis which is induced by common bile duct ligation in rats. We also aimed to investigate its efficacy on cholestatic pruritus and to compare the effectiveness with a group of therapeutic agents used in this area.

Materials and Methods: Sixty-nine male rats of Spraque Dawley, weighing between 193-296 grams, were randomly divided into 8 groups. We weighed the rats preoperatively and applied the determined treatment every day consecutively for 10 days after the surgery. Common bile duct ligation (BDL) was not performed in the laparotomy sham group (n = 9) and no treatment was given. The control group (n=12) underwent common bile duct ligation and intraperitoneal (ip) saline solution was given as the treatment. Common bile duct ligation was applied to the other 6 groups. BDL+CROM group (n=9) received ip cromolyn sodium, BDL+CPM group (n=8) received ip chlorpheniramine maleate, BDL+SERT group (n=8) received oral sertraline, BDL+OND group (n=8) received ip ondansetron, BDL+UDCA group (n=7) received oral ursodeoxycholic acid and lastly BDL+NAL group (n=8) received ip naloxone. Fifth and tenth days of the experiment, subjects were observed for 5 minutes in terms of itching behavior. After 10 days, the rats were weighed and blood samples were taken under general anesthesia. Lastly, tissue (skin-subcutaneous, peritoneal membrane, liver) samples were taken for histopathological studies with sacrifice.

Results: A significant decrease was observed in biochemical parameters (serum histamine and autotaxin, plasma total bile acids, ALP, GGT, total and direct bilirubin levels) in the BDL+CROM group compared to the control group except for plasma AST and ALT values ($p < 0.05$).

The most number of parameters decreased significantly in the BDL+CROM group. When liver specimens were evaluated histopathologically, portal inflammation, lobular inflammation, bile duct proliferation, necrosis and fibrosis were significantly improved in BDL+CROM and BDL+SERT group compared to the control group ($p < 0.05$). Liver, skin and peritoneal mast cells were increased by cholestasis. In the BDL+CROM group, liver and peritoneal mast cells were significantly decreased compared to the control group ($p = 0.003$, $p = 0.004$, respectively), whereas skin mast cells did not significantly decrease ($p = 0.09$). On the fifth and tenth days of the experiment, the mean duration of rat's itching was significantly lower in all groups compared to the control group ($p < 0.05$, $p < 0.05$, respectively). Duration of the itching was observed to be increased in control, sham, BDL+OND and BDL+NAL groups from day 5 to 10 as it was decreased in BDL+CPM, BDL+SERT, BDL+UDCA and BDL+CROM groups.

Conclusion: Our study showed that mast cell stabilizer cromolyn sodium, an untested agent in cholestatic pruritus has promising anti-pruritic efficacy and has provided biochemical and histopathological recovery in cholestasis.

Keywords: Cholestasis, cholestatic pruritus, mast cells, cromolyn sodium, autotaxin

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
TABLO DİZİNİ	xiii
ŞEKİL DİZİNİ	xiv
GRAFİK DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğer Anatomisi Ve Histolojisi	3
2.1.1. Karaciğerin Anatomisi	3
2.1.2. Karaciğerin İnnervasyonu	5
2.1.3. Karaciğerin Lenfatik Dolaşımı.....	5
2.1.4. Karaciğerin Histolojisi	5
2.2. Karaciğerin Parankim Yapılanması Ve Hücre Tipleri	7
2.2.1. Karaciğerin Parankim Yapılanması	7
2.2.2. Karaciğerin Hücre Tipleri	9
2.2.2.1. Parankimal Hücreler.....	10
2.2.2.2. Sinusoidal Hücreler	11
2.2.2.3. Perisinusoidal Hücreler	12
2.3. Safra Yolları Anatomisi Ve Histolojisi	14
2.3.1. Safra Kanalları	14
2.3.2. Safra Kesesi.....	19
2.4. Safra Sekresyonu ve Enterohepatik Sirkülasyon	20
2.4.1. Safra Asidi Sentez ve Metabolizması	23
2.4.2. Enterohepatik Sirkülasyon	26
2.4.3. Hepatik Safra Asidi Taşınması ve Safra Sekresyonu.....	27
2.4.4. Renal Safra Asidi Transportu.....	30
2.5. Karaciğer Biyokimyası ve Fonksiyonel Testler	30
2.5.1. Bilirubin	31
2.5.1.1. Bilirubin Metabolizması	31
2.5.1.2. Serum Bilirubin Düzeyi Ölçümü	32
2.5.1.3. Bilirubin Yüksekliğine Yaklaşım.....	34
2.5.2. Aminotransferazlar.....	35
2.5.2.1. Aminotransferaz Yüksekliğine Yaklaşım	36
2.5.3. Alkalen Fosfataz.....	39
2.5.4. Gama Glutamil Transpeptidaz	39
2.5.5. 5' Nukleotidaz.....	40
2.5.5.1. ALP GGT ve 5'NT Yüksekliğine Yaklaşım.....	40
2.5.6. Hepatik Sentezi Gösteren Testler	42

2.5.6.1. Albumin	42
2.5.6.2. Protrombin Zamanı	43
2.5.7. Hepatik Fibrozis Tespitine Yönelik Testler	44
2.5.8. Kantitatif Karaciğer Fonksiyon Testleri.....	45
2.6. Kolestazis	45
2.6.1. Deneysel Kolestaz Hayvan Modelleri.....	48
2.6.2. Koledok Ligasyonu	49
2.6.3. Kolestaz ve Kaşıntı	50
2.7. Kolestatik Kaşıntıda Tedavi Yaklaşımları	52
2.8. Mast Hücre Stabilizatörü Kromalin Sodyum.....	53
2.9. Ototaksin	54
3. GEREÇ VE YÖNTEM	57
3.1. Biyokimyasal İnceleme	61
3.2. Histopatolojik İnceleme	62
3.2.1. İmmünohistokimyasal boyama:	64
3.3. İstatistiksel İnceleme	64
4. BULGULAR	65
4.1. Biyokimyasal Bulgular.....	66
4.2. Histopatolojik Bulgular	72
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	75
5. TARTIŞMA	80
6. SONUÇ	90
7. KAYNAKLAR	91
8. EKLER.....	107
Ek 1: Etik Kurul Onayı	107

SİMGELER VE KISALTMALAR

AASLD	: American Association for the Study of Liver Diseases
ABAT	: Apical Bile Acid Transporter
ALP	: Alkalen Fosfataz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
ATX	: Autotaxin
BRIC	: Benign Recurrent İntrahepatik Choleastasis
CA	: Cholic Acid
CDCA	: Chenodeoxycholic Acid
DCA	: Deoxycholic Acid
DİK	: Dissemine İnvasküler Koagülasyon
EBA	: Ekstrahepatik Biliyer Atrezi
ECM	: Extracellular Matrix
FGF19	: Fibroblast Growth Factor-19
GGT	: Gama glutamil transpeptidaz
GLUT	: Glucose Transporter
GRPR	: Gastrin-Releasing Peptide Receptor
HSCs	: Hepatic Stellate Cells
HSEC	: Hepatic Sinusoidal Endothelial Cells
ICP	: İntrahepatik Cholestasis of Pregnancy
IL	: İnterlökin
INR	: International Normalized Ratio
LCA	: Lithocholic Acid
LPA	: Lisofosfatidik Asit
LPAC	: Low Phospholipid-Associated Cholestasis
LPS	: Lipopolisakkarit
MARS	: Moleküler Adsorban Resirkülasyon Sistemi
MELD Skoru	: Model For End-Stage Liver Disease Score
MRP	: Multidrug Resistance-Associated Protein

MyD88	: Myeloid Differentiation Response Protein
NF- κ B	: Nuclear Factor Kappa B
NK hücreleri	: Natural Killer Hücreleri
NPY	: Neuropeptide Tyrosine
NSAI	: Non Steroid Anti İnflamatuar
OATP	: Organik Anyon Taşıyıcı Polipeptit
OST	: Organik Solüt Taşıyıcı
PBAM	: Primary Bile Acid Malabsorption
PBS	: Primer Biliyer Siroz
PFIC	: Progressive Familial İntrahepatic Cholestasis
PSC	: Primer Sklerozan Kolanjit
PT	: Prothrombin Time
PTT	: Partial Thromboplastin Time
PXR	: Pregnan X Receptor
ROS	: Reactive Oxygen Species
SA	: Safra Asitleri
SGLT	: Sodium-Glucose Linked Transporter
SGOT	: Serum Glutamik Oksaloasetik Transaminaz
SGPT	: Serum Glutamik Prüvik Transaminaz
SPARC	: Secreted Protein - Acidic and Rich in Cysteine
TGF- β	: Transforming Growth Factor- β
TLR4	: Toll-Like-Receptör 4
TNF- α	: Tumor Necrosis Factor - α
UDKA	: Ursodeoksikolik Asit
UDP	: Üridin 5'-Difosfat
5'NT	: 5'Nukleotidaz

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Hepatik Safra Bileşenleri (23)	22
Tablo 2: Yetişkinlerde Serum Aminotransferaz Yüksekliği Nedenleri (23)	37
Tablo 3: Yetişkinlerde Kolestatik Enzim Yüksekliğinin İntrahepatik Nedenleri (23)	41
Tablo 4: Yetişkinlerde Kolestatik Enzim Yüksekliğinin Ekstrahepatik Nedenleri (23)	42
Tablo 5: Deney Çalışma Grupları	57
Tablo 6: Deneyde kullanılan farmakolojik ajanlar.....	60
Tablo 7: Deneyin post-operatif 10.gününde elde edilen serum histamin ve ototaksin düzeyleri ile plazma total safra asitleri düzeyi.....	67
Tablo 8: Deneyin post-operatif 10.gününde elde edilen plazma AST, ALT, ALP, GGT, TB, DB düzeyleri	69
Tablo 9: Koledok ligasyonuna bağlı gelişen karaciğer hasarının histopatolojik bulguları	72
Tablo 10: Karaciğer, periton ve cilt dokusu mast hücre sayıları.....	75

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1 : Karaciğerin Subsegmentleri	4
Şekil 2 : Ekstrahepatik Biliyer Trakt	16
Şekil 3: Cerrahi işleme hazırlık	58
Şekil 4: Dissektör ile koledok iskeletilize edildi.	59
Şekil 5: Koledok ligate edildi.	59
Şekil 6: Deneyin 10. gününde dilate safra yolları ve makroskobik patolojik değişiklikler.....	61
Şekil 7: Karaciğer lobektomi materyalleri %10 luk nötral formalin solüsyonunda fikse edildi.....	63
Şekil 8: Karaciğer dokusu ışık mikroskopisi görüntüleri, hematoxilen ve eosin boyama	73
Şekil 9: KL+KROM grubu karaciğer dokusu ışık mikroskopisi görüntüsü, hematoxilen ve eosin boyama	74
Şekil 10: Karaciğer mast hücreleri dağılımı, immünohistokimyasal boyama.....	77
Şekil 11: Cilt mast hücreleri dağılımı, immünohistokimyasal boyama.....	78
Şekil 12: Periton mast hücreleri dağılımı, immünohistokimyasal boyama	79

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 1: Deneklerin deneyin 1. gün ve 10. gün ağırlık ölçümleri ortalamaları.....	65
Grafik 2: Grupların 5. gün ve 10. gün kaşınma davranışı gözlemleri	66
Grafik 3: Grupların ortalama plazma total safra asitleri düzeyi	67
Grafik 4: Grupların ortalama serum histamin ve ototaksin düzeyleri	68
Grafik 5: Plazma ALT ve ALP değerleri karşılaştırması	70
Grafik 6: Plazma total ve direkt bilirubin değerleri karşılaştırması.....	71
Grafik 7: Grupların karaciğer, cilt, periton dokusu mast hücre dağılımları	75



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolestaz, safra asitleri (SA), kolesterol ve bilirubinler gibi safra bileşenlerinin intrahepatik birikimi ile sonuçlanan safra sekresyonu ve akımında azalma yada duraklama olarak tanımlanmaktadır. Kolestazın, genetik ve otoimmün bozukluklar, maligniteler gibi SA transportunun herhangi bir düzeyde kesilmesine neden olan çeşitli sebepleri olabilir. (1). Obstrüktif kolestaz, ana safra kanalının yada dallarının tıkanması sonucu oluşur ve safra akımının azalması, safra asitlerinin hepatik birikimi, progresif karaciğer hasarı ve fibrozis gelişimi ile ilişkilidir.

Safra akışının tıkanması ile biriken safra asitleri, hepatositlerdeki inflamatuvar sinyal yolları ile oksidatif stresle ilişkili genlerin uyarılmasına neden olur. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve inflamatuvar mediatörlerin doğrudan ve dolaylı etkisi ile safra asitleri, hepatik stellat hücrelerinin (HSCs) myofibroblastlara (karaciğer fibrozisi gelişiminde önemli bir olay) proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarabilmektedir. Karaciğer fibrozisi, hepatosit bütünlüğünü bozan, artmış ekstrasellüler matriks (ECM) depozisyonu, ekstrasellüler boşlukta artmış kollajen birikimi ile karakterize bir durumdur ve karaciğer yetmezliğine neden olan karaciğer sirozu ile sonuçlanabilir. (2)

Hepatik inflamasyon, hem insanlarda hem de deney hayvanlarında kolestatik karaciğer hastalıklarının önemli bir özelliğidir. Obstrüktif kolestazın inflamatuvar özellikleri portal trakt ödemi, portal traktta nötrofil, lenfosit ve mast hücre infiltrasyonu, porta-portal septa gelişimi, angiogenesis, biliyer epitel hücre hiperplazisi ve hatta malign transformasyon olarak sıralanabilir. (3)

Sıçanlarda koledok ligasyonu ileindüklenen karaciğer fibrozu, insandaki primer veya sekonder olarak gelişen karaciğer fibrozuna uygunluğu ve hızlı gelişmesi sebebiyle son zamanlardaki bilimsel çalışmalarda ilgi duyulan bir fibrozis modeli olmaktadır.

Sıçanlarda deneysel kolestaz modelleri şu şekilde sıralanabilmektedir: 1.endotoksin uygulaması (inflamatuvar kolestaz), 2.sentetik östrojen analogu etinil-östradiol enjeksiyonu (oral kontraseptif-ilişkili kolestaz, gebelik kolestazı), 3.alfa-naftilisosiyanat uygulaması (vanishing bile duct sendrom), 4.koledok ligasyonu (ekstrahepatik biliyer obstrüksiyon) (4).

Ratlarda koledok ligasyonu; karaciğer fonksiyon testlerinde bozulmalar, hemodinamik değişiklikler ve biliyer epitel hücrelerinde, hepatositlerde ve makrofajlarda proliferatif aktivite ile ilişkilendirilmiştir. (5)

Mast hücreleri, kemik iliğindeki pluripotent kök hücrelerinden gelişmekte, vücutta immatür hücreler olarak dolaşmakta ve hedef dokularına ulaştıklarında olgunlaşmaktadırlar. Olgunlaştıktan sonra bu hücreler; kök hücre faktör reseptörlerini, fibroblast büyümesini destekleyen mediatörleri, proteazlar, kimaz ve triptaz dahil olmak üzere çeşitli faktörleri eksprese eder ve salgırlar, ayrıca fibroblast ve stellat hücrelerden ECM üretimini uyarırlar. (6; 7). Mast hücreleri kardiyak doku, gastrointestinal trakt, karaciğer dahil çeşitli doku ve organlarda bulunabilirler. (6). Hepatik mast hücre sayısının; kolanjiopatiler, hepatit, fibrozis ve siroz gibi progrese karaciğer hastalıklarında arttığı görülmüştür. (6; 7). Mast hücre aracılı allerjik bozukluklarda iyi bilinen bir pruritojen olan histamin, kolestatik kaşıntıda rol oynayabilmektedir (8)

Son çalışmalara göre lisofosfatidik asit (LPA)-potansiyel bir nöronal aktivatör- ve ototaksin (ATX) -LPA'yı oluşturan enzim- kolestatik hastalarda pruritojenik sinyal kaskadı için anahtar unsur olabileceği, serum ATX düzeyinin kaşıntı yoğunluğu ile korele bulunduğu ve terapötik müdahalelere yanıt verdiği öne sürülmüştür. (9)

Kaşıntı, başta kolestatik formları olmak üzere birçok karaciğer hastalığına eşlik eden bir semptomdur. Kolestatik kaşıntı ılımlı ve tolere edilebilir düzeylerde olabileceği gibi generalize, şiddetli ve dirençli olabilmekte, kişilerin yaşam kalitesini dramatik olarak bozabilmekte ve hatta karaciğer transplantasyon endikasyonu oluşturabilmektedir. (4). Kolestatik kaşıntı tedavisinde safra tuzu reçineleri, rifampisin, opioid antagonistleri, serotonin antagonistleri, antihistaminik ilaçlar, ursodeoksikolik asit kullanılmakla birlikte bu alanda çalışılan deneysel hayvan modellerindeki yetersizlik antipruritik ajanlara yönelik araştırmaları kısıtlamaktadır.

Bu çalışmada amaç; koledok ligasyonu ile deneysel kolestaz oluşturulan rat modelinde, mast hücre stabilizatörü bir ajan olan kromolin sodyumun deneysel kolestazda biyokimyasal ve histopatolojik olası iyileştirici etkilerini incelemek, kolestatik kaşıntı üzerine etkinliğini araştırmak ve bu etkinliğin derecesini bu alanda kullanılan bir grup terapötik ajanın etkinliği ile karşılaştırmaktır.

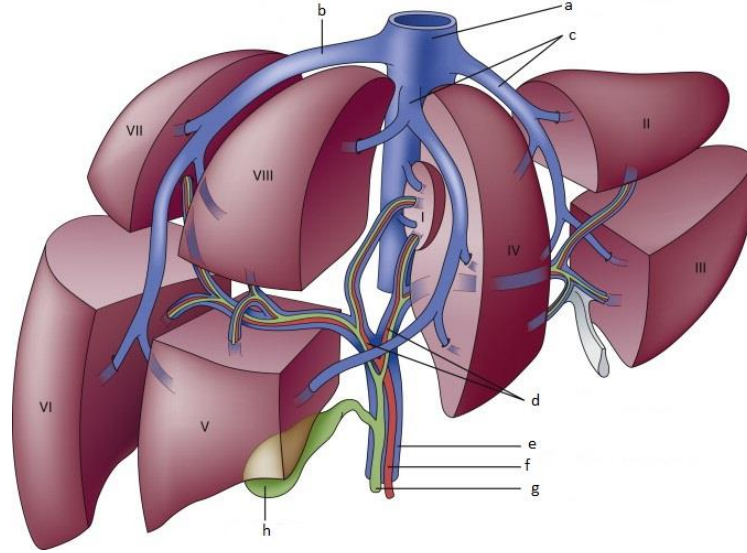
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer Anatomisi Ve Histolojisi

2.1.1. Karaciğerin Anatomisi

Karaciğer eksternal yüzeyine göre sağ, sol, kaudat ve quadrat loblar olmak üzere 4 loba ayrılır. Ön yüzde, falciform ligament karaciğeri sağ ve sol anatomik loblara ayırır. Alt yüzde, quadrat lob safra kesesi fossası, porta hepatis ve ligamentum teres hepatis tarafınca sınırlandırılır. Caudat lob inferior vena cava oluşu, porta hepatis ve ligamentum venosum fissürü ile belirlenir. (10) Karaciğer yaygın olarak bu şekilde 4 loba ayrılıp isimlendirilmesine rağmen gerçek strüktürel yapılanmaya göre fonksiyonel lob isimlendirilmesi daha farklı yapılmaktadır. (11)

Karaciğerin gerçek sağ ve sol lobu kabaca eşit boyutlarda olup falciform ligament tarafından değil de safra kesesi yatağı ile inferior vena cava oluşu arasında uzanım gösterdiği varsayılan bir düzlem tarafınca birbirinden ayrılır ve bu düzlem Cantlie hattı olarak adlandırılır. (10; 12). Karaciğer arteriyel kan akımı, portal venöz kan akımı, biliyer drenaj ve hepatik venöz drenaj esas alınarak sağ ve sol fonksiyonel loblara ayrılır, her bir lob da ikişer segmente ayrılır ve bu segmentlerin herbiri de ikişer subsegmente ayrılır. (12). Subsegmentlere ayırmada birçok sistematik bölme tanımlanmış olmasına rağmen sıklıkla kullanılanlar portal ve hepatik ven dağılımını temel alan Couinaud sınıflaması (13) ve safra duktus dağılımını temel alan Healey ve Schroy sınıflamalarıdır. (14). Bu sistematik sınıflamalara göre subsegmentler 1 den 8 e numaralandırılır, caudat lob subsegment 1 olmak üzere diğer subsegmentler saat yönü paternine göre sıralanır (10) (Şekil 1).



Şekil 1 : Karaciğerin Subsegmentleri

a) vena cava inferior, b) sağ hepatik ven, c) sol ve orta hepatik venler, d) sağ ve sol hepatik arter, e) portal ven, f) hepatik arter, g) koledok, h) safra kesesi (15)

Karaciğer kan akımının yaklaşık %70'i ve oksijenlenmesinin yaklaşık %40'ı portal venden sağlanırken; kan akımının yaklaşık %30'u ve oksijenlenmesinin yaklaşık %60'ı hepatik arterden sağlanır. (16). Portal ven, süperior mezenterik ven ve splenik venin birleşimiyle oluşur ve hilus bölgesinde karaciğerin sağ ve sol loblarına gidecek şekilde sağ ve sol ana dallarına ayrılır. (17; 11). Hepatik arter sıklıkla çöliak trunkustan dallanmasına rağmen nadiren de olsa doğrudan süperior mezenterik arterden dallanabilir. Sol hepatik arter, sol gastrik arterden ayrılırken; sağ hepatik arter, süperior mezenterik arterden ayrılır. (17). Hilus bölgesinde hepatik arter, portal venin önünde ve safra kanalının solunda uzanır. Karaciğerin arterleri, sağ ve sol portal venler ve safra kanalları fibröz yapıda bir kılıf olan Glissonian kapsülü ile sarılı iken hepatik venler bu yapının dışında kalır. (12). 3 major hepatik ven, inferior vena cava'ya drene olurken insanların %60-85'inde sol ve orta hepatik venler birleşim yaptıktan sonra inferior vena cava'ya drene olur. (11; 12; 17)

Ekstrahepatik biliyer ağaç; sağ ve sol hepatik duktuslar, ortak hepatik duktus, sistik kanal, safra kesesinden oluşur. Sağ ve sol hepatik duktuslar sırasıyla karaciğerin sağ ve sol lobunu drene ederler. Sağ ve sol hepatik duktusun birleşimiyle ortak hepatik duktus oluşur. Caudat lob genellikle sağ yada sol hepatik duktusun orijin bölgesine drene olur. Sistik kanal genellikle ortak hepatik kanalın orijin bölgesinin altından lateraline drene olur. (18)

2.1.2. Karaciğerin İnnervasyonu

Karaciğerin sempatik veya adrenerjik sinir lifleri, kan damarları ve daha az oranda da safra kanalları etrafında zengin bir pleksus oluşturur. Bu pleksusun dalları özellikle periportal bölgede sinusoidal duvarları boyunca ilerledikleri lobülleri innerve eder. Parasempatik (kolinerjik) sinir uçları ise hepatik arter, portal ven ve hepatik venin ekstrahepatik ve intrahepatik dallarını innerve ederken sadece birkaç sinir lifi hepatositlere ulaşır. (19). İntrinsik sinir ağı hepatik kan akımının sağlanması, biliyer fizyoloji ve metabolik olayların regülasyonundan sorumludur. Bununla birlikte, karaciğer transplantasyonundaki gelişmeler ile birlikte, denerve allogreftin yeterli işleyişi göz önüne alındığında, hepatik sinir sisteminin önemi sorgulanmaya başlanmıştır. (20; 21)

2.1.3. Karaciğerin Lenfatik Dolaşımı

Karaciğerin yüzeyel lenfatik akımı karaciğerin konveks yüzeyinden sağ yada sol trianguler ligamente ve falsiform ligamente doğrudur. Diyaframı geçerek prekardiak, superior frenik ve jukstaözefagial lenf nodlarına drene olurlar yada sağ veya sol frenik arterle birlikte seyrederek çöliak lenf nodlarına dökülürler. (22). Karaciğerin visseral yüzeyinin lenfatik akımı hepatik lenf nodlarına dökülür. Caudat lobun lenfatik drenajı prekaval lenf nodlarına olur. Karaciğerin derin lenfatik damarları, epiploik foramendeki foraminal nodlara ve superior pankreatik nodlara dökülmek üzere porta hepatisde karaciğeri terkeder. Hepatik venlerle birlikte karaciğerden ayrılan lenfatik damarlar inferior vena kava ile birlikte seyrederek. (22)

2.1.4. Karaciğerin Histolojisi

Karaciğerin büyük çoğunluğu hepatositlerin tabakalar halinde dizilmesinden yada muralium olarak isimlendirilen ve sinüzoidler tarafınca ayrılan bir veya iki hücre tabakasından oluşur. Hepatositler farklı boyutlardan oluşan yuvarlak nukleuslar içeren çift çekirdekli poligonol hücrelerdir. Parankimdeki portal trakt; hepatik arteriol, portal ven ve safra kanalı triadından oluşmaktadır ve bu triada sinif lifleri ile

lenfatik dolaşım eşlik etmektedir. Terminal hepatik arterioller ve terminal portal venüller portal trakttan orijin almaktadır ve sinusoidlerin kan akımını sağlarlar. Sinusoidler; portal ve arterial kan akımı karışımını portal trakttan santral venler olarak da bilinen terminal hepatik venüllere doğru taşırlar. Bu terminal hepatik venüller de sublobuler venlere, oradan hepatik venlere ve en nihayetinde vena kava'ya dökülürler. (23)

Terminal portal venüllerin kas tabakası yoktur ve böylece sinusoidlerle olan bağlantı noktalarında bir sfinktere sahip değildir fakat bu bağlantı alanlarında büyük endotelial hücrelerin nükleusları lümeneye doğru yerleşimlidir ve hücreler kasılma yoluyla sinusoidlere olan kan akımını kontrol edebilirler. Yine benzer bir kontrol mekanizması sinusoidlerin terminal hepatik venlerle olan bağlantı noktalarında yer almaktadır. Terminal portal venüllerin aksine terminal hepatik arterioller düz kas tabakası ile çevrilidir ve böylece presinusoidal sfinkterlere sahiptirler. (21)

Sinusoidal endotelial hücreler, kan ve hepatositler arasındaki primer bariyer görevindedirler. Bu hücreler tek tip fenestralı hücrelerdir, bazal laminaları yoktur ve endositoz yetenekleri belli bir limiti aşamaz. (16). Fenestraların boyutları lobülün merkezinde ve periferinde birbirinden farklıdır. (24). Endotelial hücrelerdeki aktin filamentlerinin kasılması ile porların büyüklükleri kontrol edilmektedir. Kupffer hücreleri sinusoidleri çevreleyen makrofajlardır ve büyük partikülleri fagosite etme yeteneğine sahiptirler. (24). Periportal alandakiler perivenüler bölgeye göre daha büyük ve sayıca daha fazladır ve bu alandaki kupffer hücrelerinin fagositoz aktiviteleri daha güçlüdür. (16). Bu hücrelerin major rolü; kan akımını, yaşlanan kırmızı kan hücrelerinden, toksik endojen ve ekzojen maddelerden temizlemektir. (24). Fagositoz yeteneklerinin dışında kupffer hücreleri low-density lipoproteinleri yakalar ve hepatositlerin protein sentezini yöneten lenfokin mediatörleri ile inflamatuvar mediatörleri ve hepatosit koruyucu prostaglandinleri üretirler. (21)

Daha önceleri Ito hücreleri yada yağ depolayıcı hücreler olarak bilinen hepatik stellat hücreleri yağ metabolizmasında görev alan ve vitamin A depolanmasından sorumlu olan perisinusoidal hücrelerdir. (21). Bu hücreler sinusoidal alanı çevreleyerek lümenin genişliğini kontrol edebilirler. Hepatik stellat

hücreler aktive olduklarında desmin ve düz kas aktin üretimi yapan miyofibroblastlara dönüşürler. (16)

Perisinusoidal boşluk, bir diğer deyişle disse aralığı, sinusoidal hat ile hepatositlerin vasküler polü arasında yer alır ve fenestralar aracılığıyla sinusoidal boşluk ile iletişim halindedir. Bu boşluk, plazma ve organın yapı taşını oluşturan kollajen tip I, III, IV ve V'i ihtiva eder. (21)

Mall aralığı, periportal hepatositler ve portal bağ doku arasındaki boşluktur. Lenfatik sıvı öncelikle disse aralığında toplanır ve sonrasında lenfatik damar ağına geçmeden önce mall aralığına geçer. (16).

Hepatositlerin bir yanı sinusoidleri sınırlarken diğer yanı da safra kanaliküllerini sınırlar. Kanaliküller safrayı kısmen hepatositlerden kısmen de kolanjiositlerden oluşan terminal Hering kanallarına taşır. Hering kanalları portal traktın limiting plate bölgesinde sonlanmaz, lobullerin periportal bölgesine kadar uzanır ve kolanjiositlerden oluşan safra duktullerine girer. (25). Duktuliler interlobuler safra kanallarına bağlanır, interlobuler safra kanalları da septal safra kanallarına ve oradan hepatik safra kanallarına bağlanırlar. Histolojik olarak daha küçük olan duktuslar kuboid epitelle, daha büyük olanlar ise kolumnar epitelle döşelidir. (23)

2.2. Karaciğerin Parankim Yapılanması Ve Hücre Tipleri

2.2.1. Karaciğerin Parankim Yapılanması

Karaciğerin klasik lobul tanımı ortada santral ven ve üç köşesinde portal traktların bulunduğu hegzagonal yapı olarak 1833 yılında Kiernan tarafından yapılmıştır. Mall ise, çoğu gland yapısı fonksiyonel ünitelerinin merkezinde bir kanal yapısına sahip olduğu için karaciğerin temel ünitesi olarak portal üniteyi santralde portal trakt ve periferinde santral venlerden oluşan yapı olarak tanımlamıştır. (21). Karaciğer asinus yapısı 1954 yılında Rappaport tarafından terminal portal afferent damar ve arteriyel damarların etrafındaki parankim yapısı olarak tanımlanmıştır. Asinus yapısının periferinde birçok asiniyi drene eden terminal hepatik venül (santral ven) bulunur. Bu modele göre sırasıyla şu zonlar ortaya çıkar;

1. Periportal zon yada zon 1; kan oksijen konsantrasyonu yüksektir.
2. İntermediae zon yada zon 2
3. Perivenüler zon yada zon 3; görece daha düşük oksijen konsantrasyonuna sahip kanı içerir. (21)

Asinus yapısı; köprüleşme nekrozu yada fibrozis gibi histolojik değişimlerin tanımlanmasını kolaylaştıran bir fonksiyonel ve strüktürel üniteyi temsil etmektedir. (16). 1982'de Matsumoto ve Kawakami karaciğerin damarsal yapılanmasına dayalı bir karaciğer mimarisi görüşünü öne sürmüşlerdir. (26). Bu konseptte göre; portal ve hepatik venöz sistemler, parankimin kan akımını ve drenajı sağlayan iletici bölümler ile primer lobülün temelini oluşturan parankimal bölümlere ayrılmıştır. Portal ve hepatik venöz sistemin parankimal bölümleri oldukça küçük yandallardan oluşmaktadır ve bu dallar sonrasında iletici bölümün terminal dallarını oluşturmaktadır. Portal venöz dallar, hepatik venöz dallara göre çok daha fazla yandallara ayrılır ve bunun sonucunda her bir hepatik venöz kanal için çok sayıda portal venöz kanal oluşur. Portal venöz sistem dallanmasının son kısmı septal dallar olarak bilinir. Santral ven; yaklaşık 6 ila 8 adet inflow üniteye karşılık gelen venülün biraraya gelmesi ile şekillenir. Septal dal ile beslenen ve hepatik ven dalı ile drene edilen konik hepatosit kümesi ile 'primer lobül' oluşur, çok sayıda primer lobülün biraraya gelmesi ile de klasik lobül şekillenir. (23). Ayrıca, Matsumoto ve Kawakami septal dallardan oluşan sinusoidlerin santral vene doğru radyal uzanımına geçmeden portal trakt yakınlarında transvers seyir gösterdiğini ve bu transvers sinusoid damar yatağının asinus modelinde ileri sürülenden farklı olarak lobülün perfüzyonu için 'orak şekilli' bir ön giriş akımı oluşturduğunu da eklemiştir. (26). Bu orak şekilli konveks alanlar portal traktlara bitişiktir, kolları septal dallara kadar uzanmaktadır ve konkav şekilli alanlar da santral ven ile karşı karşıya gelmektedir.

Bu düzenleme ile 2 zon tanımlanır:

1. Orak şekilli alanların birleşmesiyle oluşan klasik lobülün periferik kısmı
2. Orak şekilli alanlar tarafından sınırlandırılan bölgede oluşan sentrilobuler alan

Hepatik enzimlere yönelik immünohistokimyasal çalışmalar ve karaciğerin kronik pasif konjesyonu ve yağlanması görülen sentrilobuler nekroz gibi patolojik süreçler; portal traktlar ve terminal afferent damarların etrafında sürekli bir

periportal iletişim ağı ile santral ven etrafında farklı bir eş merkezli perivenöz alanın varlığını vurgulamaktadır ki bu da karaciğerin mimari yapısının asinus yapısından çok klasik lobul tanımına benzediğini desteklemektedir. (23)

2.2.2. Karaciğerin Hücre Tipleri

Karaciğer hücreleri 3 grupta incelenebilir:

1. Parankimal hücreler (hepatositler ve safra kanalı epitelyal hücreleri)
2. Sinusoidal hücreler (hepatik sinusoidal endotelyal hücreler ve Kupffer hücreleri)
3. Perisinusoidal hücreler (hepatik stellat hücreler ve Pit hücreleri)

Karaciğer hücrelerinin çeşitli grupları arasındaki fonksiyonel bütünleşmeler doğrudan hücre-hücre iletişimi ile (örneğin gap-junctionlar ile), komşu hücreleri etkileyen parakrin salgı ile, ekstrasellüler matriks etkileşimleri, endokrin ve metabolik çözünür maddelere genel yanıtlar üzerinden sağlanmaktadır. (27)

Hepatositler ve hepatik sinusoidal endotelyal hücrelerin sürekli yapıda bir bazal membranı yoktur ve hücreler arası ilişki ekstrasellüler matrix etkileşimleriyle yürütülmektedir. Hepatik ekstrasellüler matriks komponentlerinin üretimi hepatositlerin migrasyon yolağı boyunca gelişimleri esnasında olmaktadır. Stellat hücreler, hepatositler ve bir dereceye kadar da endotelyal hücreler karaciğerde ekstrasellüler matriksin üretiminden major sorumlu olan hücrelerdir. Konnektif dokunun aşırı üretimi hemodinamik instabiliteye ve sonuç olarak da karaciğer fonksiyonlarının bozulmasına neden olmaktadır. (28). Ekstrasellüler matriks komponentleri arasında kollajenler, non-kollajenöz glikoproteinler ve proteoglikanlar yer alır. Karaciğer dokusunda 5 tip kollajen (I, III, IV, V, VI) ve 7 ayrı sınıf non-kollajenöz glikoprotein (fibronektin, laminin, entaktin/nidojen, tenaskin, thrombospondin, SPARC [secreted protein, acidic, and rich in cysteine] ve undulin) bulunmaktadır, ayrıca çok sayıda proteoglikan ile membran ilişkili-sindekan, thrombomodulin gibi glikozaminoglikanlar, betaglikan ve ekstrasellüler matriks ilişkili-versikan, biglikan, dekorin, fibromodulin, perlekan da yer almaktadır. (27)

2.2.2.1. Parankimal Hücreler

Hepatositler, çapları yaklaşık 20-30 µm olan büyük polihedral hücrelerdir. Yetişkin karaciğer hücre populasyonunun %60'ını oluşturmaktadırlar ve karaciğer doku hacminin %78'inden sorumludurlar. (29). Sentez ve metabolik aktiviteleri ile uyumlu olarak hepatositler organellerden zengindirler. İnsan hepatositlerinin yaklaşık %30'u iki çekirdeklidir. Hepatositler, polarize epitelyal hücrelerdir ve plazma membranları 3 ayrı domain içermektedir:

1. Sinusoidal yüzey (hücre membranının %37'si); hepatic sinusoidal endotelyal hücrelerden özelleşen fenestralar aracılığıyla plazma ile doğrudan etkileşim halindedir.
2. Kanaliküler yüzey (hücre membranının %13'ü); safra kanaliküllerini çevrelemektedir.
3. Kontagiyöz yüzeyler

Glandüler epitelyum ile benzer şekilde sinusoidal, kanaliküler ve kontagiyöz plazma membran yüzeyleri sırasıyla bazolateral, apikal ve lateral yüzeyler olarak da adlandırılmaktadır. (30). Sinusoidal ve kanaliküler yüzeyler, yüzey alanlarını oldukça genişleten mikrovillus yapılarına sahiptir. Endotel ile sinusoidal villuslar arasında kalan bölge 'disse aralığı' olarak adlandırılmaktadır. Sinusoidal yüzeyde, sıvı ve solütlerin plazma ve hepatositler arasında çift yönlü alış-veriş yapılmaktadır. Moleküler transfer, kolaylaştırılmış difüzyonu yada enerji gerektiren aktif transportu düzenleyen proteinler aracılığı ile birçok durumda artırılmaktadır. İki komşu hepatosit arasında kalan kanaliküler yüzey, periferde yer alan tight-junctionlar (desmosom) ile sınırlandırılmıştır; böylece biliyer drenaj sisteminin başlangıcı olan safra kanalikülleri sınırlandırılmış olur. Sinusoidal yüzeyde çift yönlü geçiş olmasına rağmen hepatositlerden safra kanaliküllerine akış ağırlıklı olarak tek yönlüdür. (23)

Safra kanalı epitelyal hücreleri, bir diğer deyişle kolanjiositler, büyüklü küçüklü değişik boyutlarda hücreleri ihtiva etmektedir ve hücre hacimleri kabaca intrahepatik safra kanallarının çapı ile koreledir. Büyük kolanjiositler, küçük çaplı olanlara göre daha gelişmiş bir endoplazmik retikuluma ve daha küçük nükleus/sitoplazma oranına sahiptirler. Sitokrom P-450 ilişkili monooksijenaz aktivitesindeki ekspresyon yetersizliği küçük kolanjiositlere kimyasallara karşı hayatta kalma avantajı sağlar. Örneğin; karbon tetraklorür'ün sitokrom P450 2E1-

aracılı oluşan toksik ara ürünleri büyük kolanjiositlerde fonksiyon kaybına yol açarken küçük kolanjiositler toksik injuriye karşı dirençlidirler. (23)

Safra kanalları sadece biliyer drenajı sağlayan pasif kanallar değildir, aynı zamanda biliyer komponentlerin sekresyon ve absorpsiyonu ile ekstrasellüler matriks bileşiminin regülasyonunda da rol oynarlar. Kolanjiositler oldukça polarizedir. Sodyum-bağımlı bir apikal safra tuzu taşıyıcısı (ABAT) konjuge safra asitlerinin kolanjiosite alınmasına aracılık ederken; bazolateral yüzeyde yer alan alternatif bir protein de safra asitlerinin sodyum-bağımsız şekilde akışını düzenler. Apikal kısımda lokalize olan sodyum-bağımlı glukoz taşıyıcı (SGLT) ile bazolateralde yer alan kolaylaştırıcı bir glikoz taşıyıcı olan GLUT1 safradan glikoz reabsorpsiyonundan sorumludurlar. Aquaporin-1 proteini, apikal ve bazolateral yüzeylerde yer alıp su kanallarının oluşumunu sağlamaktadır ve bu kanallar da suyun safraya hormon-aracılı taşınımında görevlidirler. Pürinerjik reseptör (P2u) klorid iyon taşınmasını stimüle etmektedir. ATP ile apikal P2u aktivasyonu kalsiyum depolarını harekete geçirir ve böylece hepatositlerden klor akışı stimüle olur. Büyük kolanjiositler sekretin ve somatostatin reseptörlerini, klorid/bikarbonat değiştiriciyi ve kistik fibrozis transmembran regülörünü eksprese ederler, bu da bu grup kolanjiositlerin sekretin ve somatostatin salgısına yanıt olarak su ve elektrolit sekresyonunu modüle etmesine olanak sağlar. (23)

2.2.2.2. Sinusoidal Hücreler

Hepatik sinusoidal endotelial hücreler (HSEC), karaciğer hücrelerinin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. Bu hücreler fenestraları ile ayırılmazlar. Kapiller endotelial hücrelerden farklı olarak intrasellüler bağlantılar geliştirmezler ve sadece birbirleriyle örtüşürler. Fenestralarının varlığı ve basal membranlarının olmaması plazmanın disse aralığına girmesine ve sinusoidal yüzey ve hepatositlerle doğrudan temasına olanak sağlar. (31). Fenestra çapları, hücre iskeletinin aktin içeren bileşenleri tarafından kimyasal ortamdaki değişikliklere yanıt olarak aktif olarak kontrol edilir. (32). Böylece hepatic sinusoidlerin özelleşmiş endotelial tabakası, kan ve hepatositler arasında selektif bir bariyer görevi görür. Hepatik endotelial hücreler prostaglandinleri ve interlökin (IL)-1, IL-6, interferon, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), endotelin gibi çok sayıda proteini sekrete edebilir. (23)

Kupffer hücreleri, özelleşmiş doku makrofajlarıdır ve vücuttaki toplam fikse makrofajların yaklaşık %80 ila %90'ını oluştururlar. Bu hücreler kemik iliğindeki kök hücrelerden yada monositlerden derive olurlar ve portal kan akımı ile barsaklardan gelen kandaki partikül, toksik madde yada yabancı substratların yok edilmesinde oldukça aktiftirler. (33). Kupffer hücreleri sinusoidal lümende lokalizedir ve endotelial hücrelerle doğrudan temas halindedir. Dikensi çıkıntıları olan mikropinositik veziküllere, tüysü yapıları vakuoller ile pinositoz ve fagositoz yapan hücrelere spesifik olan solucansız hücre iskeletine sahiptirler. Lizozomlarının fazlalığı, kan akımından alınan yabancı maddelerin degradasyonundaki baskın rollerini yansıtmaktadır. Kupffer hücreleri, konak savunma mekanizmalarında görev alan ve bazı karaciğer hastalıklarının patofizyolojik süreçlerinde rolü olan çok sayıda proteini sekrete etmektedir. Karaciğerin kimyasal, infeksiyöz ve immünolojik hasarlanmalarında kupffer hücreleri sayıca artmaktadır. (23)

2.2.2.3. Perisinusoidal Hücreler

Hepatik stellat hücreler (HSC), Ito hücreleri, vitamin-A depolayıcı hücreler, yağ-depolayıcı hücreler yada lipositler olarak da bilinirler. Bu hücreler, pankreas, barsak, böbrek ve akciğerde de benzer şekilde yer alan stellat hücre sisteminin bir parçasıdır. Endotelial tabaka ile hepatositler arasında lokalize olan bu mezankimal hücreler, karaciğerin toplam hücre havuzunun %5 ila %8'ini oluşturmaktadırlar ve hepatic sinusoidlerin mikroçevresindeki homeostasisi sağlayan parakrin, otokrin, jukstrakrin ve kemoatraktan faktörlerin kaynağıdır. Pasif haldeki stellat hücreler, mikroflaman ve mikrotübüllerden zengin, düz sitoplazmik uzantılarında vitamin-A bakımından zengin lipit damlacıkları biriktiriler ve diğer hücrelerle temas edecek şekilde endotelial yüzeye paralel olarak uzanırlar. (34). HSC'ler retinol bağlayıcı protein için reseptörler ekspres ederler. (35). Kronik karaciğer hasarı sonrası az sayıda yıldız şekilli stellat hücresi myofibroblastlar olarak aktive olurlar, retinoidlerini kaybederler ve ekstrasellüler matriks komponentlerini kollajen, proteoglikan, adheziv glikoproteinler olarak up-regüle ederler. Stellat hücre aktivasyonu, hepatic fibrozisin temelini oluşturur. (28). HSC'lerin aktivasyonu; komşu sinusoidal endotelial hücreler, Kupffer hücreleri, endotelial hücreler, hepatositler, trombositler ve lökositlerden gelen parakrin etkiyle başlar. Endotelial

hücreler, sellüler fibronektin üretimi yaparak ve latent haldeki transforming growth faktör- β 'yi (TGF- β) aktif hali olan profibrojenik forma dönüştürerek stellat hücre aktivasyonuna katılırlar. TGF- β 'nın HSC'ler üzerinde bulunan reseptörlerine bağlanması aktivasyondaki kritik rolü oynar. Barsaktan karaciğere gelen bakteriyel lipopolisakkaritlerin (LPS) Toll-like-reseptör 4'e (TLR4) bağlanması TGF- β 'nın HSC'ler üzerindeki etkisini iki farklı mekanizma ile arttırır. (36). Öncelikle stellat hücrelerinden artmış kemokin ekspresyonu, TGF- β sekrete eden Kupffer hücrelerinin kemotaksisi ile sonuçlanır. İkincil olarak da LPS'lerin TLR4'e bağlanması ile nukleer faktör kappa B'ler (NF- κ B) bir ara protein olan MyD88 (myeloid differentiation response protein) aracılığı ile aktive olur ve HSC'ler TGF- β sinyallerine karşı sensitize olurlar. (23). Ekstrasellüler matrtiksin üç-boyutlu strüktürel yapısı, muhtemelen hücre yüzey integrinlerine bağlanarak aktarılan sinyal transdüksiyonu üzerinden HSC'lerin şekil, sayı ve fonksiyonlarını modüle etmektedir. HSC'lerin aktivasyonu stimulanların sürekli etkisi ile devam eder ve bu hücre davranışında proliferasyon, kontraktilite, ekstrasellüler matriks proteinlerinin (kollajen I, III, IV, V, VI; laminin; tenaskin; undulin; hyaluronik asit ve proteoglikanlar) aşırı ekspresyonu, metalloproteinazların salınımıyla matriks degradasyonu, lökosit kemoatraktanlarının ve sitokinlerin salınımı gibi birçok farklı olaya öncülük eder. Fibrozis esnasında HSC'lerin total sayısı, proliferasyon ve apoptozis arasındaki dengenin çözünebilir büyüme faktörleri ve matriksten etkilenmesiyle artar. (23)

Pit hücreleri -karaciğerin natural killer (NK) hücreleri, Kupffer hücrelerinin yakınında, sinusoidal lümeninde yer alırlar. Büyük lenfositler gibi görünürler ve sinusoidal duvara sıklıkla villöz uzantıları (psödopod) ile tutunmuş halde bulunurlar. (37). İnsan karaciğer pit hücreleri belirgin polariteye sahiptir ve yoğun granüller içeren bol sitoplazmaları, belirgin bir hücre merkezleri, hyaloplazmik psödopodları ve üropodları olması ile karakterize bir lokomotif şekilleri vardır. Sitoplazmik granülleri mikroskopik olarak çukur şeklinde görünmektedir ve bu hücreler adını buradan alır. Pit hücreleri kısa ömürlüdürler ve ekstrahepatik kaynaklar aracılığı ile yerlerine yenileri eklenir. (23). Dolaşımdaki NK hücreleri gibi pit hücreleri de OX-8 antijeni eksprese eder, bazıları da asialogangliosit gangliotetrasylseramid sentezler. Pit hücreleri , dolaşımdaki NK hücrelerinden salgılanan pan-T-cell marker ve OX-19 antijenini salgılamazlar. Pit hücrelerinin kaynağı tartışmalı olmakla birlikte diğer

visseral yapılarıdaki NK hücreler ile antijenik olarak benzerlik göstermektedirler. Pit hücreleri, karaciğerde tümör hücresi öldürücü etkiye sahiptir ve virus-enfekte karaciğer hücrelerini yok ettiği de ön görülmektedir. Hücre başına sahip oldukları sitolitik etki, dolaşımdaki NK hücrelerine göre oldukça fazladır. Ayrıca bu hücrelerin karaciğer hücrelerinin büyüme ve diferansiasyon ile karaciğer graft rejeksiyonundan sorumlu oldukları düşünülmektedir. (38)

2.3. Safra Yolları Anatomisi Ve Histolojisi

2.3.1. Safra Kanalları

Yetişkin bir insan karaciğeri 2 km uzunluktan daha fazla büyüklükte duktuli ve duktus yapısına sahiptir. Kantitatif bilgisayar destekli 3 boyutlu görüntülemeler üzerinden insan karaciğeri duktus sisteminin makroskopik toplam çapı ortalama 20.4 cm olarak tahmin edilmektedir. (39). Bu görüntülemelerde ortalama internal yüzey alanı 398 cm² olarak hesaplanmış olup, bu değer kolanjiositlerin apikal yüzeyinde yer alan ve kolanjiosit fonksiyon regülasyonunda önemli rolleri olan mikrovilluslar ve silyalar aracılığı ile yaklaşık 5,5 kat artırılmaktadır. Bu strüktürel yapılar durağan kanallar olmayıp safranın akışını ve yapısını sekretin gibi hormonlara yanıt olarak değiştirebilme yeteneğindedirler. (40). Safra duktulilerinin genel bir özelliği, onlara kompartmanlar arası selektif madde değişimi avantajını sağlayan portal kan akımı ve lenfatik dolaşıma anatomik olarak yakın konumlu olmalarıdır. Küçük ve büyük çaplı safra kanallarını kaplayan kolanjiositler arasında yapısal olarak bir farklılık olmamakla birlikte fonksiyonel özellikler açısından heterojenite söz konusudur. (41). Örneğin; büyük intrahepatik safra kanalları sekretin ile uyarılan safra kanalı sekresyonunda görev alırken küçük olanlar bu fonksiyona sahip değildirler. (42).

Safra sekresyonu, biliyer ağacın en küçük dalı olan safra kanaliküllerinde başlar. Bu kanaliküllerin sınırları bitişikteki karaciğer hücrelerinin apikal kutuplarından özelleşen bir membran yapısı ile şekillenir. Kanaliküller, çok sayıda anastomotik ara bağlantı ile hepatositler arasında poligonal bir kanal ağı oluştururlar. (43). Safra, sonrasında bazal membranı olan , hepatositler ve kolanjiositlerle döşenmiş olan küçük terminal kanallara (hering kanalları) geçer. (44). Hering kanalları, safranın daha geniş olan perilobuler yada intralobuler kanallara

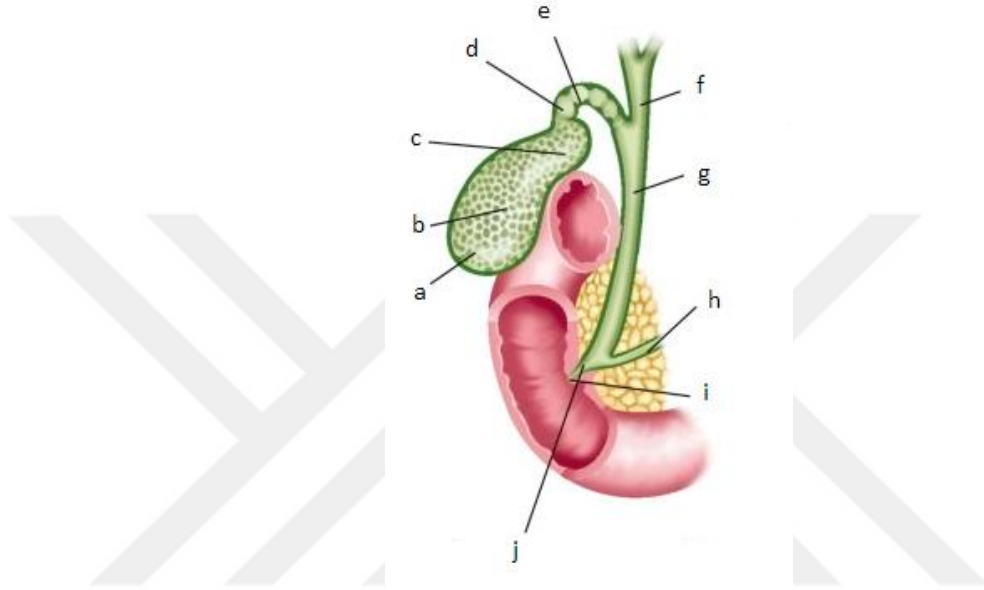
hepatositlerin limiting plate bölgelerinden geçişini sağlar. Biliyer ağacın en küçük dalı olan bu safra kanaliküllerinin çapı 15-20 µm'den daha az olup lümenleri küboidal epitelyal hücrelerle çevrilidir. En proksimalde bir yada birkaç fuziform şekilli duktuler hücre kanaliküler lümeni bir hepatositle birlikte oluştururken, portal kanala yaklaştıkça duktuliler 2 ila 4 küboidal epitelyal hücre ile çevrelenirler. Safra, santral lobuler hücrelerden portal triada (karaciğer asinus yapısındaki zone 3'ten zone 1'e) doğru akar. Kronik ekstrahepatik safra yolu tıkanıklığında terminal safra duktulileri proliferer olur. (23)

İnterlobuler safra kanalları portal veni yakınca çevreleyen dalları olan anastomozlarca zengin bir ağ oluştururlar. (45). Bu safra kanallarının çapları başlangıç kısımlarında 30-40 µm olup lümenleri küboidal epitelle yada luminal yüzeylerinde mikrovillus yapısına sahip olan kolumnar epitelle döşelidir. Hücreler, golgi cisimciklerinden zengindirler ve egzositoz-endositoz yolu ile maddelerin sitoplazma, safra ve plazma arasında değişimini sağlayan oldukça fazla sayıda veziküllere sahiptirler. (43). Bu kanalların çapı gittikçe artar ve karaciğer hilumuna yaklaştıkça düz kas liflerine sahip olurlar. Muskuler komponent, kolanjiografide de görüldüğü gibi kanalların bu düzeyde morfolojik olarak daralmasının temelini oluşturur. (46). Bununla birlikte kanallar progresif olarak genişledikçe epitelyum da kalınlaşır ve çevresindeki bağ dokunun elastik lif komponenti artarak bağ doku da genişler. Bu kanallar daha geniş hiler kanalları ve çapları 1-1,5 mm'e ulaşarak ana hepatik kanallara dönüşen intrahepatik safra kanallarını oluşturmak üzere anastomozlar yaparlar. (23)

Ortak hepatik kanal, herbiri 0,5 ila 2,5 cm uzunluğunda olan sağ ve sol hepatik duktusların birleşmesinden sonra porta hepatisten ortaya çıkar (Şekil 2). Sağ ve sol hepatik kanalın birleşme noktası %95 vakada karaciğerin dışındadır, bu kanallar nadiren karaciğerin içinde birleşir yada sistik kanal sağ hepatik duktusa katılana dek birleşmezler. (47)

Hepatik duktuslar porta hepatisten çıkar çıkmaz hepatoduodenal ligamentin iki seröz zarı arasında uzanırlar. Bu fibröz doku kılıfı hepatik kanalları komşu kan damarlarına bağlar. Yetişkin bir insanda ortak hepatik duktus yaklaşık olarak 3 cm uzunluğundadır ve genellikle sağ tarafından sistik kanal ile birleşerek ortak safra kanalını oluşturur. (47). Yine de sistik kanalın uzunluğu ve ortak hepatik duktusla

birleşme açısı çeşitlilik göstermektedir. Hastaların %70'inde sistik kanal, ortak hepatik kanala doğrudan katıldığı gibi bazı vakalarda da sistik kanal ortak safra kanalının anterior yada posteriorunda seyrettikten sonra safra kanalının etrafında dolanır ve sonrasında medial kısmından safra kanalına katılır. Sistik kanal bazen de ortak hepatik duktusa 5-6 cm paralel gittikten sonra duodenumun 1. kıtasının posteriorundan geçer ve sonrasında hepatik duktusa katılır. (23)



Şekil 2 : Ekstrahepatik Biliyer Trakt

- a) fundus, b) gövde, c) Hartmann poşu, d) boyun e) sistik kanal spiral valvleri,
f) ortak hepatik kanal, g) koledok, h) pankreatik kanal, i) ampulla vateri,
j) koledok ve pankreatik kanalın ekstraduodenal bileşkesi (23)

İnsanlarda, hilumdaki 1-1,5 mm çapındaki geniş intrahepatik safra kanalları anatomik olarak transvers fissüre karşılık gelen bir düzlemde çok sayıda, düzensiz yan dallar ve 150 ila 270 µm çapa ulaşan poşlar verir. (43). Bu yan dalların daha küçük çaplı poşları da mevcuttur. Birçok yandal kör bir poş olarak sonlanırken, özellikle hilumda yer alanlar birbirleriyle bağlantılar kurar. Bifurkasyon noktasında ana safra kanallarından gelen yandallar birleşerek bir pleksus oluştururlar. Bu pleksus yapılarının fonksiyonel önemi henüz anlaşılamamıştır. Poşlar safrayı depolama yada modifiye etme özelliği gösterirken biliyer pleksuslar safranın geniş safra kanalları arasında değişimine olanak sağlayan anastomozlar oluştururlar. (23)

Hepatik hilumda yer alan fibröz bağ doku tabakası, portal venin umblikal parçasını saran umblikal plate'i, safra kesesi yatağında yer alan sistik plate'i ve ligamentum venosumu saran Arantian plate'i içerir. (47). Hiler bölgenin sagittal kesit histolojik çalışmalarında sinir liflerini, lenfatik damarları, küçük kapiller damarları ve küçük safra kanallarını içeren bol miktarda konnektif doku olduğu gösterilmiştir. Plate sistemindeki safra kanalları ekstrahepatik safra kanallarına denk gelmektedir ve uzunlukları her segment için değişiklik göstermektedir. (47)

Barsaklar gibi sistik, ortak hepatic ve ortak safra kanalları da mukoza, submukoza ve muskuler tabakaya sahiptirler. (46). Kanallar tek tabakalı kolumnar epitelle döşelidirler. Mukus sekrete eden tubuler glandlar submukozada düzenli aralıklarla ve mukozal yüzeye açılacak şekilde yerleşmişlerdir. Ana safra kanalı yaklaşık 7 cm uzunluğunda, 0,5-1,5 cm çapında olup küçük omentumun katları arasında uzanır ve portal venin anteriorunda, hepatic arterin ise sağında yer alır. (47). Ekstrahepatik safra kanalının duvarı az miktarda düz kas lifleri ile karışım yapan bağ dokusu tarafınca desteklenir. Düz kas komponenti sadece safra kesesi boyun kısmında ve ana safra kanalının alt ucunda belirgin olarak görülmektedir. Ana safra kanalı pankreas başı hizasının arkasında bir çentikte duodenumun 1. kıtasının arkasından retroperitoneal olarak geçtikten sonra duodenumun 2. kıtasına giriş yapar ve oblik olarak seyrederek duodenal duvarın postero-medialinde seyrederek ampulla Vater'i oluşturmak üzere ana pankreatik kanal ile birleşir. Ampulla tarafından şekillenen müköz membran çıkıntısı bir yükselti oluşturur ve duodenal papilla adını alır. Hastaların yaklaşık %10-15 kadarında safra kanalı ve pankreatik kanal duodenuma ayrı ayrı açılmaktadır. Ana safra kanalı çapı pankreatik kanal ile birleşmeden 0,6 cm veya altına inelerek düşer. (23)

Duodenal duvar boyunca seyirleri esnasında ana safra kanalı ve pankreatik kanal longitudinal ve sirküler düz kas tabakaları ile sarılarak kalınlaşır ve Oddi sfinkteri oluşturulur. Bu strüktürde önemli bir varyasyon söz konusudur fakat genelde birçok parçadan bir araya gelirler:

1. Koledok sfinkteri; safra kanalının pankreatik kanal ile birleşmesinden hemen önce intramural kısmını saran sirküler kas tabakasıdır.

2. Pankreatik sfinkter; bireylerin yaklaşık olarak üçte birinde görülen ve pankreatik kanalın ampulla ile birleşmeden önceki intraduodenal kısmını çevreler.
3. Longitudinal fasikül; ana safra kanalı ile pankreatik kanal arasında kalan alanları sıkıca saran longitudinal kas demetleridir.
4. Ampulla sfinkteri; Vater ampullası etrafındaki seyrek yerleşimli sirküler kas liflerini çevreleyen longitudinal kas lifleridir. (46)

Koledok sfinkteri, safra kanalı lümenini daraltarak safranın akışını engeller. Longitudinal fasikülün kasılması, safra kanalının uzunluğunu azalmasına böylece safranın duodenuma akmasına yol açar. Ampulla sfinkterinin kasılması ile ampuller kıvrımlar birbirine yaklaşır ve intestinal içeriğin safra kanalına ve pankreatik kanala reflüsü önlenir ancak her iki kanalda ampulla içinde sonlanırsa sfinkterin kasılması reflüye yol açabilir. (23)

Safra kanallarının arteriyel kan akımı esas olarak sağ hepatik arterden sağlanır. Safra kanalları portal traktı geçtikten sonra oldukça zengin bir kapiller ağı ile çevrelenirler. (48). Bu peribiliyer pleksusta akmakta olan kan portal venin interlobuler dalları aracılığı ile hepatik sinüzoidlere boşalır. Peribiliyer pleksus proteinlerin, inorganik iyonların ve safra asitlerinin kan ve safra arasındaki çift yönlü değişimi ile biliyer sekresyonları düzenleyebilir. Kan akımı ile safra akımının ters yönlü olmasından dolayı peribiliyer pleksus hepatositlere safrada çözünür maddeleri ters bir akımla sunar. (23)

İntrahepatik arterler, venler, safra kanalları ve hepatositler adrenerjik ve kolinerjik sinirlerle innerve olurlar. Otonom sinir sisteminde nöropeptid tirozin (NPY), kalsitonin-gen ilişkili peptid, somatostatin, vazoaaktif intestinal polipeptid, enkefalin ve bombesin gibi çok sayıda düzenleyici peptid işlev görmektedir. Ekstrahepatik safra kanallarında yer alan NPY-pozitif sinirler safra akımının otokrin ve parakrin mekanizmalarla düzenlenmesine yardımcı olur. (23)

Hepatik ve gastroduodenal arterlerden gelen dalların kurduğu çok sayıda anastomoz ile oluşan kan damarı ağı ana safra kanalını besler. (48). Kanalın supraduodenal kısmı inferiora retroduodenal arterden gelen dallarla beslenirken superiora sağ hepatik arterden gelen dallarla beslenir. Bu damarların zedelenmesi safra kanalı striktürüne neden olabilir. (23)

Hepatik, sistik kanal ve ana safra kanalının proksimal kısmının lenfatik damarları karaciğer hilusundaki glandlara dökülürler. (46) Ana safra kanalının alt kısımlarını drene eden lenfatik damarlar ise pankreas başı yakınındaki glandlara dökülürler. (23)

2.3.2. Safra Kesesi

Safra kesesi, safra asitlerinin yüksek konsantrasyonda ve kontrollü bir şekilde diyetle alınan yağların çözünmesini kolaylaştırmak için duodenuma taşınmasını sağlayan bir rezervuar depo görevi görür. Karaciğerin sağ lobunun altında bir fossada yer alır. Esnek yapılı ve armut şeklinde olan bu yapı, 3 cm genişliğinde ve 7 cm uzunluğunda olup yaklaşık 30-50 mL hacme sahiptir, düz kas hücrelerinden oluşan ince bir kas tabakası vardır. Safra kesesinin absorbtif yüzeyi katlı yapılarıyla belirgin olarak arttırılmıştır. Ön tarafından, karaciğer kapsülü ile birleşmiş olan bir adventisya tabakası ile sarılıdır. Posterior ve apex kısımları visseral periton ile çevrilidir. Safra kesesi fundus, gövde, infundibulum ve boyun olmak üzere 4 ana bölüme ayrılır. Fundusun anterior parçası, musculus rektus abdominis kasının ve 9. kostanın kartilaj kısmının sağ lateral yanı hizasında yer alır. Fundusun posterior parçası ve gövde kısmı sırasıyla transvers kolon ve duodenuma yakın yerleşimlidir. Perforasyon gelişmesi durumunda olası safra kesesi taşları bu yapılara kolayca penetre olabilir. İfundibulum; safra kesesi gövdesi ve boynu arasında gittikçe incelen yapıda bir bölgedir. Hartmann poşu, infundibulumun alt yüzünün kesenin boyun bölgesine yakın bir bölgede oluşturduğu alandır. Safra kesesi taşları Hartmann poşunda sıkışabilir ve sistik kanalı obstrükte ederek kolesistit tablosuna yol açabilir. Hartmann poşunda gelişen yoğun bir inflamasyon, komşu hepatik duktuslarda obstrüksiyona neden olabilir. (Mirizzi Sendromu) (49)

Safra kesesi, boyun bölgesinden ana safra kanalına açılan sistik kanala bağlanır. Sistik kanal yaklaşık olarak 4 cm uzunluğundadır ve yüzey kolumnar epiteli, lamina propria, muskuler tabaka ve safra kesesinin serozası ile devamlılık gösterir. Boyun bölgesinin müköz membranları safranin keseden akışını kontrol eden Heister'in spiral valv yapısını şekillendirir. (23)

Safra kesesi, genellikle sağ hepatik arterden ayrılan sistik arter ile kanlanır. Sistik arter, kesenin boyun bölgesinin yakınında 2 dala ayrılır: serozal yüzeyi besleyen superfisial dal ve safra kesesi duvarının iç katmanlarını besleyen derin dal. Sistik arterin başlangıç ve seyrinde varyasyonlar olabilir. Sistik arterin bir end arter olmasından kaynaklı safra kesesi, inflamasyon yada hepatik arter akımının kesilmesine bağlı iskemik hasar ve nekroza oldukça duyarlıdır. (49)

Safra kesesi ve sistik kanalın venöz drenajı genelde portal ven ile, bazen de doğrudan hepatik sinusoidlere açılan sistik ven ile olmaktadır. Safra kesesinin lenf damarları, Glisson kapsülünün lenfatik damarları ile bağlantılıdır. Subserozal ve submukozal lenfatikler, kesenin boyun bölgesine yakın bir glanda dökülürler. Safra kesesinin sempatik innervasyonu çöliak akstan orijin alır ve seyrinde hepatik arter dalları ile portal vene eşlik eder. Visseral ağrı duyusu sempatik sinir lifleri ile taşınır ve sıklıkla sağ subkostal, epigastrik ve sağ skapular bölgelerde hissedilir. Her iki vagus sinirinden gelen dallar ise safra kesesinin motilitesini regüle eden parasempatik innervasyonu sağlar. (46)

Safra kesesi katlantılar ve çıkıntılar gösteren ve kolumnar epitelden oluşan bir mukoza ile kaplanmıştır. Kесе duvarı; mukoza, lamina propria, tunika muskularis ve serozadan oluşmaktadır. Tunika muskularis kalın yapılıdır ve birbirine kenetlenmiş longitudinal ve spiral şekilli düz kas lifleri ile çevrelenmiştir. Kesenin boyun kısmında tübüloalveolar bezler mevcuttur ve mukus üretiminden sorumludurlar. (50). Rokitansky-Aschoff sinüsleri yüzey epitelinin muskuler tabakaya kadar genişleyebilen invajinasyonlarıdır. (46). Bu yapılar bakterilerin stazı ve proliferasyonu sonucu bir inflamasyon kaynağı olabilirler. Luschka kanalları, safra kesesinin hepatik yüzeyi boyunca görülebilir ve kese kavitesine açılmak yerine doğrudan intrahepatik duktuslara açılırlar. Bu yapılar gelişimsel anomali olarak değerlendirilmektedir ve safra kesesi yatağında bulduklarında kolesistektomi sonrası safra sızıntısına kaynak oluşturabilirler. (49)

2.4. Safra Sekresyonu ve Enterohepatik Sirkülasyon

Safra oluşumu intestinal lipit sindirimi ve emilimi, kolesterol homeostazisi, lipit-soluble ksenobiyotikler, ilaç metabolitleri, ve ağır metallerin hepatik eksresyonu

için özel formasyondadır. Safranın oluşum süreci; safra asitlerinin hepatik ve kanaliküler sekresyonuna, safrada ağırlıklı olarak bulunan organik anyonlara bağlıdır ve hepatik safra oluşumunun devamı normal karaciğer fonksiyonları açısından önemlidir. Hepatositlerce sekrete edilen safra asitlerinin çoğu öncesinde ince barsaklara salınmış ve enterohepatik dolaşımı girmiştir. Sonuç olarak, safra asidi sentezindeki, biliyer sekresyondaki ve intestinal absorpsiyondaki bozukluklar hepatik ve gastrointestinal sistem fizyolojisinde çok ciddi etkilere sahiptir. Hepatik, biliyer ve intestinal safra asit taşıyıcılarının tanımlanması, safra oluşumu ve sekresyonunda genetik ve edinsel bozukların anlaşılmasını kolaylaştırmıştır. Bu transporter gen mutasyonları progresif familiyal intrahepatik kolestaz (PFIC) tip 1 ve tip 3, gebeliğin intrahepatik kolestazı (ICP), düşük fosfolipit-ilişkili kolestaz (LPAC), Dubin-Johnson Sendromu ve primer safra asidi malabsorpsiyonu (PBAM) gibi hastalıklarda tanımlanmıştır. (51). Ayrıca, nükleer ve G-proteinine bağlı reseptör alanlarındaki gelişmeler, safra asiti ilişkili hepatobiliyer ve intestinal bozuklukların patogenez ve potansiyel tedavileri konusunda yeni bakış açıları getirmiştir. (23)

Safra; plazma ile izosmotik yapıda olup su ve inorganik elektrolitler ile safra asitleri, fosfolipitler (özellikle fosfatidilkolin), kolesterol ve safra pigmentleri gibi organik solütlerden oluşan kompleks, lipitten-zengin miçel solüsyonudur (Tablo 1). Hepatik safra sekresyonu günlük tahmini 500-600 mL olup ağırlıklı olarak bulunan organik komponent safra asitleridir. Kanaliküler membran boyunca aktif olarak sekrete edilen safra asitleri, diğer biliyer bileşenlerin akışını uyarır. Sağlıklı insanlarda kanaliküler sekresyon etkili ve oldukça konsantrattır; safra asitlerinin hepatosit hücre içi monomerik konsantrasyonu düşük mikromolar aralıkta iken kanaliküler safra konsantrasyonu 1000 µmol/L'den fazladır. Safra asitleri, biliyer ağacın alt ucuna doğru hareket ederler ve safra kesesinde toplanırlar. Yemek sonrası safra kesesi kasılır ve içeriğini kolesterol ve yağda-çözünür vitaminlerin absorpsiyonunu kolaylaştırmak üzere duodenuma boşaltır. Safra asitleri proksimal ince barsaktan düşük oranda emilirken çoğunluğu terminal ileumdan emilir. Sonrasında portal dolaşım ile karaciğere döner ve hepatosit sinüsoidal membranından aktif transporta uğrayarak tekrar safraya salınır. (51)

Tablo 1: Hepatik Safra Bileşenleri (23)

Bileşen	Konsantrasyon
Elektrolit ve Mineraller (mmol/L)	
Sodyum	140-160
Potasyum	3-8
Klorid	70-120
Bikarbonat	20-50
Kalsiyum	1-5
Fosfat	0-1.2
Magnezyum	1-3
Metaller (µmol/L)	
Demir	2-72
Bakır	12-21
Organik Bileşenler mmol/L)	
Safra Asitleri	5-50
Bilirubin (total)	1-2
Fosfolipid (lesitin)	0.5-20.0
Kolesterol	0.5-1.0
Glutasyon	3-5
Glukoz	0.2-1.0
Üre	2.2-6.5
Protein (g/dL)	0.2-3.0

Safra asitlerinin karaciğer ve gastrointestinal sistemde çok sayıda işlevi vardır. Öncelikle, safra asitleri safra akışını ve biliyer lipitlerin (fosfolipit ve kolesterol) hepatic sekresyonunu etkiler. Safra asitlerinin kandan safra kanaliküllerine vektöryel hareketleri osmotik bir akım üretir ve safra formasyonunun ana belirleyicisidir. İkincil olarak diyetle alınan yağların sindiriminde önemli role sahiptirler ve kolesterol ve yağda-çözünür vitaminlerin intestinal emiliminde görev alırlar. Yağda-çözünür vitaminler (A, D, E, K) safra asit miçelleri yokluğunda yetersiz absorbe olurlar. Bunların yanında safra asitleri protein hidrolizini pankreatik proteazlarla arttırarak proteinlerin intestinal emilimini de kolaylaştırırlar. Üçüncül olarak safra asitleri, kolesterol homeostazisinde kompleks bir rol oynarlar. Bir yandan biliyer ve diyetel kolesterolün intestinal absorpsiyonunu arttırarak kolesterol alımını sağlarken bir diğer yandan da çok sayıda mekanizma ile kolesterolün vücuttan atılımını sağlamlar. Safra asitleri kolesterol katabolizmasının suda-çözünür

son ürünleridir ve kolesterolün fekal ekskresyon yolu ile atılımında major yoldurlar. Safra asitleri ayrıca kolesterolün safraya hepatik sekresyonunu da yönetirler. Dördüncü olarak da safra asitleri gastrointestinal traktın antimikrobiyal savunma mekanizmalarına doğrudan fizyokimyasal olarak ve biliyer trakt ile ince barsakta antimikrobiyal gen ekspresyonunu uyararak katkıda bulunurlar. (52). Beş; safra asitleri kalsiyum taşları ile hiperoksalüri-ilişkili böbrek taşlarının oluşumunu engellerler. (53). Altıncı olarak safra asitleri enterohepatik dolaşımı düzenleyen bir hormon görevi görürler, nükleer ve G protein-aracılı reseptörler üzerinden glikoz, yağ ve enerji homeostazisini sağlarlar. (54)

2.4.1. Safra Asidi Sentez ve Metabolizması

Safra asitleri hepatik asinusta, perisantral hepatositlerde kolesterolden sentezlenirler. Bu süreçte, lipofilik bileşen olan kolesterol suda-çözünür forma dönüştürülür. İnsanlarda ilk olarak üretilen (primer) safra asitleri; kolik asit (CA), C-3 C-7 ve C-12 pozisyonlarında –hidroksi grupları içeren trihidroksi safra asidi, kenodeoksikolik asit (CDCA), C-3 ve C-7 pozisyonlarında –hidroksi grupları içeren dihidroksi safra asididir. Hepatik safra asidi sentezi 2 major yolak üzerinden gerçekleşir; klasik nötral yolak (kolesterol 7 α -hidroksilaz yolağı) CA biyosentezini desteklerken, alternatif asidik yolak (oksi-sterol 7 α -hidroksilaz yolağı) CDCA biyosentezini destekler. Klasik yolak yetişkinlerde daha önemlidir. Klasik yolakta rol alan CYP7A1 geninde kalıtsal mutasyon olan yetişkinlerin yaklaşık %90'ında safra asit sentezinin azalmış olarak görülmesi bu sonucu desteklemektedir. (23)

Safra asit sentezi 2 ana gruba ayrılmış olan 17 farklı enzim ile yürütülen kompleks bir süreçtir. (55). İlk grup enzimler sterol halka yapısında modifikasyonları yaparken ikinci grup enzimler sterol yan zincir modifikasyonlarını yapar. (23)

Klasik yolak için hız-kısıtlayıcı basamak CYP7A1 enzimidir. CYP7A1'in safra asidi feedback inhibisyonu deneysel olarak iyi kurgulanmıştır; hidrofobik safra asitlerinin uygulanması ile safra asit sentezi azalırken ileal rezeksiyonu takiben yada safra asit sekestranları uygulanmasıyla enterohepatik dolaşımın kesilmesi sonucu safra asidi sentezi artar. (56). Klasik yolun aksine alternatif yol safra asitleriyle regüle edilmezken mitokondri iç zarına kolesterol taşınması ile kontrol

edilmektedir. CYP7A1 yolağının negatif feedback regülasyonundan sorumlu moleküler mekanizmalar karaciğeri ve ince barsağı içermektedir. Ana yol için safra asitleri, ileal enterositlerde bir endokrin polipeptid hormon olan fibroblast growth faktör-19 (FGF19) sentezini indüklemek üzere bulunan farnesoid X reseptörleri için ligand görevi görürler. FGF19, portal dolaşıma salınır ve hepatositler üzerindeki yüzey reseptörleri, β -klotho protein kompleksi ve FGF4 reseptörleri üzerinden CYP7A1 ekspresyonu ile safra asidi sentezinin baskılanmasında rol alır. (57)

Safra kanallıklarına salınmadan önce hem CA hem de CDCA, glisin ve taurin ile N-açil amidasyona uğrar ki bu konjugasyon olarak isimlendirilir. Bu konjugasyon ile zayıf bir asidin güçlü bir aside dönüştürülmesinde safra asidinin hidrofilitesi ve yan zincirin asidik mukavemetini artırır. Konjugasyonun asıl amacı safra asitlerinin enterohepatik dolaşım sürecinde membranlardan pasif difüzyonunu azaltmaktır. Sonuç olarak safra asitleri sadece spesifik membran taşıyıcıları olduğunda absorbe edilebilir. Konjuge olmayan safra asitleri ile karşılaştırıldığında, konjuge safra asitleri asidik pH'da daha fazla çözünürler ve yüksek konsantrasyonlardaki kalsiyum varlığında çökmeye daha dirençlidirler. Konjugasyonun net etkisi, safra asitlerinin yüksek intraluminal konsantrasyonunu, lipit sindirimini ve absorpsiyonunu kolaylaştırmak üzere ince barsak boyunca korumasıdır. Safra asid konjugasyonunun önemi, konjugasyondaki kalıtsal defektlerin yağda çözünebilir-vitamin malabsorpsiyonu ve steatore klinik fenotiplerinde ortaya çıkması ile gösterilmiştir. (58)

İnce barsağa salgılanan konjuge safra asitlerinin çoğu etkili bir biçimde emilir, bununla birlikte safra asitleri barsaktan geçişleri sırasında endojen bakteri florası tarafından metabolize edilir. İnce barsak distalinde bakteriyel flora, safra asitlerinin küçük bir fraksiyonunu (\approx %15) dekonjuge eder. Unkonjuge safra asitleri aktif yada pasif olarak absorbe edilir ve efektif olarak rekonjuge edildikleri ve tekrar safraya salgılanmak üzere yeni sentezlenen safra asitleriyle biraraya geldikleri karaciğere tekrar dönerler. İntestinal dekonjugasyon ve hepatik rekonjugasyon safra asit metabolizmasının olağan bir sürecidir. Ek bir bakteriyel modifikasyon, 3α -hidroksi veya 7α -hidroksi gruplarının karşılık gelen 3β - yada 7β -hidroksi formlarına epimerizasyonudur. (59). CDCA'nın 7α -hidroksi grupları $3\alpha,7\beta$ -dihidroksi safra asidi olan ursodeoksikolik asidi (UDKA) oluşturmak üzere epimerize olur. UDKA barsaktan emildikten sonra karaciğerde glisin yada taurin ile konjuge olur ve safra

asidi havuzunun en küçük bileşeni (normali < %5) olarak sirküle olur. Endojen formasyona ilaveten, UDKA kolestatik karaciğer hastalıklarının çeşitli formlarında terapötik ajan olarak kullanılmaktadır. (60)

Safra asitlerinin küçük bir kısmı ince barsaktan emilmeden dekonjugasyonun tamamlanmış olduğu kolona geçer. Kolonda, bakteriyel 7 α -dehidroksilaz aktivitesi ile CA C-3 ve C-12 pozisyonlarında –hidroksi grupları olan bir dihidroksi safra asidi deoksikolik aside (DCA) ; CDCA ise C-3 pozisyonunda bir –hidroksi grubu içeren litokolik aside (LCA) dönüştürülür. (59). Kolon DCA'nın yaklaşık %50'sini ve oluşan LCA'nın bir kısmını absorbe eder, ancak bu safra asitlerinin total intestinal geri kazanımının sadece küçük bir fraksiyonuna karşılık gelir. İnsanlarda DCA, karaciğere döndükten sonra tekrar hidrosilasyona uğramaz fakar glisin yada taurin ile rekonjuge edilerek primer safra asitleriyle birlikte sirküle olur. Sirkülasyondaki safra asitlerinin hepatik rekonjugasyonu son derece etkilidir, bu nedenle hemen hemen tüm endojen biliyer safra asitleri (başlıca CA, CDCA, DCA ve UDKA) konjuge formdadır. Safra asitlerinin kolondaki bakteriyel dekonjugasyonu ve dehidrosilasyonu da oldukça etkindir, bu nedenle feçes temel olarak unkonjuge sekonder safra asitlerini ve diğer safra asidi formlarının sadece küçük bir miktarını (<%15) içerir. (61)

Sekonder safra asitlerinin metabolizması için 3 β -hidroksi safra asitlerinin hepatik re-epimerizasyonu, 7-okso-litokolat'ın CDCA yada UDKA'ya hepatik redüksiyonu, hidrosilasyon, glukuronidasyon, sülfatasyon gibi çeşitli minör yollar bulunmaktadır. LCA gibi safra asitlerinin sülfat yada glukuronid ile konjugasyonu intestinal absorpsiyonu bloke eder ve modifiye LCA safra asitlerinin dolaşım havuzundan hızlıca kaybolur. İnsanlarda LCA'nın 3-hidroksi pozisyonundan sülfatlanması oldukça önemli protektif bir role sahiptir çünkü unmodifiye LCA hepatotoksiktir. (62). Bu hepatoprotektif modifikasyonların indüksiyonundan sorumlu moleküler mekanizmalar, sitozoliksulfotransferazlar vesitokrom P450 enzimlerinin ekspresyonunu uyaran pregnan X reseptör (PXR) ve konstitüif andosteron reseptör gibi nükleer reseptörleri içerir. (63)

2.4.2. Enterohepatik Sirkülasyon

Enterohepatik dolaşımın anatomik komponentleri; karaciğer, biliyer trakt, safra kesesi, ince barsaklar, portal venöz dolaşım ve daha az oranda da kolon, sistemik dolaşım ve böbreklerdir. Temel anlamda safra asitlerinin enterohepatik dolaşımı; bir dizi depolama alanı (safra kesesi, ince barsaklar), valvler (oddi sfinkteri, ileoçekal valv), mekanik pompalar (safra kanalikülü, biliyer trakt, ince barsaklar) ve kimyasal pompalardan (hepatositler, kolanjiositler, ileositler) oluşmaktadır. (23)

Etkili intestinal reabsorbsiyon ve safra asitlerinin hepatik ekskresyonu, safra asitlerinin intestinal ve hepatobiliyer kompartmanlara büyük ölçüde sınırlı kalması ile efektif bir geri dönüşümü ve koruma mekanizmasını mümkün kılmaktadır. Safra asitleri açlık esnasında biliyer trakt boyunca ilerler ve safra kesesinde yaklaşık 10 kata ulaşacak kadar konsantre olurlar. Gece açlığından sonra, safra asitlerinin çoğu safra kesesinde sekestre halde bulunurlar ve ince barsaklar, portal ven, sistemik dolaşım ve karaciğer safra asidi düzeyleri düşük bulunur. Yemeğe yanıt olarak, intestinal mukozadan kolesistokinin salgılanır ve biliyer ağaçta yer alan Oddi sfinkterini gevşeterek safra kesesi kontraksiyonuna yol açar. Safra kesesinden konsantre bir miçel solüsyonu (safra asitleri, fosfolipitler ve kolesterol) safra kanalları aracılığı ile pankreatik lipazın trigliseridler üzerindeki etkisini stimüle ederek yağ absorpsiyonunu kolaylaştırmak, hidrolitik ürünlerin çözünmesini sağlamak ve lipitleri mukozal yüzeye taşımak üzere ince barsağa dökülür. Büyük bir öğün sindirimi esnasında safra kesesi kontrakte kalmaya devam eder ve karaciğer tarafından sekrete edilen asafra asitleri safra kesesini bypass ederek doğrudan duodenuma dökülür. Yemek arası süreçte Oddi sfinkteri kasılır ve safra kesesi gevşer, böylece daha büyük miktarlardaki safra asidi depolanmak üzere safra kesesine girer. Safra kesesi gevşemesi kısmen FGF19 ve safra asidi-aktive G proteini-ilişkili reseptör TGR5 sinyali aracılığı ile gerçekleştirilebilir. (64). Bu nedenle safra asitlerinin enterohepatik sirkülasyonu sindirim esnasında hızlanır ve yemek araları ile gece açlığı esnasında ise yavaşlar. Safra asidi sekresyonunun bu ritmi, kolesistektomi sonrasında bile korunur. (65). Safra kesesi yokluğunda safra asitleri proksimal ince barsakta depolanır ve yemek sonrası ince barsak kasılmaları ile bu depo haldeki safra asitleri aktif olarak absorbe edildikleri distal ileuma doğru ilerletilir. (23)

Enterohepatik sirkülasyon oldukça etkilidir ki intestinal safra asitlerinin sadece %10'undan azı reabsorbsiyondan kurtulur ve feçesle atılır. Yetişkin bir insanda enterohepatik dolaşımında kabaca 2 ila 4 g safra asidi havuzu bulunmaktadır. Safra asidi havuzu her yemek başına 2-3 defa siklusa uğrar ve barsaklarda 10-30g/gün safra asidi reabsorbe edilebilir. Yaklaşık olarak 0,2-0,6 g/gün safra asidi reabsorbe olmaktan kurtulur ve gaita ile atılır. Kolesterolün safra asitlerine hepatic konversiyonu fekal atılımı dengeler ve bu işlem kolesterolün vücuttan uzaklaştırılması için önemli bir yol arzeder. (23)

2.4.3. Hepatik Safra Asidi Taşınması ve Safra Sekresyonu

Hepatositlerce oluşturulan safra formasyonu osmotik olarak aktif organik ve inorganik solütlerin kanaliküler lümene salgılanması ve sonrasında pasif su transportu ile ilişkilidir. Kanaliküler safra formasyonu mannitol ve eritritol gibi metabolik olarak inert markerlarla çalışılmış olup geleneksel olarak 2 komponente ayrılmıştır: safra asidi-bağımlı safra akımı (safra asidi sekresyonuna bağlı safra akımı) ve safra asidi-bağımsız safra akımı (inorganik elektrolitlerin ve diğer solütlerin aktif transportuna bağlı safra akımı). (23)

Hepatik ATP-bağımlı taşıyıcılar safra asitlerini aktif olarak kanaliküler lümene sekrete ederler; safra asitleri burada agregatlar ve kanaliküler lümendeki parasellüler bağlantılardan geri difüzyona uğrayamayacak kadar büyük miçeller oluştururlar. (66)Kanaliküler membran boyunca aktif olarak pompalanan konjuge safra asitleri gibi bileşikler safra akışını oluşturur ve 'primer solüt'ler olarak adlandırılırlar. Primer solütler; konjuge bilirubin, glutasyon, ağır metaller, ksenobiyotikler ve çeşitli metabolitlerin konjugatlarıdır. Osmotik gradyente bağlı olarak kanaliküllerde akmakta olan su, plazma elektrolitleri, kalsiyum, glukoz, amino asitler, bikarbonat ve diğer düşük moleküler ağırlıklı solütler 'sekonder solüt' olarak adlandırılırlar. Her bir primer solütün koloretik aktivitesi sekrete edilen solütlerce uyarılan safra akımı hacmi olarak tanımlanmıştır. Hepatositler ve biliyer epitelyum tarafınca sekrete edilen diğer primer solütler de safra formasyonuna katkıda bulunur. Hepatik kanaliküllerde yeni sekrete edilen safra da biliyer trakt boyunca duktül epitelyal hücrelerince (kolanjiositler) modifiye edilir. Bu modifikasyonlar; glukoz, amino asitler ve safra asitleri gibi solütlerin absorbsiyonu, suyun spesifik kanallardan

(aquaporinler) ve parasellüler olarak taşınması, bikarbonat ve klorid gibi solütlerin sekresyonu olarak sıralanabilir. Duktuler sekresyonun katkısı türler arasında değişkenlik göstermektedir; insanlarda safra akımının yaklaşık %40'ını oluştururken rat gibi hayvan modellerinde ise sadece %10 gibi bir miktarı karşılamaktadır. (67)

Kanaliküler safra akımı safra asitlerine ek olarak primer solütlerin aktif sekresyonu ile de oluşturulmaktadır. İndirgenmiş glutatyon (GSH) ve bikarbonat (HCO_3^-) safra akımının safra asidi-bağımsız fraksiyonunun majör komponentlerini oluşturur. Safraya yüksek konsantrasyonlarda salgılanmasının yanı sıra GSH'ın GGT ile intraluminal katabolizması solüt konsantrasyonunu daha fazla artırır ve kanaliküler safra oluşumu için osmotik itici güce katkıda bulunur. Organik anyonların safraya ATP-bağımlı salgılanmasının yanı sıra bikarbonatın $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ anyon değiştirici AE2 aracılığı ile hepatik ve biliyer ATP-bağımsız sekresyonu safra asidi-bağımsız safra akışında bilhassa önemlidir. (68). Bu HCO_3^- salınımının çoğunluğu safra kanalı epitelyal hücreleri düzeyinde, sekretin ve vasoaktif intestinal peptid gibi birtakım hormon ve nöropeptidlerin uyarılarına yanıt olarak gerçekleşmektedir. (69)

Safraya salınan safra asitlerinin yaklaşık %95'i resirkülasyon havuzundan gelmektedir. Bunun için de karaciğer parankim hücrelerinin safra asitlerini etkin bir biçimde portal kandan safraya taşımaları gerekmektedir. Bu vektörel trans-hepatosellüler hareket, sinusoidal ve kanaliküler plazma membranlarındaki primer (ATP-bağımlı), sekonder (Na^+ gradyent-bağımlı) ve tersiyer (OH^- yada HCO_3^- bağımlı anyon değişimi) transport sistemleri ile sürdürülmekte olan konsantratif bir transport sürecidir. (23)

Açlık durumunda safra asitleri ağırlıklı olarak periportal hepatositlerce (portal venüllere yakın olan) alınmakta iken; beslenme esnasında daha çok karaciğer asinusunda yer alan hepatositlerce alınır. Periportal hepatositlerde safra asidi sentezi baskılanmıştır fakat perisantral hepatositlerde safra asitleri aktif olarak sentezlenmektedir. Sonuç olarak periportal hepatositler primer olarak resirküle olan safra asitlerinin emilim ve sekresyonundan sorumlu iken; perisantral hücreler yeni sentezlenmiş olan safra asitlerini sekrete ederler ve resirkülasyona uğrayan safra asitlerini periportal hepatositlere taşırlar. (23)

Sağlıklı insanlarda portal kandaki safra asidi konsantrasyonu 20-50 $\mu\text{mol/L}$ dir. Karaciğer tarafından alınma genellikle fraksiyonel yada ilk geçiş

ekstraksiyonu olarak ifade edilir ve hepatik asinüslara doğru tek bir pasaj esnasındaki safra asitlerinin yüzdesini temsil eder. Safra asitlerinin sinüzoidal kandan fraksiyonel olarak ekstraksiyonu, %50'den %90'a kadar değişkenlik gösterebilir ve sistemik safra asidi konsantrasyonlarından bağımsız olarak sabit kalır. Hepatik fraksiyonel ekstraksiyon safra asidi yapısı ile ilişkilidir ve konjuge CA gibi hidrofilik konjuge safra asitleri için %80-%90'lara ulaşırken; CDCA gibi unkonjuge hidrofobik protein-bağlı safra asitleri için %50-%60 oranlarındadır. Sistemik dolaşımdaki total safra asidi miktarı hepatik ekstraksiyonun etkinliğini yansıtır ve açlık ile beslenme durumlarında sırasıyla 2-5 µmol/L, 5-15 µmol/L civarındadır. (70) Sinusoidal (basolateral) membrandaki konjuge safra asitlerinin alınması öncelikli olarak sekonder aktif Na⁺-bağımlı transport sistemleri ile düzenlenmektedir. Na⁺-bağımlı transport için gereken enerji mevcut Na⁺ gradyentini koruyan basolateral Na⁺,K⁺-ATPaz tarafınca sağlanmaktadır. (23). Unkonjuge safra asitleri ise öncelikli olarak hepatik Na⁺-bağımsız transport sistemleri ile alınmaktadır. Bundan sorumlu mekanizmanın tanımlanması bu sistemin belirgin fazla substrat özgülüğünden dolayı karmaşıktır ve bu çok sayıdaki substrat, bilinen herhangi bir karaciğer taşıyıcının özellikleri ile kolaylıkla ilişkilendirilemez. Bu bağıntı organik anyon taşıyıcı polipeptit (OATP) gen ailesinin keşfedilmesiyle çözülmüş ve OATP ailesi üyelerinin safra asitleri, organik anyonlar ve ilaçların hepatik alımına katkıda bulunduğu görülmüştür. (71)

Kolestatik durumlarda safra asitlerinin hepatositlerin basolateral membranından akışı safra asidi yüklenmesini önlemek adına önemli ve koruyucu bir mekanizmadır. (51). Hepatik sinusoidal safra asidi taşınımı heteromerik organik solüt taşıyıcı OST α -OST β ve MRP3 ile MRP4 ü içeren MRP gen ailesinin üyeleri ile gerçekleşmektedir. (72)

Biliyer obstrüksiyon, örneğin taş ile safra kanalının tıkanması, hepatik safra asitlerinin retansiyonuna ve sonuç olarak da hepatosit nekrozuna ve apoptozisine neden olur. Biriken safra asitlerinin bir kısmı sülfatasyona uğrar ve hem sülfatlanmış hem de sülfatlanmamış olan safra asitleri hepatositlerden sistemik dolaşıma rejürjitasyona uğrar. Üriner ekskresyonları artmasına rağmen plazma konsantrasyonları yaklaşık 20 kata kadar artar. Biliyer obstrüksiyon inkomplet olduğunda safra asitleri ince barsağa sekrete olmaya devam eder ve ileumdan emilerek portal dolaşım ile karaciğere döner. Komplet obstrüksiyonda safra asitleri

ince barsağa salgılanamaz, yağda çözünen vitaminlerin intestinal malabsorbsiyonu ve steatore ile sonuçlanır. Sekonder safra asitleri oluşamaz ve fekal safra asidi atılımı azalır. (23)

2.4.4. Renal Safra Asidi Transportu

Safra asidi çeşidine bağlı olarak değişmekle birlikte portal dolaşımdaki safra asitlerinin %10 ila %50'si hepatik ilk geçiş ekstraksiyonundan kaçır ve sistemik dolaşıma dökülür. Safra asitlerinin plazma proteinlerine bağlanması sonucu glomeruler filtrasyonları azalır ve safra asidi üriner atılımı minimuma indirilir. Sağlıklı bir insanda 100 µmol/gün safra asidi böbreklerden süzülür. Etkili tübüler reabsorbsiyon sayesinde sadece 1 - 2 µmol/gün safra asidi idrarla atılır. Plazma safra asidi konsantrasyonlarının belirgin olarak artmış olduğu kolestatik karaciğer hastalığı olan kişilerde bile 24 saatlik idrarla atılan sülfatlanmamış safra asidi miktarı, glomeruler filtrasyona uğrayan miktardan oldukça azdır. Yapılmakta olan çalışmalar göstermiştir ki, glomeruler filtrattaki safra asitleri renal tübüllerden aktif olarak reabsorbe edilmektedir ve bu da kolestatik karaciğer hastalığı olan kişilerde serum safra asidi konsantrasyonlarının artmasına katkıda bulunmaktadır. İleumda olduğu gibi renal proksimal tübül epitel hücreleri de Na⁺ gradyent-bağımlı bir taşıyıcı eksprese etmektedir ve bu taşıyıcı, safra asitlerini korumak için bir kurtarma mekanizması olarak işlev görmektedir. (23)

2.5. Karaciğer Biyokimyası ve Fonksiyonel Testler

Karaciğer fonksiyon testleri yada diğer adıyla karaciğer kimyasalları doğru yorumlandığı takdirde karaciğer hastalıklarının değerlendirilmesinde ve yönetiminde kullanılabilirler. 'Karaciğer biyokimyasal belirteçleri' isimlendirmesi 'karaciğer fonksiyon testleri' adlandırmasına göre tercih edilmektedir çünkü sıklıkla kullanılmakta olan aminotransferazlar ve alkalen fosfataz karaciğerin bilinen bir fonksiyon ölçüm değerlendirmesinde kullanılmazlar. Bu testler; karaciğer hastalıklarının tanımlanmasında, ne tür bir bozukluk olduğunun değerlendirilmesinde, karaciğer disfonksiyonunun şiddet ve progresyonunun

taininde, tedaviye yanıtın takibinde kullanılırlar. Bununla birlikte hiçbir test, karaciğerin total fonksiyonel kapasitesini tam olarak değerlendiremez; biyokimyasal testler, karaciğer tarafından gerçekleştirilen binlerce biyokimyasal fonksiyonun sadece birkaçını ölçebilmektedir. Ayrıca bu testler, karaciğer hasarını göstermede sensitivite ve spesifite açısından yetersizdirler ve bir dizi ek test değerlendirmesini gerekli kılarlar. Bu testler; total ve direkt bilirubin, albumin, protrombin zamanı, ALT, AST, alkalen fosfataz (ALP), GGT ve 5'nukleotidaz (5'NT) 'dır. Ayrıntılı bir anamnez ve fiziki muayene ile birlikte bu sonuçların değerlendirilmesi karaciğer hasarının tipinin belirlenmesine, cerrahi prosedürler için risk değerlendirmesine ve prognoz tayinine yardımcı olur. Diğer birtakım özelleşmiş testler; karaciğer fonksiyonlarının kantitatif testleri ve hepatik fibrozis derecesini belirlemeye yönelik testlerdir. (23)

2.5.1. Bilirubin

2.5.1.1. Bilirubin Metabolizması

Bilirubin, hemin (ferroprotoporfirin IX) yıkım ürünüdür. İnsan vücudunda günde yaklaşık olarak 4mg/kg bilirubin üretilmektedir ve bunun da yaklaşık %80 kadarı yaşlı eritrositlerdeki hemoglobinin yıkımı ve kemik iliğinde prematür eritrositlerin parçalanması ile oluşurken; geri kalan kısmı da vücuda dağılmış olan miyogloblin ve sitokromlar gibi hemoproteinlerin turnoverinden elde edilmektedir. (73). Bilirubin metabolizmasının ilk basamakları özellikle dalakta, retiküloendotelyal hücrelerde meydana gelir. Hem, mikrozomal bir enzim olan hem oksijenaz ile biliverdine çevrilir. Biliverdin ise sitozolik bir enzim olan biliverdin redüktaz ile bilirubine dönüştürülür. (23)

Retiküloendotelyumda oluşturulan bilirubin lipitte-çözünür olup suda çözünmez. Kanda taşınabilir olması için unkonjuge bilirubinin suda-çözünür olması gerekmektedir. Proçes, unkonjege bilirubin için hem yüksek afiniteli hem de düşük afiniteli bağlanma noktaları içeren albumine bilirubinin reversible ve non-kavalent bağlar ile bağlanması sonucu başlatılır. Unkonjuge bilirubin-albumin kompleksi hepatik sinusoidlerde bulunan endotelyum fenestralarından Disse aralığına kolayca geçer ve burada bilirubin albuminden ayrılarak muhtemelen bir karaciğer spesifik

organik anyon transport proteininin aracılık ettiği kolaylaştırılmış transport ile hepatositlere alınır. (23)

Unkonjuge bilirubin hepatosite girdikten sonra, sitozolde, glutasyon S-transferaz süper familisindeki proteinler de dahil olmak üzere bir dizi proteine bağlanır (74). Üridin 5'-difosfat (UDP) glukuronil transferaz enzimi endoplazmik retikulumda bulunur ve glukuronik asitle bilirubini, bilirubin monoglukuronid ve diglukuronidi oluşturarak suda-çözünür hale getirmek üzere konjuge eder. (75). Hidrofilik hale gelen bilirubin; safra kanaliküllerine atılmak üzere kanaliküler membranlardan difüze olur. Konjuge bilirubin kanaliküler membranlardan multidrug rezistan protein 2 (MRP2) aracılığı ile ATP-bağımlı olarak geçer. (76). Bilirubin metabolizmasındaki tek enerji-bağımlı basamak bu basamaktır ve fulminan hepatik yetmezlik gelişen hastalarda baskın olarak neden konjuge hiperbilirubinemi olduğunu açıklar. Konjuge bilirubin safra içinde distal ileum ve kolona kadar ilerler ve burada β -glukuronidaz içeren bakterilerce unkonjuge bilirubine hidrolize edilir ve bu da yine bakterilerce renksiz ürobilinojene indirgenir. (77). Ürobilinojen ya değişmeden okside olup turuncu renge sahip olan ürobilin olarak atılır yada pasif olarak barsaktan emilerek portal sisteme geçer. Barsaklardan emilen ürobilinojenin çoğu karaciğer tarafından tekrar salgılanır, küçük bir kısmı da renal glomerullardan filtrasyona uğrayarak idrar ile atılır. Unkonjuge bilirubin kesinlikle idrarda bulunmaz çünkü serumda albumine bağlı halde bulunur ve glomerullardan filtre edilemez. İdrarda bilirubin varlığı konjuge hiperbilirubinemiye ve hepatobiliyer hastalığı gösterir. (23).

2.5.1.2. Serum Bilirubin Düzeyi Ölçümü

Direkt ve indirekt bilirubin terimleri sırasıyla konjuge ve unkonjuge bilirubine karşılık gelir ve van den Bergh reaksiyonundan türemiştir. (78). Serum bilirubin düzeyi klinik laboratuvarlarda hâlâ bu metodun birtakım modifikasyonları ile ölçülmektedir. (79). Bu teknikte bilirubin, diazotize sülfanilik aside maruz kalmaktadır, konjuge bilirubin fraksiyonu diazo reaktifi ile katalizöre ihtiyaç duymadan hemen yada 'direkt' reaksiyon verir ve böylece konjuge bilirubin fotometrik yöntemlerle 30-60 saniyede ölçülür. Total bilirubin ise alkol yada kafein gibi bir katalizörün eklenmesinden 30-60 dakika sonra ölçülebilir. Unkonjuge yada

indirekt bilirubin fraksiyonu miktarı ise total kısımdan konjuge kısmın çıkarılması ile bulunur. (23)

Bilirubin ölçümünde High-performance likid kromatografi tekniği gibi daha yeni ve kesin ölçümler sunan teknikler bulunmuştur fakat kullanım zorluğu ve ek bilgi sunmamasından dolayı çoğu klinikte kullanılmazlar. Bu yeni teknikler ile delta bilirubin (albumine sıkı kovalent bağlarla bağlı olan konjuge bilirubin) tanımlanabilmektedir. Delta bilirubin; uzamış ve ciddi serum konjuge bilirubin yüksekliklerinde saptanabilmektedir ve sıkı kovalent bağlardan dolayı albuminin yarı ömrüne, 14-21 gün, sahiptir ki bu bilirubinün 4 saat olan serum yarı ömrünü oldukça aşmaktadır. Delta bilirubinün tanımlanması, uzamış sarılığı olan bazı hastalarda serum bilirubin düzeyindeki azalmanın neden klinik iyileşmenin gerisinde kaldığını ve konjuge hiperbilirubinemisi olan bazı hastaların neden bilirubinüriye sahip olmadığını gösterir.

Diazo methodu kullanılarak ölçülen total serum bilirubin düzeyi 1.0-1.5 mg/dl arasında iken popülasyonun %95'inde bu aralık 0.2-0.9 mg/dl düzeyinde saptanmaktadır. İndirekt komponent normal aralığı ise 0.8-1.2 mg/dl'dir. Bununla birlikte diazo yöntemi özellikle normal aralıktaki konjuge bilirubin miktarını yüksek gösterme eğilimindedir. Sonuç olarak konjuge bilirubin için normal aralık zaman içinde yukarı doğru çekilmiştir. Genel olarak, direkt bilirubin toplam değerün %15'inden az ise ölçülen değer tamamen indirekt bilirubin olarak kabul edilmektedir. Konjuge bilirubin için en sık kullanılan üst değer 0.3 mg/dl'dir. Serum konjuge bilirubin değerindeki hafif bir artış bile karaciğer hasarı olduğunu düşündürür. Sarılığı olan hastalarda serum bilirubin fraksiyonu ve ölçümü sarılığın parankimal (hepatosellüler) mi yoksa obstrüktif (kolestatik) mi olduğu yönünde bir ayırım sağlamaz.

Hiperbilirubineminin şiddeti ve süresi prognostik faktörler olarak değerlendirilmemiştir. Genel olarak, viral hepatitli hastalarda serum bilirubin düzeyi ne kadar yüksek ise hepatosellüler hasar o oranda büyüktür ve hastalığın seyri de daha uzundur. Bununla birlikte, akut karaciğer yetmezliği tablosunda olan bir hastada ılımlı bilirubin yüksekliklerinde dahi hasta hayatını kaybedebilir. (23).

2.5.1.3. Bilirubin Yüksekliğine Yaklaşım

Hiperbilirubinemi, hemoglobinin aşırı yıkımına bağlı bilirubin fazla üretiminden, bilirubin azalmış hepatosellüler alımı ve azalmış konjugasyon yada ekskresyonundan, hasarlanmış safra kanalları ve hepatositlerden konjuge veya unkonjuge bilirubin rejurijitasyonundan kaynaklanabilir. Konjonktival ikterus gelişimi için serum total bilirubin düzeyi en azından 3.0 mg/dl düzeylerinde olmalıdır fakat bu hiperbilirubineminin tipi açısından bir ayırım yapılmasına olanak vermez. Çay yada kola rengi idrar bilirubinüri varlığını gösterebilir ve bu konjuge hiperbilirubinemi ile ilişkilidir. (23)

Serum bilirubin düzeylerinde izole yükseklik olan bir hasta ile karaciğer enzim yüksekliğinin de eşlik ettiği hiperbilirubinemili bir hastanın değerlendirilmesi belirgin farklılıklar gösterir ve ikincisi, hepatosellüler yada kolestatik bir süreç ile ilişkilidir. Serum bilirubin yüksekliği olan bir hastaya ilk yaklaşım hiperbilirubineminin konjuge mi yoksa unkonjuge mi olduğunun belirlenmesidir. Total serum bilirubin düzeyinin %15'inden azı konjuge ise neredeyse tüm serum bilirubini unkonjuge olarak kabul edilebilir. Hemoglobinin aşırı yıkımı sonucu fazla miktarda bilirubin üretimi birçok kalıtsal ve edinsel bozukluğun sonucu olabilir. Bilirubin hepatobilyer alımını kısıtlayabilecek ilaç kullanımları mutlaka sorgulanmalıdır. Belirli bir neden tespit edilemezse azalmış bilirubin konjugasyonuna neden olabilecek genetik enzim defektleri, en sık Gilbert sendromunda olduğu gibi, düşünülmelidir. Gilbert sendromunda ılımlı bir indirekt bilirubin yüksekliği söz konusudur ve bu sendromda görülen benign klinik seyir, daha nadir görülen Crigler Najar sendromu tip 1 ve 2 ile tezat içerisindedir. UDP glukuronil transferaz enzim genindeki mutasyonlar sonucu enzimin aktivitesi azalır; Crigler Najar sendromu tip 1'de bu azalma %10'dan az iken, tip 2'de hiç enzim aktivitesi yoktur ve serum unkonjuge bilirubin düzeyleri çok daha fazla yükselir. (23)

İzole hiperbilirubinemide konjuge bilirubin fraksiyonu %15'in üzerindeyse , tipik olarak %50'nin üzerindeyse, tanı Dubin-Johnson sendromu yada daha nadir olarak Rotor sendromudur. Her iki sendromda da safra kanaliküler membranından salgılanan konjuge bilirubin miktarı azalmıştır ve serum konjuge bilirubin düzeylerinde artış görülür. (23)

2.5.2. Aminotransferazlar

Akut hepatosellüler hasarın en sensitif belirtici olan aminotransferazlar, 1950'li yıllardan beri karaciğer hastalıklarının tanımlanmasında kullanılmaktadırlar. (80). ALT (Alanin Aminotransferaz / SGPT) ve AST (Aspartat Aminotransferaz / SGOT) sırasıyla alanin ve aspartik asidin α -amino gruplarını, ketoglutarik asidin α -keto gruplarına transfer eder. AST; sitozol ve mitokondride bulunur ve tüm vücuda yayılmış durumdadır; sırasıyla azalan konsantrasyonlarda karaciğer, kardiak kas dokusu, iskelet kası, böbrek, beyin, pankreas, akciğer, lökositler ve eritrositlerde bulunur. ALT; sitozolik bir enzimdir ve yine birçok organda bulunmasına rağmen büyük bir kısmı karaciğerde yer alır ve karaciğer hasarını göstermede AST'den daha spesifik bir indikatördür. Serum aminotransferaz düzeylerindeki yükseklikler bu enzimlerden zengin organlardaki bir hasarı yada bu enzimlerin seruma sızmasına izin veren hücre membran permeabilitesi değişikliklerini gösterir. Aminotransferazların hücreden çıkışı için hepatosit nekrozu gerekmemektedir ve bu enzimlerin serum değerlerindeki yükseklikler karaciğer hasarının yaygınlığı ile korele değildir. (81).

Aminotransferazlar, serumda bir rol oynamazlar ve diğer serum proteinleri gibi davranırlar, plazma ve interstisyel sıvıda dağılırlar ve yarı ömürleri birkaç gündür. Dolaşımdan, retikuloendotelial sistem hücreleri aracılığı ile temizlenirler ve AST, dolaşımı ALT'den daha hızlı terkeder. (23)

Aminotransferazların serum normal değerleri laboratuvarlar arasında değişkenlik göstermekle birlikte genel kabul gören değerler erkekler için 30 U/L'nin altı, kadınlar için ise 19 U/L'nin altıdır. Bir çalışmaya göre serum ALT değeri; cinsiyet, alkol kullanımı, BMI, diabetes mellitus, serum trigliserid düzeyleri ve ALTdeğerini etkileyebilecek olan diğer faktörlerden bağımsız olarak yaşa bağlı şekilde azalmaktadır. (82). Normal değerinin daha altında kalan bir serum aminotransferaz değerinin klinik bir önemi yoktur; hemodiyalize giren kronik böbrek hastalarında görüldüğü raporlanmıştır ve kısmen B₆vitamin eksikliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. (23)

2.5.2.1. Aminotransferaz Yüksekliğine Yaklaşım

Serum aminotransferaz düzeyleri tipik olarak tüm karaciğer hasarı tiplerinde artar; 300 U/L düzeyine kadar olan yükselmeler nonspesifiktir. Aminotransferaz yüksekliğinin derecesi ve paterni; hastanın özellikleri, semptomları, fiziki muayene bulguları kapsamında değerlendirilir ve klinisyeni belirli tanılara yönelterek sonraki değerlendirme aşamalarında yardımcı olur. Aminotransferaz düzeylerindeki belirgin yükselmelerin ayırıcı tanısında (>1000 U/L) viral hepatitler, toksin yada ilaç ilişkili karaciğer hasarı, iskemik hepatitler ve daha düşük olasılıkla da otoimmün hepatitler, akut Budd-Chiari sendromu, fulminan Wilson hastalığı, akut biliyer obstrüktif durumlar yer alır (23) (Tablo 2).

Serum AST/ALT oranı birkaç durumda özellikle de alkolik karaciğer hastalığı tanısında önemlidir. AST düzeyi 300 U/L'den düşükse ve AST/ALT oranı 2'den büyükse alkolik karaciğer hastalığını ön gördürür, eğer oran 3'ten büyükse tanı çok yüksek ihtimalle alkolik karaciğer hastalığıdır. (83). Bu oran pridoksal 5'-fosfat eksikliğine bağlı oluşur; alkolik karaciğer hastalığı olan hastalarda pridoksal 5'-fosfat eksikliği vardır ve karaciğerde ALT sentezi AST sentezinden daha fazla pridoksal 5'-fosfata gereksinim duyar. (84). Kronik alkolik karaciğer hastalığı olan hastalarda ek bir karaciğer hasarı geliştiğinde, özellikle bir asetaminofen toksisitesi, aminotransferaz düzeyleri çarpıcı olarak artabilir fakat AST/ALT oranı korunur. (23)

Artmış serum AST/ALT oranı kas hastalıkları ile de ilişkili olabilir. Enzim değerlerindeki yükselme tipik olarak 300 U/L'den düşüktür fakat rbdomyoliz gibi durumlarda akut hepatosellüler hasar gelişen hastalardaki gibi çok daha yüksek seviyelere ulaşabilir. Akut kas hasarı tablolarında serum AST/ALT oranı 3:1 'e kadar yükselebilir fakat AST yarılanma ömründen dolayı hızlıca 1:1 'e geriler. (85). Kronik kas hastalıklarında oran tipik olarak 1:1 civarındadır. (23).

Kronik viral hepatit ve non-alkolik yağlı karaciğer hastalığında AST/ALT oranı tipik olarak 1'in altında olmasına rağmen siroz tablosu geliştikçe oran yükselir ve hatta 1'i geçer. Siroz gelişimi ile ilişkili olarak bu orandaki yükselmenin; fonksiyonel hepatik kan akımındaki azalmaya ve AST'nin hepatik sinusoidal alımındaki azalmadan kaynaklandığı düşünülmektedir. (86)

Tablo 2: Yetişkinlerde Serum Aminotransferaz Yüksekliği Nedenleri (23)

Kronik, Orta Dereceli Yükseklik, ALT > AST (< 150U/L ya da < 5xNÜS)

Hepatik Nedenler

- α 1 – Antitripsin Eksikliği
- Otoimmün Hepatit
- Kronik Viral Hepatit (B, C, D)
- Hemokromatozis
- İlaçlar ve Toksinler
- Steatoz ve Steatohepatit
- Wilson Hastalığı

Non-Hepatik Nedenler

- Çölyak Hastalığı
- Hipertiroidizm

Kronik, Orta Dereceli Yükseklik, AST > ALT (< 150U/L ya da < 5xNÜS)

Hepatik Nedenler

- Alkol ilişkili karaciğer hasarı (AST/ALT > 2:1, AST hemen daima < 300 U/L)
- Siroz

Non-Hepatik Nedenler

- Hipotiroidizm
- Macro-AST
- Miyopati
- Ağır Egzersiz

Ciddi, Akut Yükseklik, ALT > AST (> 1000U/L ya da 20-25xNÜS)

Hepatik Nedenler

- Akut Kolestaz
- Akut Budd-Chiari Sendromu
- Akut Viral Hepatit
- Otoimmün Hepatit
- İlaçlar ve Toksinler
- Hepatik Arter Ligasyonu
- İskemik Hepatit
- Wilson Hastalığı

Ciddi, Akut Yükseklik, AST > ALT (> 1000U/L ya da 20-25xNÜS)

Hepatik Nedenler

- Altta Yatan Alkolik Karaciğer Hasarı varlığında İlaçlar ve Toksinler

Non Hepatik Nedenler

- Akut Rabdomyoliz
-

NÜS: normalin üst sınırı

Artmış serum aminotransferazı saptanan hastaların çoğunluğu asemptomatiktir ve rutin taramalar esnasında hafif bir yükseklik (≤ 5 -kat) olduğu görülür. Bu hastalarda ilk yapılması gereken testlerin tekrarı ile yüksekliğin persiste edip etmediğinin gösterilmesidir. Sonraki adım, hastanın kullandığı tüm ilaçların (reçetesiz ilaçlar, tamamlayıcı-alternatif tıp ilaçları, bağımlılık yapıcı maddeler dahil) ayrıntılı olarak sorgulanmasıdır. Neredeyse tüm ilaçlar, serum aminotransferaz düzeylerini artırma potansiyeline sahiptir. Sıklıkla karşılaşılan ajanlar arasında; NSAI ilaçlar, antibiyotikler, hidrosimetilglutaril-koenzim A redüktaz inhibitörleri, antiepileptikler ve anti-tüberküloz ilaçları yer alır. İlaça bağlı karaciğer enzim yüksekliği düşünülen durumlarda, ilacın kesilmesi ile enzim değerlerindeki gerilemenin gözlenmesi bu ilişkinin kurulmasını destekler. Ek olarak kas hastalıkları serum kreatin kinaz ve aldolaz düzeyleri kontrol edilerek ekarte edilmelidir. Bir sonraki aşama sık görülen ve tedavi edilebilir karaciğer hastalıklarının (kronik hepatit B ve C, hemakromatozis, otoimmün hepatitler, Wilson hastalığı, non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı) araştırılmasıdır. Bu hastalıklara yönelik araştırmalar sonrası bir tanı elde edilemezse daha nadir görülen durumlar ($\alpha 1$ –antitripsin eksikliği, tiroid bezi hastalıkları ve çöliak hastalığı gibi ekstrahepatik nedenler) araştırılmalıdır. Yine bir tanı elde edilemezse enzim düzeylerindeki yüksekliğe göre sonuçlara bir katkısı olmama ihtimali de göz önünde bulundurularak karaciğer biyopsisi yapılması düşünülebilir.

2.5.3. Alkalen Fosfataz

Alkalen fosfataz (ALP) terimi vücuda yayılmış durumda bulunan bir grup izoenzimi tanımlar. (87). Erişkinlerde en yüksek klinik öneme sahip izoenzimler karaciğer ve kemikte bulunur çünkü bu organlar major serum ALP kaynağıdır. Diğer izoenzimler; plasenta, ince barsak ve böbreklerden orijin alırlar. ALP, karaciğerde hepatositlerin kanaliküler membranı üzerinde bulunur ve yarılanma ömrü ortalama 7 gündür. Degredasyon alanları net olarak bilinmese de ALP'nin serumdan klirensi biliyer traktın açıklığından ve karaciğerin fonksiyonel kapasitesinden bağımsızdır. Hepatobiliyer hastalık, safra asitleri aracılığıyla enzim sentezinde artış olması ve seruma sızıntı sonucu serum ALP düzeylerinin artmasına neden olur. (88).

Serum ALP düzeylerinde bir dizi bireysel varyasyonlar söz konusudur. Kan grubu O ve B olan hastalar, yağlı bir yemekten sonra barsak ALP'sinin salınmasından dolayı serum ALP düzeylerinde yükselmelere sahiptir. (89). İntestinal orijinli serum ALP yükseklikleri benign familial durumlarda görülür. Serum ALP düzeyi yaşa bağlı değişkenlikler gösterir.. Serum ALP düzeyi kadın ve erkeklerde 30 yaşından sonra artsa da kadın cinsiyetteki artış erkeğe göre daha belirgindir; 65 yaşında sağlıklı bir kadındaki değer 30 yaşındaki sağlıklı bir kadına göre %50 daha fazladır. (90). İzole serum ALP yüksekliği olan bir kişide bu yüksekliğin karaciğer mi yoksa kemik kökenli mi olduğunun ayırt edilmesinde serum GGT ve 5'NT değerlerinden yararlanır. Düşük serum ALP düzeyleri; özellikle fulminan hepatit ve hemoliz ile presente olan Wilson hastalığında, bakır ile kofaktör olan çinkonun yer değiştirmesine bağlı enzim aktivitesindeki azalmadan dolayı düşük bulunabilir. (23)

2.5.4. Gama Glutamil Transpeptidaz

Gama glutamil transpeptidaz (GGT) , karaciğer (hepatositler, kolanjiositler), böbrek, pankreas, dalak, kalp, beyin ve seminal vezikül de dahil birçok dokuda hücre membranında yerleşik halde bulunur. Sağlıklı insanlarda serumda bulunur ve düzeyi cinsiyete göre değişmez yada gebelikte artmaz. Artmış serum GGT düzeyleri, hepatobiliyer hastalık için yüksensensitiviteye sahip olsa da spesifitesinin düşük oluşu klinikteki kullanımını kısıtlar. Serum GGT düzeyinin primer kullanımı, izole serum ALP yüksekliğinin kaynağının tespitine yöneliktir; kemik hastalıklarında GGT

yükseklik göstermez. (91). GGT; fenitoin, barbitürat, bazı anti-retroviral ajanlar, non-nukleozid reverse transkriptaz inhibitörleri ve proteaz inhibitörü olan abacavir kullanan hastalarda yüksek saptanır. (92)

Serum GGT düzeyleri alkol kullanımında da yüksek bulunur, sensitivitesi %52 ila %94 arasında değişir. Bir çalışmaya göre serum GGT düzeyleri ile hepatosellüler karsinoma arasında yüksek risk olduğu ileri sürülmüştür. (93). GGT düzeyleri, laparoskopik kolesistektomiye verilen hastalar arasında safra yolu taşı öngörülmesinde %97,9 düzeyinde bir negatif prediktif değere sahiptir ki bu ALP, total bilirubin, ALT ve AST'nin prediktif değerinden çok daha yüksektir. (94). 560.000 sağlık sigortası kaydı ile yapılan metabolik sendrom, diabetes mellitus ve kardiyovasküler hastalığı içeren bir çalışmada izole GGT yüksekliği, artmış mortalite riski ile ilişkili bulunmuştur. (95)

2.5.5. 5' Nukleotidaz

5' Nukleotidaz (5'NT) kanaliküler ve sinusoidal plazma membranları ile ilişkilidir ve fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca intestinal sistem, kalp, kan damarları ve pankreasın endokrin kısmında da bulunmaktadır. Serum 5'NT düzeyleri cinsiyet ve ırktan bağımsızdır fakat yaşla birlikte artar, 50'li yaşlarda plato düzeyine ulaşır. Serum 5'NT düzeyinin kullanım alanı GGT gibi, izole ALP yüksekliği kaynağını göstermeye yöneliktir. 5'NT düzeyleri, kemik hastalıklarında artmaz fakat hepatobiliyer hastalıklarda yüksek bulunur. (23)

2.5.5.1. ALP GGT ve 5'NT Yüksekliğine Yaklaşım

İzole ve asemptomatik ALP yüksekliğine yaklaşımda ilk basamak doku kaynağını belirlemektir. Bunu yapmanın en kesin yolu elektroforez ile fraksiyon belirlemektir; her ALP izoenzimi farklı elektroforetik hareketliliğe sahiptir. (96). Alternatif bir method da serum GGT ve 5'NT düzeylerini kontrol etmektir; ikisinin birlikte yüksek bulunması ALP yüksekliğinin hepatobiliyer bir hastalık sonucu geliştiğini doğrular. Normal aralıkta bir 5'NT düzeyi hepatobiliyer hastalık ihtimalini dışlamaz çünkü

5'NT ve ALP düzeyleri erken dönem yada hafif şiddette karaciğer hasarında paralel olarak yükselmez ve bu da GGT'yi bakılması gereken esas test yapar. (23)

Karaciğer kökenli bir serum ALP artışı primer olarak kolestatik hastalıkların (özellikle sarılıkla seyreden azalmış safra akımı ilişkili bozukluklar) ayırt edilmesinde işe yarar. Aminotransferazlara oranla daha yüksek seviyede bir serum ALP düzeyi genellikle kolestatik bozukluğu gösterir. İntrahepatik yada ekstrahepatik kronik kolestazi olan hastaların yaklaşık %75'inde serum ALP düzeylerinde 4 kat bir artış olduğu görülür, bundan daha az olan artışlar nonspesifik kabul edilir ve birçok durumda ortaya çıkabilir (23).

Yüksek ALP düzeylerinin değerlendirilmesinde safra yolları görüntülemesi merkezi bir yer tutar. Dilate intrahepatik kanalların olmayışı, araştırmayı kolestazın intrahepatik nedenlerine (Tablo 3) yönettiren, dilate kanalların görülmesi ekstrahepatik kolestazi (Tablo 4) düşündürür. Aminotransferaz yüksekliğinde olduğu gibi kolestatik enzimlerin intrahepatik nedenlere yönelik yüksekliği araştırılırken de öncelikle ilaç kullanımı ayrıntılı bir şekilde sorgulanmalıdır. Şüphelenilen ajanın kesilmesi ile enzimlerde gerileme olması tanının doğrulanması için yeterlidir ve genellikle karaciğer biyopsi yapılması gerekmez. İyileşme süreci yavaş olabilir ve safra kanalı hasarı geliştirse değişiklikler geri-dönüşümsüz olabilir. (23)

Tablo 3: Yetişkinlerde Kolestatik Enzim Yüksekliğinin İntrahepatik Nedenleri (23)

İlaçlar
Primer Biliyer Siroz
Primer Sklerozan Kolanjit
Granülomatöz Karaciğer Hastalıkları
Viral Hepatitler
İdyopatik Erişkin Duktopenisi
Genetik Bozukluklar
Maligniteler
İnfiltratif Karaciğer Hastalıkları
Gebeliğin İntrahepatik Kolestazi
Total Parenteral Nutrisyon
Graft-Versus-Host Hastalığı (GVHD)
Sepsis

Tablo 4: Yetişkinlerde Kolestatik Enzim Yüksekliğinin Ekstrahepatik Nedenleri (23)

İntrinsik Nedenler

Koledokolitiazis
İmmün Aracılığı Duktus Hasarı (PSC, Otoimmün Pankreatit)
Maligniteler(Ampuller Kanseri, Kolanjiokarsinoma)
Enfeksiyonlar

Ekstrinsik Nedenler

Maligniteler(Safra Kesesi Kanseri, Metastatik Tümörler, Pankreas Kanseri)
Mirizzi Sendromu
Pankreatit
Pankreatik Psödokist

2.5.6. Hepatik Sentezi Gösteren Testler

2.5.6.1. Albumin

En önemli plazma proteini olan albumin kantitatif olarak plazma kolloid onkotik basıncının %75'inden sorumludur ve sadece hepatositler tarafından üretilir. Ortalama ağırlıkta bir yetişkin vücudunda yaklaşık 15g/gün albumin üretimi olur ve 300 ila 500 g vücut sıvılarında dağılmış halde bulunur. Yoğun albumin kaybında yada serum albumin düzeyindeki dilüsyonel düşüklüklerde karaciğer sentez hızını 2 kata kadar arttırma yeteneğine sahiptir. (97). Albuminin yarılanma ömrü 14 ila 21 gündür ve yıkım yeri bilinmemektedir. Albumin sentezi; beslenme durumundaki değişikliklere, osmotik basınca, sistemik inflamasyon varlığına ve hormonal düzeylere göre regüle edilmektedir. (98). Bu nedenle hipoalbumineminin ayırıcı tanısında, hepatosellüler disfonksiyona ek olarak malnutrisyon, protein kaybettiren enteropati, nefrotik sendrom, kronik sistemik inflamasyon durumları ve hormonal imbalans yer alır. (23)

Albuminin uzun yarılanma ömrü, akut karaciğer hasarında bir belirteç olarak kullanılmasını sağlar. Yeni tanı bir akut hepatit vakasında 3 g/dL'nin altındaki bir serum albumin düzeyi olayın kronikleşeceğini gösterir. Kronik karaciğer hastalığı ve sirozlu hastalarda, normal veya artmış albumin üretimine sahip olup yine artmış olan dağılım hacminden dolayı düşük serum albumin konsantrasyonlarına sahip olan

sirotik ve asitli hastalar hariç, serum albumin düzeyi hepatik sentez fonksiyonunun mükemmel bir göstergesidir. Karaciğer hastalığı şüphesi düşük olan hastalarda albuminin tarama testi olarak kullanılması fayda sağlamaz; 449 hasta ile yapılan bir çalışmada 56 hastada anormal albumin düzeyleri görülmüş fakat bunların sadece 2'si (%0,4) klinik öneme sahip bulunmuştur. (99)

2.5.6.2. Protrombin Zamanı

Pıhtılaşma; vasküler endotelial hücrelerce üretilen faktör VIII hariç diğerleri karaciğerde üretilen pıhtılaşma faktörlerini de içeren bir dizi enzimatik reaksiyonun sonucudur. Protrombin zamanı (PT), protrombinin trombine çevrilme hızının bir ölçüsüdür ve koagülasyonun ekstrensek yolağını yansıtır. Protrombin sentezinde kullanılan faktörler; II, V, VII ve X'dur. INR, warfarin tedavisinin antikoagülan etkinliğini vurgulamak için kullanılır. INR; protrombin zaman ölçümünü belirli bir laboratuvarında kullanılan tromboplastin reaktifine göre standardize eder. (23)

Uzamış PT, azalmış hepatik sentez fonksiyonu yanısıra pıhtılaşma faktörlerinin konjenital eksikliği, vitamin K eksikliği ve dissemine intravasküler koagülasyon (DİK) durumlarında da görülür. DİK tanısı serum faktör VIII düzeyine bakılarak konulabilir, düzey azalmış olarak bulunur; karaciğer hastalıklarında ise normal yada artmıştır. (23)

Karaciğer hastalıklarında PT ölçümünün en faydalı olduğu durum akut karaciğer hasarıdır. PT, asetaminofen-ilişkili ve asetaminofen dışı karaciğer yetmezliklerinde ve alkolik hepatit vakalarında prognostik değere sahiptir. INR, total serum bilirubin düzeyi ve kreatinin düzeyleri MELD skorunun komponentleridir. MELD skoru dekompanse sirozu olan hastalarda sağkalımın tahmininde kullanılır. (23)

Protrombin zamanı sirotik hastalarda kanama riskinin kesin bir ölçüsü değildir çünkü protein C ve antitrombin gibi antikoagülanların değil de sadece prokoagülan pıhtılaşma faktörlerinin aktivitesini değerlendirir. Parsiyel tromboplastin zamanı (PTT) pıhtılaşma kaskadının intrinsek yolağını değerlendirir ve ileri evre sirozda uzamış bulunur. Uzamış PTT, koagülopatinin değerlendirilmesinde PT'den daha az sensitiftir. (23)

2.5.7. Hepatik Fibrozis Tespitine Yönelik Testler

Hepatik fibrozisin tespitinde karaciğer biyopsisi standart olsa da non-invaziv ölçüm methodları geliştirilmektedir ve umut vadedicidir. (100). Bu methodlar, hepatik fibrogenezisin derecesini gösteren tek bir serum biyokimyasal markerı (bugüne kadar en iyi olanı hyaluronandır) ve hepatik fibrozisin saptanmasında ve derecelendirilmesinde multiparametre testlerini (literatürde 20'den fazla test bulunmaktadır) içerirler. (23)

Hyaluronan mezenkimal hücrelerde üretilen bir glukosaminoglikandır ve ekstrasellüler alanda dağılmış halde bulunur. Hepatik sinusoidal hücrelerince yıkılır, serum düzeyleri sinusoidal kapillarizasyon sonucu sirotik hastalarda artmış bulunur. Kronik karaciğer hastalığı olan hastalarda sirozun tayininde 100 mg/L üzerindeki açlık hyaluronan düzeyinin %83 sensitivite ve %78 spesifiteye sahip olduğu gösterilmiştir. (101). Preoperatif serum hyaluronan düzeyleri, hepatektomi sonrası hepatik disfonksiyon gelişimi ile korelesyonu göstermede de kullanılmıştır. (23)

FibroTest, işlevselliği en iyi ispat edilmiş olan multiparametre kan testidir. Test haptogloblin, bilirubin, GGT, apolipoprotein A-1 ve $\alpha 2$ –makroglobulin içerir ve kronik hepatit C tanılı hastalarda ileri fibrozisin tanısında yüksek pozitif ve negatif prediktif değerlere sahip olduğu gösterilmiştir. Kronik hepatit B tanılı hastalarda ve alkolik karaciğer hastalıkları ile metotreksat alan psöriazis hastalarında da benzer performansa sahip bulunmuştur. FIBROSpect II daha yeni bir testtir ve hyaluronat, doku inhibitörü metalloproteinaz-1 ve $\alpha 2$ –makroglobulin içerir. (23)

Transiyent elastografi, hepatik sertliği ölçmek için ultrasonografi dalgalarını kullanan bir non-invaziv tekniktir ve 2013 yılında karaciğer hastalıklı hastalarda kullanılmak üzere FDA (Food and Drug Administration)tarafınca geliştirilmiştir. (23). Bir meta-analizde, transiyent elastografi; sirozun olmadığı gösterilmesinde en iyi teknik olarak bulunmasına rağmen düşük dereceli fibrozis tanısında yetersiz bulunmuştur. (102)

Manyetik rezonans elastografi de yine FDA tarafınca geliştirilen bir diğer non-invaziv tekniktir ve kronik karaciğer hastalığı olan hastalarda fibrozisin evrelendirilmesinde transiyent elastografiye göre üstün bulunmuştur. (23)

2.5.8. Kantitatif Karaciğer Fonksiyon Testleri

Kantitatif fonksiyon testleri, karaciğerin eksresyon yada detoksifikasyon kapasitesini değerlendirmede serum bilirubin düzeyinden daha spesifik olması ümidi ile geliştirilmiştir fakat bu testlerin daha yüksek sensitivitesi olmasına rağmen spesifite eksiklikleri ve uygulama zorluğu kullanımlarını sınırlandırmıştır. İndosiyanın yeşili klirens testi, galaktoz eliminasyon kapasitesi testi, kafein klirens testi, lidokain metabolit formasyonu testi, aminopirin nefes testi bu testler arasındadır. (23)

2.6. Kolestazis

Safra sekresyonu hepatositlerde ve kolanjiositlerde bulunan bir dizi membran transport sisteminin fonksiyonuna ve safra salgı aparatının fonksiyonel ve strüktürel bütünlüğüne bağlıdır. Kolestazis Yunanca'da chole; safra ve stasis; hareketsiz duran terimlerinden türetilmiştir ve duktuler hücreler yada hepatositlerdeki sekretuar transportta yetersizlik gelişimi veya karaciğer dışında seyreden ekskresyon yolağında bir blokaj sonucu safra akışında bozulma, duraklama ile karakterizedir. (103). Bunlar da sırasıyla intrahepatik ve ekstrahepatik kolestaz olarak adlandırılır. (104)

Kolestaz, klinik ve biyokimyasal olarak değişen derecelerde sarılıkla (konjuge bilirubin hakimiyetinde), kaşıntı ve artmış serum ALP, GGT, 5'NT, safra asitleri ve kolesterol düzeyi ile ilişkilidir. Hidrofobik safra asitlerinin güçlü deterjan etkisinden dolayı hücre membran hasarı ve fonksiyonlarda yetersizlik gelişebilir. Artan safra asitleri; yeni safra asidi sentezini down-regüle eder ve bu da safra tuzu havuzu ve enterohepatik dolaşımdaki miktarlarında azalma ile sonuçlanır. Ayrıca, artmış kolesterol düzeyleri sonucu hücre membran kolesterol oranı ve akışkanlığı artar, böylece integral membran proteinleri fonksiyonlarında azalma, bozulma gözlenir. (104)

Kolestaz, safra akışındaki akut yada kronik kesilme sonucu olabilir. Biliyer bileşenler için hepatositler ve duktuler epitel hücre membranlarında yer alan spesifik transport proteinlerinin varlığının tanımlanması ve moleküler klonlama alanındaki gelişmeler üzerine kolestatik karaciğer hastalığının moleküler mekanizmaları aydınlatılmaya başlanmıştır. (105). Ayrıca, kolestaz durumunda safra tuzu transport

proteinleri adaptif yanıt geliştirirler ve karaciğeri safra tuzu retansiyonundan korumak için ekstrahepatik yollarla safra tuzu ekskresyonu arttırılır. (106)

İntrahepatik kolestaz, karaciğer hücrelerince oluşturulan safra formasyonunun bozulmasıyla gelişirken; ekstrahepatik yada obstrüktif kolestaz, safrayı karaciğerden intestinal sisteme taşıyan safra duktus tıkanıklığı sonucu gelişir. Kolestaz tablosunda sıklıkla bu iki durumun kombinasyonu görülür. (104)

Yetişkin insanlarda intrahepatik kolestazın esas nedenleri ilaçlar ve gebeliktir. Bu ilaçlar arasında antibiyotikler ilk sırada yer alır. Östrojen preparatları, siklosporin A, rifampisin, glibenklamid, klorpromazin, eritromisin, oksipenisilinler intrahepatik kolestaz yapan ajanlar arasındadır. İlaç nedenli kolestazın spektrumu reversible formdan vanishing bile duct sendromu gibi kronik formlara kadar değişken olabilir. (104).

Birçok ilacın farmakokinetiği insan multidrug rezistans protein-2 (MRP2) tarafından modüle edilmektedir, bu proteinin ekspresyonu ve aktivitesi belirli ilaçlar ve hastalık durumları ile değiştirilebilir. Kanser kemoterapötikleri, ürikozürükler, antibiyotikler, lökotrienler, glutatyon, toksinler ve ağır metallerin transportundan sorumludur. (107). İnsan bazolateral multidrug rezistans protein-3 (MRP3); safra tuzları ve konjuge bileşenleri hepatik hücrelerden kana taşımakla görevlidir ve kolestaz esnasında anlamlı derecede up-regüle olur. Omeprazol kullanımı olan hastaların karaciğerleri, populasyonun kalanıyla karşılaştırıldığında daha yüksek MRP3 protein ekspresyonu olduğu gözlenmiştir. (108). MRP3 up-regülasyonu karaciğer fonksiyonlarının korunmasında önemli olabilir; çünkü MRP3 proteinindeki genetik bozukluklar, gebelik esnasında yada östrojen içeren ajanlarla tedavi sırasında kolestazı indükleyebilir. (109)

Bazı ailesel kolestatik bozukluk tablolarında defektif transporterların tanımlanması, kolestazın moleküler mekanizmalarının anlaşılmasını kolaylaştırmıştır. Bu bağlamda, progresif familial intrahepatik kolestaz (PFIC) ciddi genetik kolestatik karaciğer hastalıkları arasında yer alır ve kanaliküler safra asidi transportundaki defekt sonucu erken infant dönemde ortaya çıkar. (110).

Östrojen içeren ajanlar, gebeliğin intrahepatik kolestazını (ICP) ve oral kontraseptif ilişkili kolestazı tetikleyebilir. Kolestaz tablosu androjenik anabolik steroidlerin kullanımı sonucu da görülebilir. ICP'de gebeliğin son trimesterinde

organik anyon transportu azalır ve serum safra tuzu düzeyi ile konjuge bilirubin düzeyleri yükselir. Bu kolestaz tablosu genetik predispozisyonlarla ve PFIC tip 3 ile ilişkili bulunmuştur. Bening rekurren intrahepatik kolestazın (BRIC) da PFIC tip 1 ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. (104)

Endotoksinemide basolateral ve kanaliküler safra asidi ve organik anyon transportu belirgin derecede bozulmuştur ve bu durum sepsis-ilişkili kolestaz olarak değerlendirilmektedir. (106). Konjuge bilirubin kanaliküler sekresyonunda bozulma olması sepsis ilişkili sarılık durumunu, safra asidinin azalmış sekresyonu ise sepsis tablosunda azalmış safra akımını açıklar. Gram-negatif bakterilerin dış hücre membranındaki lipopolisakkaritler (LPS) ve LPS-aracılı sitokinler; total paranteral nutrisyon ilişkili intrahepatik kolestazda, alkolik ve viral hepatitlerde olduğu gibi hepatobiliyer ekskresyonu bozarlar. (104)

Dubin Johnson gibi bazı herediter moleküler bozukluklarda MRP2 genindeki spesifik mutasyonlar sonucu proteinin hepatosit apikal membranına eklenmesinde sorun gelişir. (111). Yine de bu bening bir hastalıktır ve biyokimyasal yada histolojik kolestaz bulguları görülmez.

Diğer kolestaz nedenleri; obstrüksiyon, ekstrahepatik biliyer atrezi (EBA), primer sklerozan kolanjit (PSC), primer biliyer siroz (PBS) ve bunun bir varyantı olan otoimmün kolanjit durumlarıdır.

Obstrüktif kolestaz, genellikle ekstrahepatik safra kanalları düzeyinde sıklıkla taş yada tümör tarafından biliyer sistemin fiziksel tıkanıklığı sonucu gelişir. Bununla birlikte, safra kanallarında striktür gelişimi yada kronik pankreatite bağlı bir kompresyon durumu da yine bu tabloya yol açabilir. Obstrüktif kolestazlı hastaların biyopsi materyallerinde MDR1mRNA ve MDR3mRNA düzeyleri artmış bulunmuştur ve serum bilirubin ve ALP düzeyleri ile koreledir. (105). Ayrıca, küçük safra yollarındaki bir obstrüksiyon yada duraksama tüm biliyer sistemin tıkanması ile sonuçlanabilir. Bu durum, erken infant dönemde sarılıkla karakterize ve otozomal dominant bir bozukluk olan Alagille Sendromunun mekanizması ile ilişkili olabilir. Safra kanalı proliferasyonu ile birlikte kronik kolestazda görülen değişiklikler, kolanjiyositlerin apikal membranında bulunan ileal sodyum-bağımlı safra tuzu taşıyıcısı aracılığıyla hepatositlerden sekrete edilen kanaliküler safra tuzlarının reabsorpsiyonunu kolaylaştırabilir. (105). Böylece, safra tuzları tekrar dolaşıma

girmiş olur ve ekstrahepatik yollardan ekskrete edilir; safra tuzu havuzu regülasyonu bu şekilde sağlanır ve bu mekanizma ‘kolehepatik şant’ olarak adlandırılır. (112)

Kolestazda klinik bulgular obstrüksiyonun lokasyonuna, sebebine ve artmış pro-inflamatuar sitokinlerce safra tuzlarının sentez ve sekresyonunun azaltılma derecesine bağlıdır. (113)

Safra tuzu retansiyonu sonucu deoksikolat gibi hepatotoksik olan hidrofobik safra tuzları serumda ve ciltte aşırı düzeylerde birikerek kaşıntıya sebep olur. Tüm dokularda artmış kolesterol birikimi, özellikle tendinöz ksantomalar ve periorbital ksantelemalar görülür fakat klinik olarak anlamlı ateroskleroz sık görülen bir durum değildir. Kolestazda, barsak safra tuzu konsantrasyonu diyetle alınan yağların çözünmesi için yetersizdir ve bu yağların kolonik mukozayı irritasyonu sonucu steatore gelişir. Yağda çözünen vitaminlerin (A,D,E,K) ve esansiyel yağ asitlerinin yetersizliği görülür. Bunların sonucu olarak da osteomalazi ve osteoporoz görülür. (113)

2.6.1. Deneysel Kolestaz Hayvan Modelleri

İnsanlarda kolestaza yol açan sebeplerin analiz edilmesi ve sonrasında kolestazın patofizyolojik mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi için deneysel hayvan modellerinin incelenmesi faydalı olmaktadır. Deneysel kolestazda safra akışının supresyonu yada azalması söz konusudur; safra bileşenlerinin retansiyonu sonucu safra sekresyonunu daha da bozan hücre membran hasarı gelişir ve bir kısır döngü oluşur. Bu da kolestaz mekanizmasını kompleks hale getirmektedir. (104)

Deneysel hayvan çalışmaları, osmotik itme basıncını azaltıp sıvı sekresyonunda azalmaya yol açan herhangi bir karaciğer hasarını içerir. Böylece, safra akışının ve safra bileşenlerinin eksresyonunun in vivo ölçümü ile tespit edilebilen kolestaz tablosu gelişir. Endojen safra bileşenlerinin kan düzeylerine bakılarak ve karaciğer dokusundaki değişikliklerin morfolojik olarak gösterilmesi ile kolestaz tanısı konur. (94)

Deneysel kolestaz amaçlı çeşitli hayvan türleri kullanılmasına rağmen en sık tercih edilenler ratlardır. Bu amaçla; endotoksin uygulaması, östrojen uygulaması, ilaç-aracılı kolestaz, total koledok ligasyonu, inkomplet biliyer obstrüksiyon ve

selektif biliyer obstrüksiyon yöntemleri uygulanmaktadır. Endotoksin, etinil-östradiol ve ilaç- etkileşimli modelde hepatosellüler kolestaz oluşturulurken; safra akımına mekanik etki ile oluşturulan koledok ligasyon modellerinde ekstrahepatik kolestaz oluşturulur. (104)

2.6.2. Koledok Ligasyonu

Obstrüktif kolestaz, ekstrahepatik biliyer kanallar düzeyindeki fiziksel daralma sonucu gelişmektedir. Bu nedenle koledok ligasyonunun; hücreler arası vesiküler yolakta ve tight junction bağlantılarının fonksiyonel bütünlüğünde bozulma sonucu kanaliküler plazma membran proteinlerinin ekspresyonunda azalmaya yol açtığı düşünülmektedir. (114). Obstrüktif kolestazda karakteristik olarak interlobuler safra kanallarının tıkanması, portal ekspansiyon ve sentrilobuler hasar ile birlikte safra kanalı proliferasyonu görülür. Bu değişiklikler biliyer basınç artışı ve safra ile portal kan dolaşımı arasındaki tek anatomik bariyerin tight junctionlar olmasından kaynaklanır. (115)

Koledok ligasyonu Kountouras ve ark. tarafınca 1984 yılında, bilinen uzamış toksik injury modellerinden etyopatogenetik olarak farklı tipte bir karaciğer sirozu oluşturmak üzere ortaya konulmuştur. Sık rastlanan bulgular safra kanallarının proliferasyonu ve çoğunlukla periportal yerleşimli hepatosellüler nekroz gelişimidir. Artmış intrabiliyer basınç, anoksi, inflamatuvar mediatörlerin salınımı ve safra asitlerinin sitotoksik etkisi, hepatik fibroz ve sonrasında da sekonder biliyer siroza yol açan enflamatuvar süreçleri uyarır. Ratlarda koledok ligasyonu; karaciğer fonksiyon testlerinde bozulmalar, hemodinamik değişiklikler ve biliyer epitel hücrelerinde, hepatositlerde ve makrofajlarda proliferatif aktivite ile ilişkilendirilmiştir. (5)

Koledok ligasyonu yapılan rat modellerinde; safra bileşenlerinin hepatositlerde retansiyonu sonucu safra kanalının hepatosellüler ekspresyonu bozulur; osmotik aktif bileşenlerin intersitisyuma reflüsüne sekonder olarak osmotik itiş gücü azalır ve hücreler arası geçirgenlik artar. (104). Koledok ligasyonunda tight junction fonksiyonel permeabilitesi etinil estradiol uygulaması ile sağlanan kolestaza göre çok daha fazla etkilenir. (114). Koledok obstrüksiyonu sağlanan ratlarda tipik olarak

safr duktuler reaksiyonu görülür. Bu reaksiyonun önceden var olan safr kanallarının oğalmas yada artmş biliyer basn sonucu kanalların uzamas sonucu olduğu dşnlmektedir ve bu reaksiyon kök hcrelerin proliferasyonu ve diferansiasyonu ile ilişkilendirilmiştir. (116)

2.6.3. Kolestatiz ve Kaşnt

Kaşnt, kolestatik karaciğer hastalıklarında sk görülen bir yakınma olup birçok mekanizma altta yatan temel sorun olarak kabul grmş olsa da kaşntnın esas patofizyolojisi kesinlik kazanmamıştır.

Kolestatik hastalarda kaşntnın varlığı yaygın olmakla birlikte subjektiftir ve tan için esas oluşturmaz fakat bir semptom olarak varlığı ayırıcı tanıda kolestatik hastalıkları dşndrmelidir. Bununla birlikte kolestatiz kaynaklı kaşnt diğer kaşnt sebeplerine göre bazı farklılıklar gösterir; generalize bir paternde tarif edilir, ellerde-ayaklarda ve kıyafet ile temas eden cilt bölgelerinde daha yoğun hissedilir, kaşnma eylemi ile rahatlama sağlanmaz ve geceleri belirginleşir. (117)

PBS ve PSC'nin yansıra gebeliğin intrahepatik kolestat (ICP) da kaşnt ile prezente olabilir. ICP'de kaşnt genellikle avuç içi ve ayak tabanlarında lokalizedir. (118)

Kolestatizın karaciğerden pruritojenlerin salınımına neden olduğu, bu pruritojenlerin de ciltteki nöral kaşnma liflerini uyardığı ve böylece uyarnn spinal kord ve kortekse taşndığı ileri srlmştir. Plazmada yoğunlaşan pruritojenlerin ayrıca doğrudan beyine geçerek nörotransmisyonunda değişikliğe sebep olduğu dşnlmektedir. (119)

Kaşntnın periferik olarak nasıl kodlandığına dair çeşitli teoriler ne srlmştir; yoğunluk teorisine göre kaşnt, ağrı stimuluslarını taşyan nöronal ağ ile taşnmaktadır ve kaşnt uyarn ağrı uyarnına göre daha zayıf bir nöronal tepki oluşturur. Teoriye göre nöronal yanıtta bu yoğunluk fark ile her iki alg arasındaki fark açıklanmaya alışlmş fakat insan deneylerinde kaşnt stimulusu yoğunluğu arttırılmasına rağmen alg ağrıya dnşmemiş, yine benzer şekilde ağrı stimulusu frekansı azaltıldığında alg kaşntya dnşmemiştir. (120; 121).

Öte yandan özgüllük teorisi, kaşıntı ve ağrı duyusunu taşıyan ayrı afferent lifler olduğunu ileri sürmektedir. Bu teori, nosiseptif nöronlardan farklı olarak histamin tarafınca aktive edilen yüksek eşik değere sahip ve düşük yoğunluklu liflerin gösterilmesiyle desteklenmiştir fakat bu liflerin kapsaisin uygulaması ile oluşan nosiseptif stimulusları saptadığı ve böylece spesifik değil de selektif olduğu gösterildiğinde zayıflamıştır. (122).

Spinal düzeyde, pruritoseptörlerin alt grup lifleri, spinal kordun üst laminasında dorsal boynuz nöronları ile sinaps yapar. Histamin, gastrin-releasing peptid reseptör (GRPR) ve serotonin dahil birçok pruritojen bu lifleri aktive edebilir. (122)

Bazı nosiseptif primer sensoriyel lifler ablate edildiğinde kaşıntı yanıtında anlamlı azalma kaydedilmiş ve bu da nosiseptif nöronlar arasında pruritoseptörlerin kaşıntı seçici bir alt grubu olduğunu göstermiş. Bu grup lifler aktive edildiğinde kaşıntı hissi oluşmasına karşın zararlı bir uyarın söz konusu olduğunda da kaşıntı yanıtı değil de ağrı yanıtı oluştuğu görülmüş. (122)

Lisofosfatidik asitin (LPA), histamine benzer şekilde ratlarda kaşıntı yanıtını indüklediği gösterilmiştir. H1 histamin reseptör antagonistleri ve topikal kapsaisin ile tedavinin LPA-aracılı kaşıntı yanıtını inhibe ettiği görülmüş ve bunun histamin yolağı üzerinden olduğu düşünülmüştür. (123). Son yıllarda, kolestatik hastalarda lizofosfatidilkolini LPA'ya dönüştüren enzim olan ototaksin (ATX) ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Ayrıca ATX düzeyleri ICP'de de artmış bulunmuştur. Bu nedenle kolestatik karaciğer hastalıklarında kaşıntının yönetiminde ototaksin, potansiyel bir hedef olarak önemli bir rol oynayabilir. (124). Miyelinsiz sinir uçlarına yakın lokal LPA oluşumu, sinir lifleri boyunca aksiyon potansiyelini güçlendirmekte ve kaşıntı cevabı ile korelasyon göstermektedir. Bu özellik, serum safra tuzları, triptaz, P maddesi ya da mu-opioidler gibi diğer araçlar arasında kurulamamıştır. (125)

1967'de safra tuzlarının kolestatik hastaların ciltlerinde pruritojenik etkili olduğu ileri sürülmüş ve nasobilyer drenaj yada eksternal biliyer diversiyon ile safranin vücuttan uzaklaştırıldığı hastalarda kaşıntıda dramatik azalma olması ile bu düşünce desteklenmiştir. (122)

Endojen opioid sistemi ciltte 2 komponente sahiptir; birincisi enkefalinler ve endorfinler gibi peptidleri; ikincisi de bu peptidlerin bağlandığı reseptörleri (mu, kappa, delta) içermektedir. Hayvanlarda santral sinir sisteminde mu ve kappa reseptörleri kaşıntı modülatörü olarak işlev görmektedir. Mu agonistleri pro-pruritojenik iken; kappa agonistleri anti-pruritiktir. Bu reseptörler arasındaki dengesizliğin sistemik ve periferik yollar üzerinden kaşıntıyı başlatabildiği varsayılmaktadır. (122)

Safra asitleri mast hücrelerinin potent bir aktivatörüdür ve kütanöz mast hücrelerinin safra asitlerince uyarılması sonucu gelişen degranülasyon ile histamin salınımı gelişir. Histamin, birçok allerjik reaksiyonda sorumlu tutulmakla birlikte kolestatik kaşıntıda da rol oynadığı düşünülmektedir Gittlen ve ark. tarafınca yapılan bir çalışmada PBC ve PSC'li hastalarda bakılan serum histamin düzeyleri kaşıntısı olan hastalarda, kaşıntısı olmayanlara göre anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. (126)

Steroid sülfatlar ve disülfatlar, progesteron metabolitleri olup kolestatik kaşıntıda rol aldıkları düşünülmektedir. (127)

2.7. Kolestatik Kaşıntıda Tedavi Yaklaşımları

Primer kolestatik hastalıklarda kaşıntının efektif tedavisi için çeşitli terapötik modaliteler geliştirilmiştir. PBC ilişkili kaşıntının yönetimi, 2009 American Association for the Study of Liver Diseases Derneği (AASLD) tarafınca tanımlanmış ve ilk tercih olarak safra tuzu reçineleri, ikincil tedavi olarak rifampisin, üçüncü sıra tedavi yaklaşımı olarak opioid antagonistleri ve dördüncü sıra tedavi olarak da serotonin antagonistleri ve antihistaminik ilaçlar belirtilmiştir.

Ursodeoksikolik asit (UDKA), PBC tedavisinde en sık kullanılan ajan olmasına, histolojik ve biyokimyasal iyileşme sağlamasına karşın kaşıntının tedavisinde etkin bulunmamıştır. (128). Safra asitlerini ve progesteron metabolitlerini azaltarak etki göstermektedir.

Rifampisin, *Streptomyces mediterranei* tarafınca sentezlenen semi-sentetik bir antibiyotiktir. Transkripsiyon düzeyinde ATX ekspresyonunu azaltarak etki gösterir. Endojen pruritojenik bileşenlerin metabolizmasında görev alan mikrozomal ilaç-

oksidasyon sistemine ait enzimlerin hızlı ve güçlü bir indükleyicisidir. (129). Ayrıca rifampisin, safra asitlerinin hepatosit içine alınmasını artırarak deterjan etkilerini azaltır, intestinal lümeninde sekonder safra asidi sentezine etki ederek hepatotoksik olan litokolik asit sentezini azaltır. (130)

Kolestatik kaşıntıda yaygın ve geleneksel olarak kullanılan bir diğer tedavi, pruritojenlerin vücuttan uzaklaştırılmasını amaçlayan anyon değişim reçineleridir (kolestiramin, kolestipol, kolesevelam). Safra asitlerine bağlanarak terminal ileumdan intrahepatik dolaşıma geçmelerini önleyen suda-çözünmeyen, emilmeyen maddelerdir. (129)

Kolestatik kaşıntıda opioid antagonistleri uygulaması ile kaşıntıda iyileşme görülmesi, endojen opioidlerin kaşıntıda etkin olduğu hipotezini desteklemektedir. (131). Bu amaçla kullanılan ajanlar; nalokson, naltrekson ve nalmefen'dir. Bu grup ilaçların işlevi; kolestaz esnasında artmış olan endojen opioidlerin bağlanmasından kaçınmaktır. (132)

Serotonin, karaciğer hastalıkları ile ilişkili kaşıntıda rol oynamaktadır ve tip III serotonin antagonisti olan ondansetron kolestatik kaşıntıda kullanılmaktadır. (130)

Moleküler adsorban resirkülasyon sistemi (MARS) ile albumin diyalizi, dirençli kolestatik kaşıntıda efektif bir terapötik yaklaşım olarak kabul görmüştür. Kolestatik kaşıntıda plazmaferezin etkinliği henüz kesinlik kazanmamıştır. (122)

Dirençli kaşıntı, hepatik hücresel yada biliyer anormallik bulgusu olmasa bile karaciğer transplantasyonu endikasyonu olabilir. (133)

2.8. Mast Hücre Stabilizatörü Kromalin Sodyum

Mast hücreleri, kemik iliğindeki pluripotent kök hücrelerinden gelişmektedirler, vücutta immatür hücreler olarak dolaşmakta ve hedef dokularına ulaştıklarında olgunlaşmaktadırlar. Olgunlaştıktan sonra bu hücreler; kök hücre faktör reseptörlerini, fibroblast büyümesini destekleyen mediatörleri, proteazlar, kimaz ve triptaz dahil olmak üzere çeşitli faktörleri eksprese eder ve salgırlar, ayrıca fibroblast ve stellat hücrelerden ECM üretimini uyarırlar. (4; 5).

Aktive mast hücrelerinin fibrojenik faktörler sekrete ederek çeşitli doku ve organlarda fibrozis gelişiminde etkin olduğu düşünülmektedir. Karaciğerde mast hücre birikimi özellikle alkolik karaciğer hastalığı, primer biliyer siroz, primer sklerozan kolanjit, biliyer atrezi, hepatolitiazis, kronik hepatik allograft rejeksiyonu ve kolestatik biliyer hastalıklarda görülmektedir. Kronik karaciğer hastalığı ile takipli hastaların karaciğer mast hücre düzeyi ile matriks depozisyonu arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. (7). Ayrıca safra asitlerinin potansiyel mast hücre aktivatörü oldukları bilinmektedir. (134)

Kromolin sodyum, anti-inflamatuvar aktiviteye sahip mast hücresi stabilizatörü kromalinin sodyum tuzlu formudur. Mast hücre membranı boyunca antijen-aracılı kalsiyum kanalı geçirgenliğine etki ederek mast hücrelerinden histamin, lökotrienler ve diğer hipersensitivite reaksiyon substratlarının salınımını önlerler. Nötrofil aktivasyonu ve kemotaksisi ile eozinofil kemotaksisini inhibe ederler. (135; 136)

Kromolin sodyum bikromon serisine mensup bir kimyasal yapıya sahiptir. Moleküler formülü $C_{23}H_{14}Na_2O_{11}$ olup molekül ağırlığı 512.334 g/mol'dür.

Astım, allerjik rinit ve allerjik konjonktivit tedavisinde kullanıldığı gibi ratlar üzerinde koledok ligasyonu yöntemi ile yapılan ve histamin aracılığı ile kolanjiosit proliferasyonun geliştiği deneysel kolestaz modellerinde mast hücre degranülasyonunu önlemede de kullanılmıştır. (137)

2.9. Ototaksin

Ototaksin (ATX) esas olarak A2058 human-melanom hücre kültürü ortamında tespit edilmiş ve hücre migrasyon stimülatörü olarak karakterize edilmiş, ATX'in kanser invazyon ve metastazında otokrin motilite faktörü olarak rol oynadığı ileri sürülmüştür fakat patofizyolojik önemi lisofosfolipaz D (lysoPHD) aktivitesi keşfedilene dek belirsiz kalmıştır. ATX, lisofosfolipidlerin (özellikle lisofosfotidilkolin) hidrolizinden ve dolaşımdaki lisofosfatidik asitin (LPA) üretiminden sorumludur. Serum ATX aktivitesi ile LPA seviyeleri arasındaki güçlü korelasyon insanlarda ve ratlarda gözlenmiştir. (138)

Karaciğer hücreleri arasında hepatik stellat hücreler, myofibroblastlara dönüşerek fibrotik süreçlerde major rol oynamaktadır. Bunun sonucunda da proliferasyon, aşırı ECM üretimi, artmış kontraktilite ve motilite gelişir. Günümüzde karaciğer fibrozisinin, insanlarda ve ratlarda reversible olduğu düşünülmektedir ve hepatik stellat hücrelerin apoptozu, ratlarda deneysel karaciğer fibrozisinde azalmanın gösterilmesi ile desteklenmesi sonucu bu reversibiliteden esas sorumlu olay olarak anılmaktadır. LPA, hepatik stellat hücrelerin proliferasyonunu ve kontraksiyonunu uyarmakta ve in vitro olarak bu hücrelerin apoptozunu inhibe etmektedir. Bunların sonucunda LPA'nın karaciğerde pro-fibrojenik faktör olarak rol oynadığı düşünülmektedir. (138)

Plasma LPA ve serum ATX aktivitesi ile karaciğer fibrozisi arasında ilişki deneysel rat modellerinde doğrulanmıştır. (139). Karaciğer fibrozisi, kronik karaciğer hasarına yanıt olarak gelişmektedir ve sonrasında siroz, portal hipertansiyon, hepatosellüler karsinom ve hatta karaciğer yetmezliğine ilerleyebilmektedir. Fibrozis evrelemede perkütanöz karaciğer biyopsisi altın standart olmakla birlikte karaciğer fibrozisinin artık reversible potansiyeli olan dinamik bir süreç olduğu bilindiğinden hastalığın progresyonunu, klinik sonuçlarını ve tedavi yanıtını izlemek için fibrozis değerlendirmesinde non-invaziv, tekrarlanabilir bir yönteme ihtiyaç duyulmaktadır. (140). Serum ATX aktivitesi ile plazma LPA düzeyleri histolojik olarak karaciğer fibrozis evresi ile güçlü bir korelasyon gösterdiğinden her iki parametrenin de fibrozisin yeni belirteçleri olarak kullanılması düşünülmektedir. Bununla birlikte serum ATX aktivitesi klinik laboratuvar açısından daha kullanışlı bir yöntem olarak görünmektedir. Öncelikle, örnek alımından sonra ortam ısısı etkin bir şekilde kontrol edilemezse LPA düzeyleri anlamlı olarak artış gösterecektir. Bu bulgu, plazmada aşırı derecede LPA üretimine yol açan sentetik ATX ve substratı olan lisofosfotidilkolinin varlığından kaynaklanabilir. (141). İkincil olarak, LPA diğer kaynakların yanı sıra plateletlerden salınır ve klinik öneminin değerlendirilebilmesi için plazma düzeyinin ölçülmesi gerekir. (142). Öte yandan, ATX aktivitesi serumda değerlendirilebilir ve ortam ısısından bağımsızdır. Ayrıca, bir immünoenzimometrik yöntem kullanılarak ATX kitle ölçümü için yüksek-verimli bir test geliştirilmiştir ve geleneksel yönteme göre daha hızlı sonuç alınmaktadır. Bu yöntem ile ölçülen serum ATX konsantrasyonu, karaciğer fibrozis değerlendirmesinde bir marker olarak kullanılmaktadır. (138)

Kremer ve ark. (143) LPA'nın kolestatik kaşıntıda potansiyel bir mediatör olabileceğini ileri sürerek karaciğer fibrozis patofizyolojisinde ATX ve LPA için yeni bir rol tanımlamış,kaşıntısı olan kolestatik hastalarda dolaşımdaki ATX ve LPA aktivitesinde artış olduğunu ve serum ATX aktivitesinin kaşıntının yoğunluğu ile korele olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgu ile artmış serum ATX ve plazma LPA düzeylerinin, karaciğer fibrozisinin bir komplikasyonu olarak kaşıntının patogeneğinde doğrudan etkili olabileceği ihtimali önem kazanmıştır. (138)



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmamız için Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Araştırma Laboratuvarı 02.03.2016 tarih ve 2016-19-02/03 protokol no'lu Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındı. Deneysel çalışmamız Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Araştırma Ünitesinde, Biyokimya ve Patoloji laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

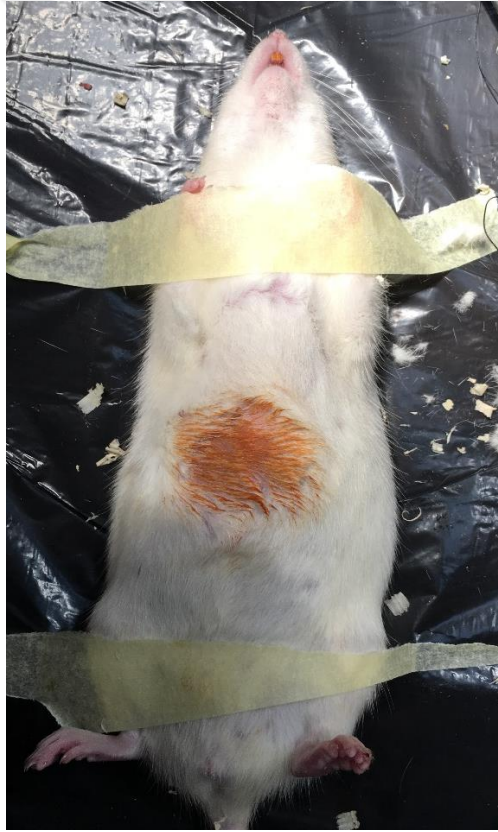
Deneysel hayvanı olarak ağırlıkları 193-296 gram arasında değişen, Sprague Dawley cinsi 69 adet erkek rat kullanıldı. Denekler her grupta 7-12 rat olacak şekilde kontrol ve sham grupları ile birlikte randomize bir şekilde toplamda 8 gruba ayrıldı (Tablo 5).

Tablo 5: Deneysel Çalışma Grupları

1. Grup	Kontrol	Koledok ligasyonu + Serum fizyolojik
2. Grup	SH	Sham
3. Grup	KL+KFA	Koledok ligasyonu + Klorfeniramin maleat
4. Grup	KL+ SERT	Koledok ligasyonu + Sertralin
5. Grup	KL+OND	Koledok ligasyonu + Ondansetron
6. Grup	KL+UDKA	Koledok ligasyonu + Ursodeoksikolik asit
7. Grup	KL+NAL	Koledok ligasyonu + Naloksan
8. Grup	KL+KROM	Koledok ligasyonu + Kromolin sodyum

Uygun oda ısısı ve ışık ortamında barındırılan, serbest erişimli standart sıçan yemi ve su ile beslenen deneysel hayvanlarının deneyden 12 saat önce yem alımı durduruldu. Ratların deney öncesi ağırlıkları ölçüldü ve deney günü 25 mg/kg intraperitoneal tiyopental enjeksiyonu ile genel anestezi uygulandıktan sonra denekler operasyon masasına uygun ışıklandırma altında fikse edildi. İnsizyonun yapılacağı karın orta bölgesi traş edildikten ve %10 polivinilprolidon iyot antiseptik solüsyonu ile temizlendikten sonra 2-3 cm'lik orta hat kesisi ile karın boşluğuna girildi (Şekil 3). Karaciğer usulüne uygun kaldırıldı, sham grubu hariç diğer tüm gruplardaki ratların supraduodenal koledok kanalı belirlenerek, çevre dokulardan

serbestlendikten sonra proksimali çift, distali tek olacak şekilde 5/0 ipek suturele bağlanarak kesildi ve total ekstrahepatik obstrüksiyon sağlandı (Şekil 4, Şekil 5). Sham grubundaki ratların supraduodenal koledok kanalı belirlendi, çevre dokulardan serbestleştirildikten sonra 5/0 ipek suturele koledok altından geçildi fakat ipek bağlanmadan çıkarıldı. İşlem sonrası tüm ratların karın insizyonu 3/0 ipek suturele kullanılarak anatomisine uygun şekilde kapatıldı ve suture hattı %10 polivinilprolidon iyot antiseptik solüsyonu ile temizlenerek ratlar ısıtıcı altında anesteziden uyanmaya bırakıldı. Toplamda 60 deneğe koledok ligasyonu yapılırken 9 denek ligasyon uygulanmayarak sham grubu olarak alındı.



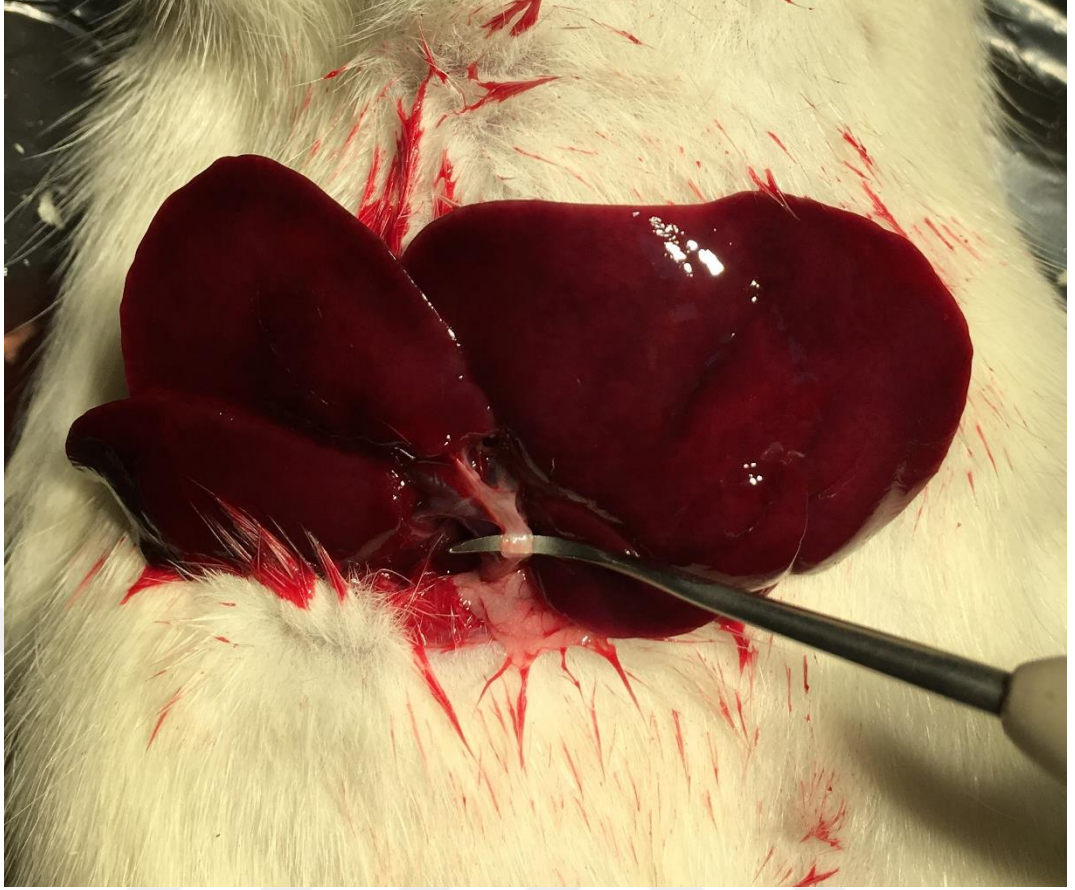
A



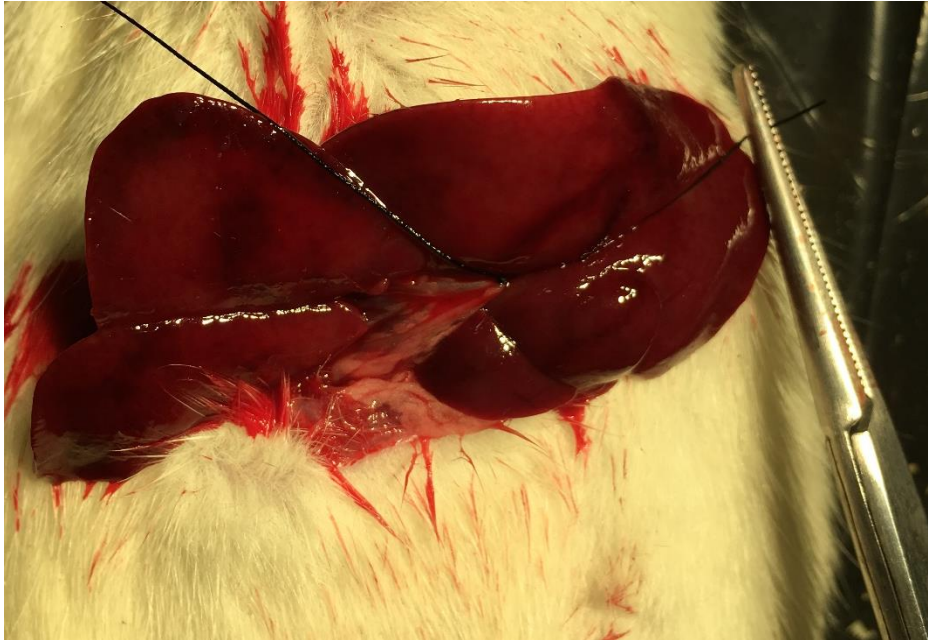
B

Şekil 3: Cerrahi işleme hazırlık

A) Polivinilprolidon iyot ile saha temizliği, B) Laparotomi ve karaciğerin doğurtulması



Şekil 4: Dissektör ile koledok iskeletilize edildi.



Şekil 5: Koledok ligate edildi.

Tedavi gruplarındaki ratlara uygun yolla ilaçları, kontrol grubundakilere ise aynı hacimde serum fizyolojik, cerrahi işlem sonrası 1.günden itibaren 10. güne kadar ardışık her gün uygulandı (Tablo 6). Deneklerin günlük yara bakımı ve enfeksiyon kontrolü yapıldı. Cerrahi işlem öncesi ve deneyin 10. günü ağırlıkları kontrol edilen denekler, deneyin 5. ve 10. günü kaşınma davranışlarının olup-olmadığı açısından gözlemlendi.

Tablo 6: Deneyde kullanılan farmakolojik ajanlar

	Adı	Türü	Uygulama Amacı	Uygulama Dozu(mg/kg)	Uygulama Yolu/Şekli	Uygulama Sıklığı
İlaç1	Klorfeniramin maleat	Histamin H1 rsp. antagonisti	Antipüritik	10	ip	1 defa/gün-10 gün
İlaç2	Sertralin	SSRI	Antipüritik	10	oral	1 defa/gün-10 gün
İlaç3	Ondansetron	5-HT3 rsp. antagonisti	Antipüritik	1	ip	1 defa/gün-10 gün
İlaç4	Ursodeoksikolik asit	Safra asidi	Antipüritik	60	oral	1 defa/gün-10 gün
İlaç5	Naloksan	Opioid antagonisti	Antipüritik	0,01	ip	1 defa/gün-10 gün
İlaç6	Kromolin sodyum	Mast hücre stabilizatörü	Antipüritik olarak araştırılan	50	ip	1 defa/gün-10 gün
İlaç7	Tiyopental sodyum	Barbitürat türevi	Anestezi ve ötenazi amacıyla	25/50	İp	2 defa (1. ve 10. Gün)

Post-operatif 10. gün tüm deneklere 25 mg/kg intraperitoneal tiyopental enjeksiyonu ile genel anestezi uygulanarak kan örnekleri alındıktan sonra denekler yüksek doz anestezi madde ile sakrifiye edilerek doku (cilt-cilt altı, periton zarı, karaciğer) örnekleri alındı (Şekil 6).



Şekil 6: Deneyin 10. gününde dilate safra yolları ve makroskobik patolojik değişiklikler

3.1. Biyokimyasal İnceleme

Deneklerden alınan kan örnekleri, 3500 devirde 5 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra oluşan serum spektrofotometrik yöntemlerle AST, ALT, ALP, GGT, direkt bilirubin ve total bilirubin, total safra asitleri düzeyi; ELISA yöntemiyle histamin ve ototaksin düzeyleri çalışılmak üzere ayrılarak -20°C’de saklandı.

AST, ALT, ALP ve GGT düzeyleri enzimatik yöntemle; bilirübin düzeyleri ise kolorimetrik yöntem ile Roche C6000 (Roche, Tokyo, Japan) otoanalizör cihazında Roche firmasının ticari kitleri kullanılarak çalışıldı.

Rat serum ototaksin düzeyleri sandviç enzim immünoassay tekniği ile ELISA kitleri (USCN life science inc, Wuhan, China) kullanılarak üretici firma protokolü uyarınca çalışıldı. Test-içi ve testler-arası ototaksin değişkenlik katsayısı <12% , plazma örnekleri için ototaksin düzeyi sensitivitesi 0,064 ng/ml idi.

Rat serum histamin düzeyleri kompetitif inhibisyon enzim immunoassay tekniği ile ELISA kitleri (USCN life science inc, Wuhan, China) kullanılarak üretici firma protokolü uyarınca çalışıldı. Test-içi ve testler-arası histamin değişkenlik katsayısı <12% , plazma örnekleri için histamin düzeyi sensitivitesi 0,54 ng/ml idi.

Rat serum total safra asitleri düzeyi NADH ve kromofor varlığında enzimatik metotla ticari kitler (BioVision, CA, USA) kullanılarak üretici firma protokolü uyarınca çalışıldı. Testin saptama sınırı 1 μ M idi.

3.2. Histopatolojik İnceleme

Karaciğer lobektomi, cilt ve periton materyalleri %10 luk nötral formalin solüsyonunda fikse edildi (Şekil 7) ve takip işleminden sonra parafin bloklara gömüldü. Spesmenlerin her biri için ayrı hazırlanan parafin bloklardan, mikrotom cihazı ile 4-5 μ m kalınlığında seri kesitler elde edildi. Kesitler deparafinize edilerek morfolojik inceleme için hematoksilin ve eosin (H&E) ile boyandı.

Safra kanalı ligasyonuna bağlı gelişen karaciğer hasarı, aşağıdaki histopatolojik bulgular yönünden, çalışma grupları bilinmeksizin, tarafsız patolog tarafından, karaciğer dokularından hazırlanan H&E kesitlerin ışık mikroskopisi (Leica DM2500, Almanya) ile incelenmesi sonucu semikantitatif olarak değerlendirildi. Histopatolojik bulgular; portal inflamasyon, lobuler inflamasyon, safra duktus proliferasyonu, nekroz, safra infarktı yönünden hasarın derecesine göre skorlama yapıldı; 0=yok, 1=hafif, 2=orta, 3=belirgin, 4=şiddetli olarak derecelendirildi. Bunların yanısıra fibrozis; 0 = yok, 1 = portal genişleme, 2 = septal formasyon 3 = belirgin köprüleşme fibrozisi, 4 = siroz olarak derecelendirildi. (5; 144; 145; 146). Her çalışma grubundan mikroskopik görüntüler (Zeiss Mikroskop, Axio Imager.A2m, ABD) elde edildi.



A



B



C



D



E



F

Şekil 7: Karaciğer lobektomi materyalleri %10 luk nötral formalin solüsyonunda fikse edildi.

A) Kontrol grubu karaciğer lobektomi kesitleri, B) Sham grubu karaciğer lobektomi kesitleri, C) KL+NAL grubu karaciğer lobektomi kesitleri, D) KL+OND grubu karaciğer lobektomi kesitleri, E-F) KL+KROM grubu karaciğer lobektomi kesitleri

3.2.1. İmmünohistokimyasal boyama:

Dokudaki mast hücrelerini göstermek amacıyla, formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş karaciğer, cilt ve periton materyallerinin kesitlerine immünohistokimyasal boyama yapılmıştır. Spesmenlerden hazırlanan parafin bloklardan polilizinli lamlara mikrotom cihazı ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler deparafinize edilerek ve sitrat pH:7.0 ile mikrodalgada ısıtma yöntemi ile ön aşama uygulanarak, “Mast cell tryptase” mouse monoklonal primer antikor (Clone AA1, Dako, 2 ml konsantre, 1/100, Code-Nr. M 7052) ile standart boyama protokollerine uygun olarak, otomatik immünohistokimyasal boyama cihazında (BenchMark ULTRA Slide Staining System specifications, Ventana Medical Systems, ROCHE, ABD) boyandı (B-SA).

Mast hücre sayısını tespit etmek için, gruplar bilinmeksizin tarafsız patolog tarafından en yoğun boyanma alanı tespit edilerek, bir büyük büyütme alanında (BBA) reaktif hücreler sayıldı (Leica DM2500 ışık mikroskop, x10 oküler lens, x40 objektif lens; BBA= 0.55 mm², Almanya).

3.3. İstatistiksel İnceleme

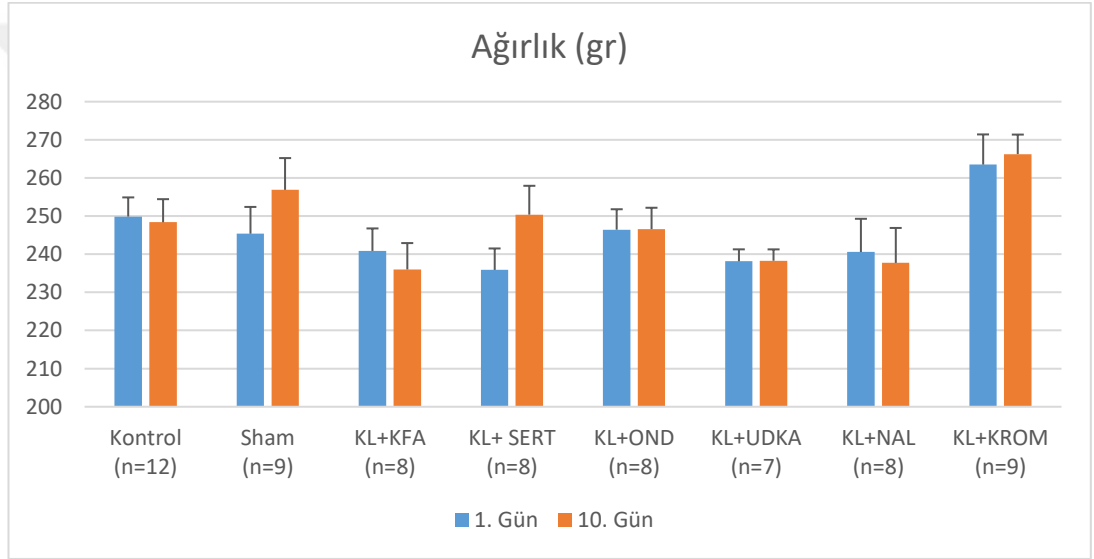
İstatistiksel değerlendirme, SPSS 20.0 programı kullanılarak yapıldı. Sayısal değişkenler, aritmetik ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. Gruplar arası sayısal ölçümlerde farklılık olup olmadığı Kruskal-Wallis varyans analizi kullanılarak değerlendirildikten sonra, ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U Testi ile yapıldı ve p<0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Koledok ligasyonu uygulanan ratlarda sarılık, koyu renkli idrar ve ikterik plazma gibi kolestazın klinik bulguları görüldü.

Deney öncesi ve sonrası ağırlık ölçümlerinde Kontrol, KL+KFA, KL+NAL gruplarında deneklerin ağırlıklarında azalma gözlenirken, diğer gruplarda ağırlık artışı kaydedildi (Grafik 1).

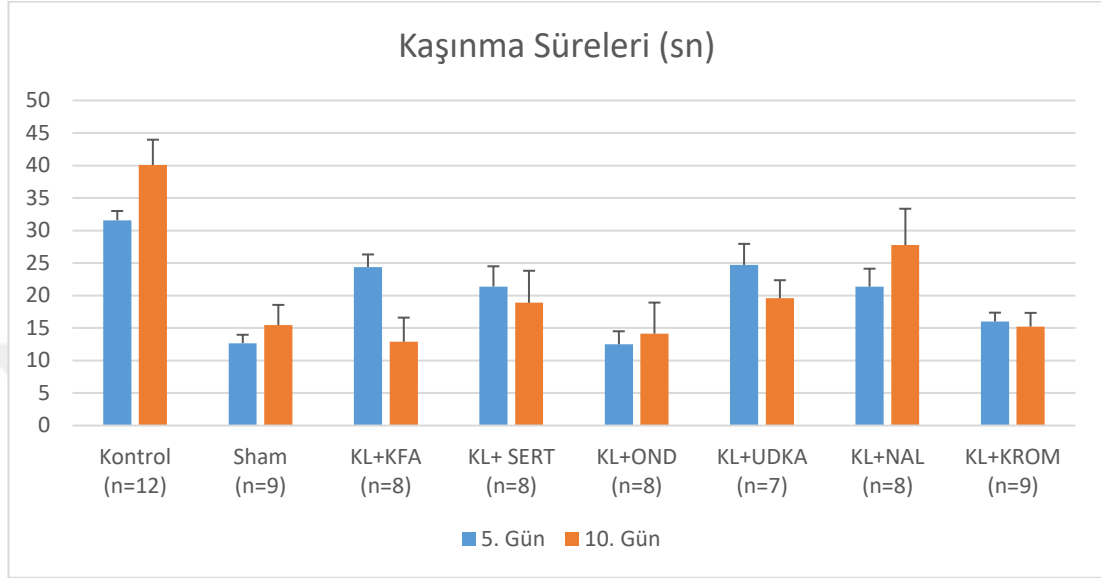
Grafik 1: Deneklerin deneyin 1. gün ve 10. gün ağırlık ölçümleri ortalamaları



Deneyin 5. gününde kontrol grubundaki kaşıntı süresi 31.58 ± 1.42 sn/5dk iken 10.günde 40.08 ± 3.89 sn/5dk olarak izlendi. Kontrol grubundaki kaşıntı süreleri her iki ölçümde de sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazlaydı (sırasıyla $p < 0.001$, $p < 0.001$). Deneyin 5. gününde 5'er dakika boyunca kaşıntı davranışı gözleminde sham grubunda ortalama kaşıntı süresi 12.67 ± 1.29 sn iken KL+OND grubunda 12.50 ± 2 sn ve KL+KROM grubunda 16 ± 1.36 sn olarak sham grubuna yakın süreler şeklinde kaydedildi. Medikal tedavi uygulanan diğer grupların 5. gün kaşıntı süreleri ortalaması 21.38 ± 3.11 ila 24.71 ± 3.23 sn aralığında olacak şekilde kaydedildi. Deneyin 10. gün kaşıntı sürelerine bakıldığında kontrol, sham, KL+OND, KL+NAL gruplarında deneyin 5. gününe kıyasla artış olduğu; KL+KFA, KL+SERT, KL+UDKA ve KL+KROM gruplarında ise azalma olduğu gözlemlendi.

Deneyin 10.gününde tüm grupların ortalama kaşınma süreleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha kısa olduğu gözlemlendi ($p<0.05$) (Grafik 2).

Grafik 2: Grupların 5. gün ve 10. gün kaşınma davranışı gözlemleri



4.1. Biyokimyasal Bulgular

Deneyisel modelimizde kolestazın sağlandığını destekleyecek şekilde serum histamin ve ototaksin düzeylerinin; plazma AST, ALT, ALP, GGT, total bilirubin ve direkt bilirubin düzeylerinin kontrol grubunda, sham grubuna göre anlamlı olarak arttığı görüldü ($p<0.05$) (Tablo 7, Tablo 8). Kruskal Wallis varyans analizine göre gruplar arası karşılaştırmada serum histamin ve ototaksin düzeyleri, plazma AST, ALT, ALP, GGT, total bilirubin (TB) ve direkt bilirubin (DB) düzeylerinde anlamlı fark gözlenirken ($p<0.05$); plazma total safra asitleri düzeyinde anlamlı fark izlenmedi ($p=0.099$).

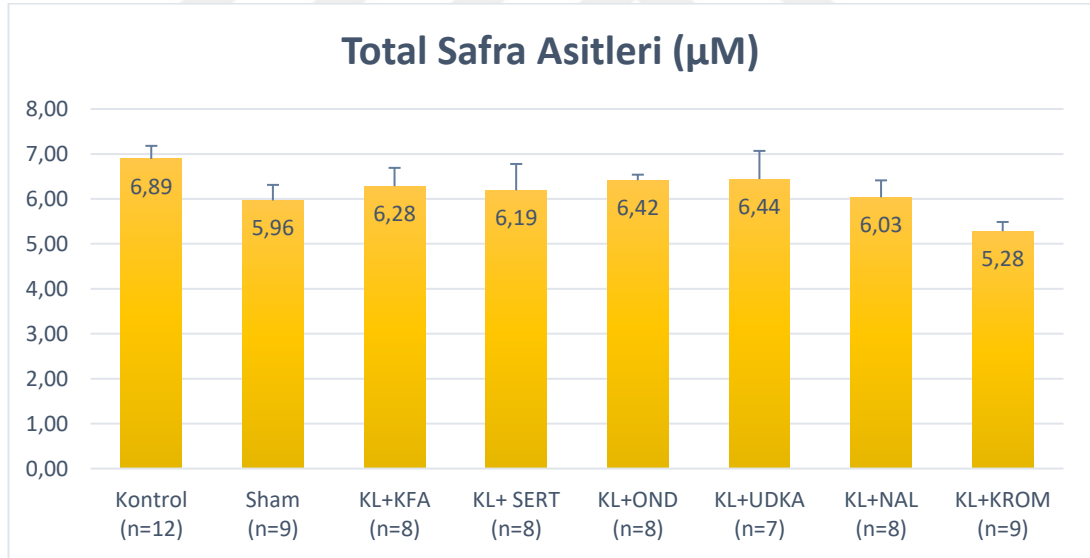
Man Whitney U ikili karşılaştırma testi kullanılarak kontrol grubu ile diğer grupların ikili karşılaştırmasında plazma total safra asitleri düzeyinin sadece KL+KROM grubunda istatistiksel olarak anlamlı azaldığı görüldü ($p=0.001$) (Grafik 3).

Tablo 7: Deneyin post-operatif 10.gününde elde edilen serum histamin ve ototaksin düzeyleri ile plazma total safra asitleri düzeyi

Grup	n	Total Safra Asitleri (μM)	Histamin (ng/mL)	Ototaksin (ng/mL)
Kontrol	12	6.89 \pm 0.29	9.35 \pm 0.18	15.49 \pm 0.13
Sham	9	5.96 \pm 0.35***	7.57 \pm 0.31***	14.86 \pm 0.09***
KL+KFA	8	6.28 \pm 0.41	8.16 \pm 0.33**	15.24 \pm 0.17
KL+ SERT	8	6.19 \pm 0.59	9.40 \pm 0.29	15.22 \pm 0.14
KL+OND	8	6.42 \pm 0.12	9.17 \pm 0.25	15.23 \pm 0.11
KL+UDKA	7	6.44 \pm 0.63	9.20 \pm 0.21	15.44 \pm 0.21
KL+NAL	8	6.03 \pm 0.38	8.68 \pm 0.58	15.02 \pm 0.12*
KL+KROM	9	5.28 \pm 0.21***	8.07 \pm 0.11***	14.61 \pm 0.42**

Veriler Aritmetik Ortalama \pm Standart Hata olarak ifade edilmiştir. Gruplar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ (Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann-Whitney U Testi).

Grafik 3: Grupların ortalama plazma total safra asitleri düzeyi



Ortalama serum histamin düzeyleri yönünden gruplar incelendiğinde (Grafik 4); kontrol grubunda 9.35 \pm 0.18 ng/mL, sham grubunda 7.57 \pm 0.31ng/mL, KL+KROM grubunda 8.07 \pm 0.11 ng/mL, KL+KFA grubunda 8.16 \pm 0.33 ng/mL bulundu. Sham ($p < 0.001$), KL+KROM ($p = 0.001$), ve KL+KFA grubundaki ($p = 0.01$) bu azalma kontrol grubuna göre anlamlı fark gösterdi.

Serum ototaksin düzeyleri yönünden gruplar incelendiğinde (Grafik 4); en düşük ortalama değer KL+KROM grubunda (14.61 ± 0.42 ng/mL) gözlemlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; KL+KROM ($p=0.003$) ve KL+NAL grubunda ($p=0.012$) ortalama değer anlamlı olarak azalmış bulundu. Diğer grupların kontrol grubu ile ikili karşılaştırmasında istatistiksel fark izlenmedi ($p>0.05$)

Grafik 4: Grupların ortalama serum histamin ve ototaksin düzeyleri



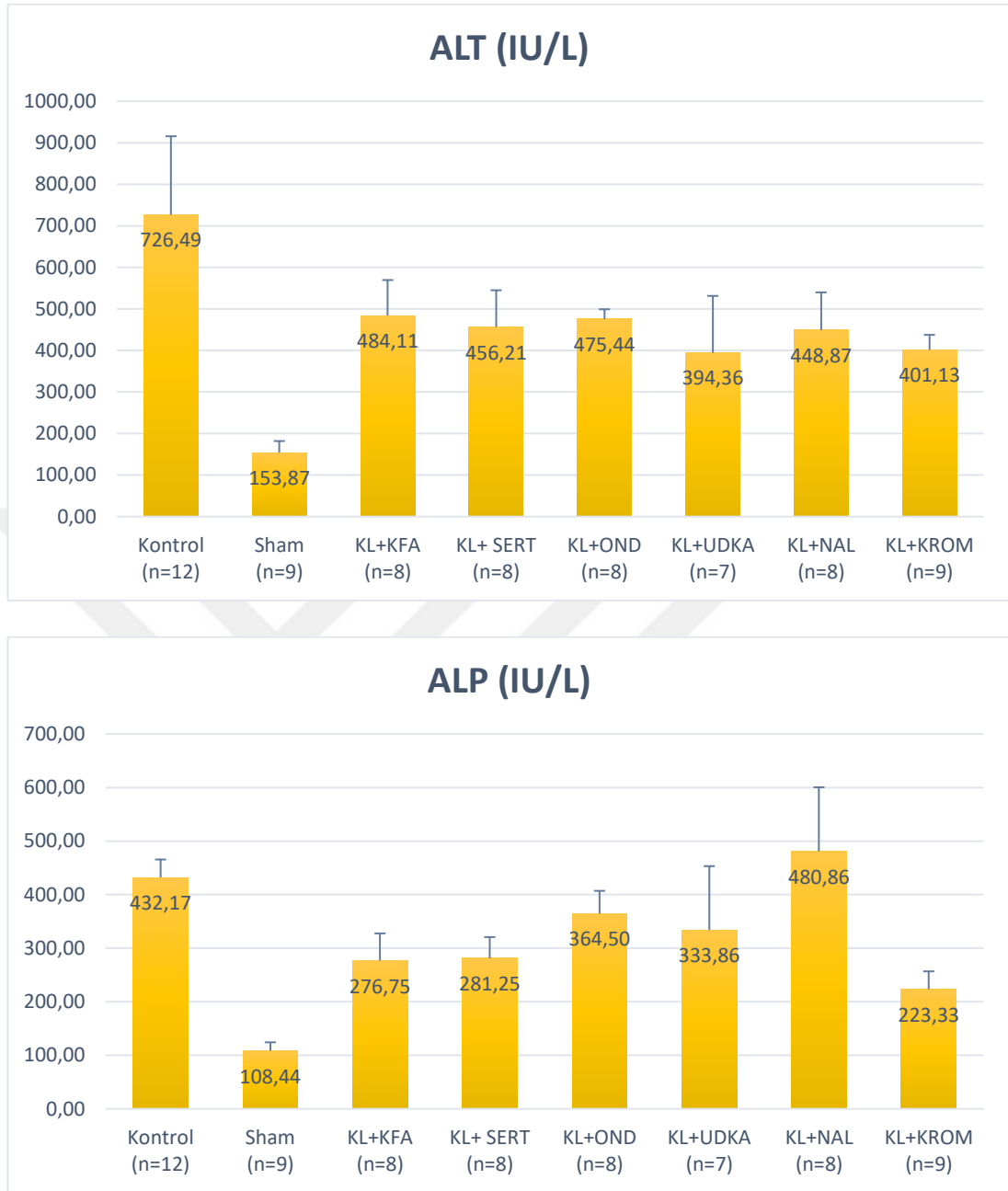
Tablo 8: Deneyin post-operatif 10.gününde elde edilen plazma AST, ALT, ALP, GGT, TB, DB düzeyleri

Grup	n	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	GGT (IU/L)	TB (mg/dL)	DB (mg/dL)
Kontrol	12	97.41 ± 18.09	726.49 ± 189.21	432.17 ± 33.47	60.17 ± 13.70	5.56 ± 0.63	3.81 ± 0.40
Sham	9	34.42 ± 6.24***	153.87 ± 27.97***	108.44 ± 15.80***	0.11 ± 0.11***	0.09 ± 0.03***	0.02 ± 0.00***
KL+KFA	8	74.59 ± 15.77	484.11 ± 85.43	276.75 ± 50.88*	52.25 ± 23.19	5.77 ± 1.19	4.27 ± 1.06
KL+ SERT	8	51.45 ± 8.56*	456.21 ± 88.77	281.25 ± 39.51*	14.00 ± 3.98	4.54 ± 1.37	3.47 ± 1.12
KL+OND	8	72.35 ± 5.42	475.44 ± 23.74	364.50 ± 42.53	33.00 ± 8.73	4.98 ± 0.92	4.01 ± 0.87
KL+UDKA	7	66.39 ± 19.12	394.36 ± 136.93	333.86 ± 119.36	11.57 ± 5.79*	2.26 ± 1.18*	1.33 ± 1.04*
KL+NAL	8	52.40 ± 11.19*	448.87 ± 90.96	480.86 ± 119.63	12.57 ± 5.03*	4.05 ± 1.17	2.14 ± 0.67
KL+KROM	9	70.41 ± 5.72	401.13 ± 36.40	223.33 ± 33.46***	6.89 ± 2.46*	2.72 ± 1.13*	1.47 ± 0.70*

Veriler Aritmetik Ortalama ± Standart Hata olarak ifade edilmiştir. Gruplar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001 (Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann-Whitney U Testi).

KL+KROM grubunda plazma AST ve ALT düzeyleri yönünden kontrol grubuna göre anlamlı fark izlenmedi (p=0.394, p=0.286) (Grafik 5). Plazma AST düzeyleri açısından bakıldığında SH grubu (p=0,001), KL+SERT grubu (p=0.037) ve KL+NAL grubunda (p=0.022) kontrol grubuna göre anlamlı azalma izlendi. Plazma ALT düzeyleri kontrol grubuna göre tüm gruplarda azalmış olsa da istatistiksel fark yalnızca SH grubunda (p=0.001) görüldü.

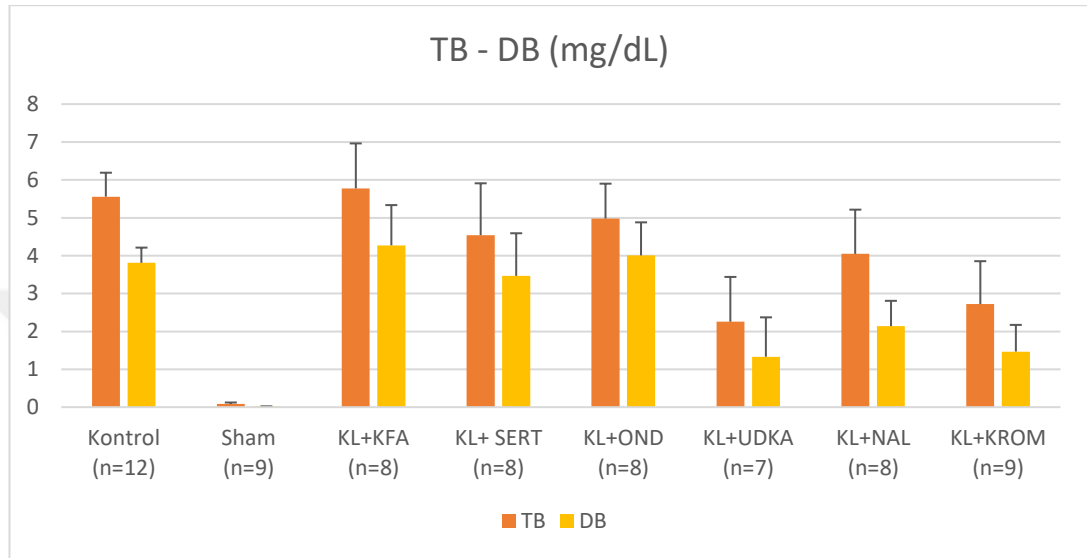
Grafik 5: Plazma ALT ve ALP değerleri karşılaştırması



KL+KROM grubunun plazma ALP, GGT, TB, DB düzeyleri yönünden sham grubu gibi davrandığı ve bu parametreleri anlamlı olarak azalttığı görüldü ($p < 0.05$) (Grafik 5, Grafik 6). İlaçlı tedavi grupları arasında en düşük plazma ALP ve GGT düzeyi KL+KROM grubunda gözlendi. KL+UDKA grubundaki etki plazma GGT, TB ve DB üzerinde anlamlı bulunurken ($p < 0.05$); plazma ALP düzeylerinde anlamlı fark görülmedi ($p = 0.128$). İlaçlı tedavi grupları arasında en düşük bilirubin düzeyine sahip grup KL+UDKA grubu iken KL+KROM grubundaki etki bu açıdan 2. sırada

yer aldı. KL+KFA ve KL+SERT grubunda ise plazma ALP değerleri anlamlı düşük bulunurken ($p=0.017$, $p=0.023$); plazma GGT, TB ve DB değerleri üzerine olan etki, anlamlı istatistiksel fark oluşturacak düzeyde değildi ($p>0.05$).

Grafik 6: Plazma total ve direkt bilirubin değerleri karşılaştırması



KL+OND grubunda bakılan biyokimyasal parametrelerin hiçbirinde anlamlı istatistiksel fark görülmezken ($p>0.05$); en belirgin biyokimyasal iyileşme ilaçlı tedavi grupları arasından KL+KROM grubunda izlendi.

4.2. Histopatolojik Bulgular

Çalışma gruplarına ait karaciğer dokuları, koledok ligasyonuna bağlı gelişen karaciğer hasarı yönünden ışık mikroskopisi ile incelendi ve histopatolojik bulgular Tablo 9’da dökümente edildi.

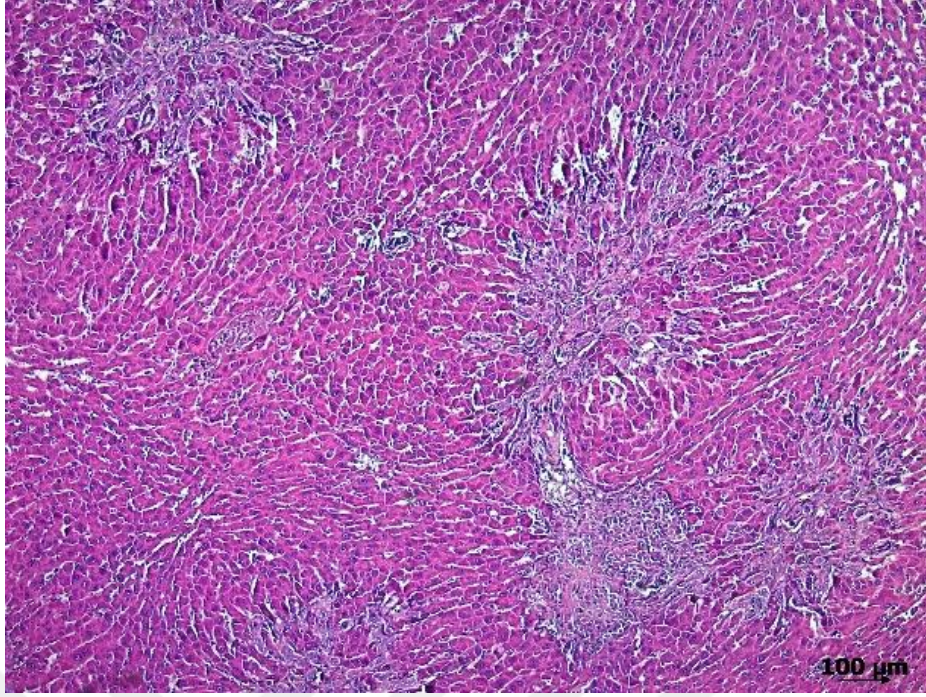
Değerlendirilen portal inflamasyon, lobuler inflamasyon, safra duktus proliferasyonu, nekrozis ve fibrozis parametreleri yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanırken ($p<0.05$), diğer bir histopatolojik parametre olan safra infarktı açısından anlamlı fark bulunmadı ($p=0.104$).

Tablo 9: Koledok ligasyonuna bağlı gelişen karaciğer hasarının histopatolojik bulguları

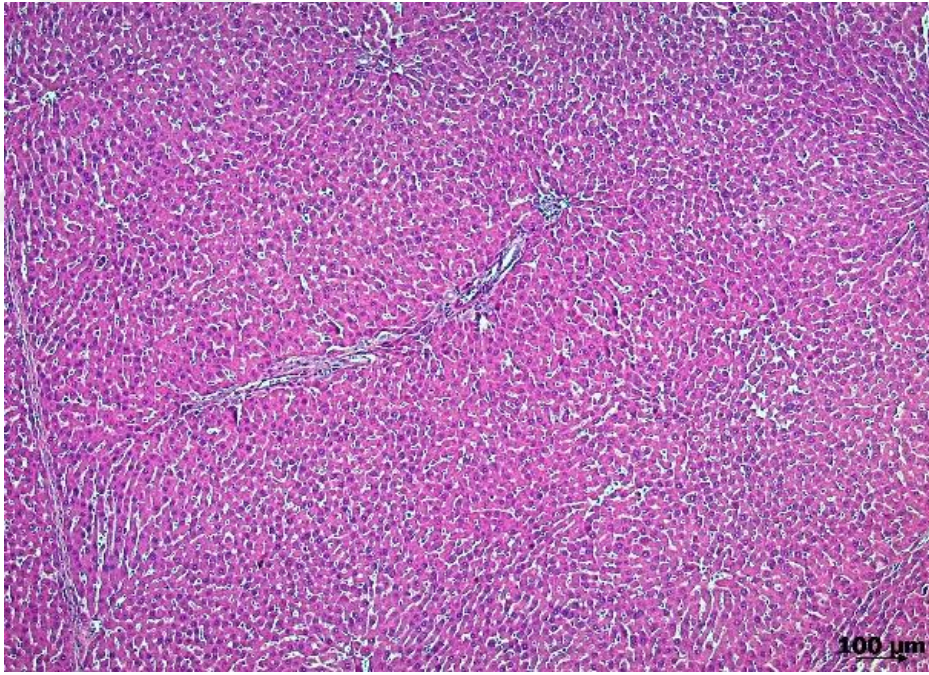
Grup	n	Portal İNFL.	Lobular İNFL.	Safra Duktus Prolif.	Nekroz	Fibrozis	Safra İnfarktı
Kontrol	12	3.67 ± 0.19	3.17 ± 0.21	4.00 ± 0.00	1.83 ± 0.41	2.50 ± 0.15	0.67 ± 0.36
Sham	9	0.67 ± 0.17***	0.78 ± 0.15***	0.00 ± 0.00***	0.00 ± 0.00***	0.00 ± 0.00***	0.00 ± 0.00
KL+KFA	8	2.63 ± 0.46*	1.75 ± 0.25**	3.63 ± 0.26	1.00 ± 0.33	1.75 ± 0.16**	0.13 ± 0.13
KL+ SERT	8	2.25 ± 0.45*	1.75 ± 0.41**	2.63 ± 0.50**	0.38 ± 0.18*	1.25 ± 0.25***	0.00 ± 0.00
KL+OND	8	2.38 ± 0.18***	1.75 ± 0.16***	3.63 ± 0.26	1.25 ± 0.31	2.00 ± 0.00*	0.50 ± 0.50
KL+UDKA	7	2.86 ± 0.46	2.29 ± 0.36	3.57 ± 0.43	1.29 ± 0.52	2.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00
KL+NAL	8	3.00 ± 0.46	2.00 ± 0.27**	3.25 ± 0.49	1.63 ± 0.50	1.75 ± 0.16**	1.38 ± 0.68
KL+KROM	9	2.00 ± 0.29***	2.11 ± 0.31*	2.56 ± 0.41***	0.67 ± 0.24*	1.67 ± 0.29*	0.00 ± 0.00

Veriler Aritmetik Ortalama ± Standart Hata olarak ifade edilmiştir. Gruplar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; * $p\leq 0.05$, ** $p\leq 0.01$, *** $p\leq 0.001$ (Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann-Whitney U Testi).

Sham grubunda hafif lobuler ve portal inflamasyon dışında başka bir bulgu izlenmezken; kontrol grubunda ana safra kanalı ligasyonuna bağlı gelişen belirgin karaciğer hasarı tespit edildi (Şekil 8). Portal inflamasyon, lobuler inflamasyon, safra duktus proliferasyonu, nekroz ve fibrozis açısından sham grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.05$).



A



B

Şekil 8: Karaciğer dokusu ışık mikroskopisi görüntüleri, hematoksilin ve eosin boyama

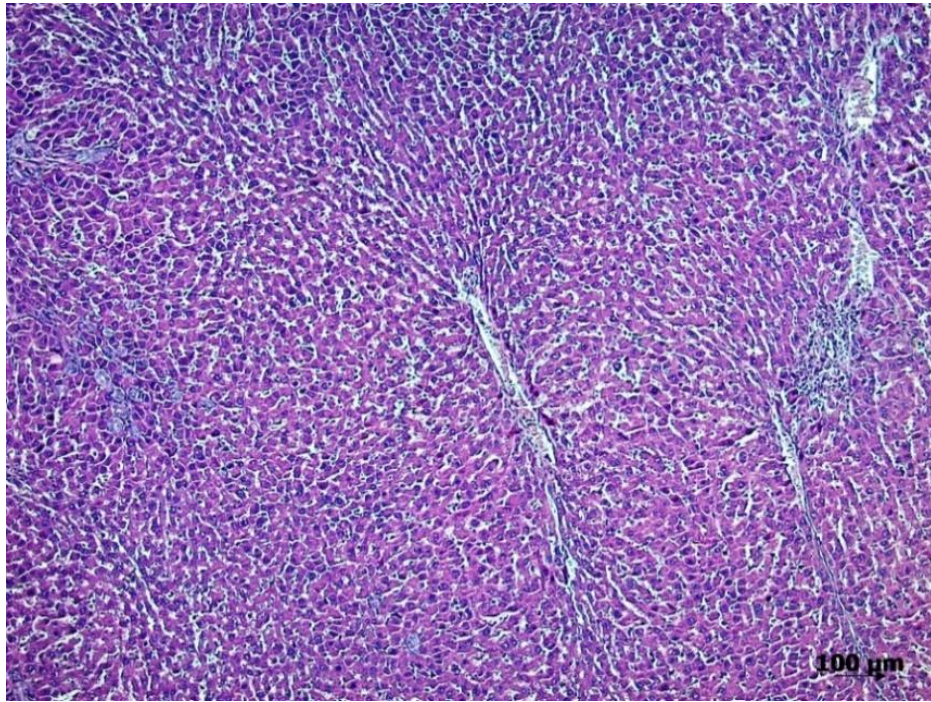
A) Kontrol grubu karaciğer dokusunda koledok ligasyonu sonucu gelişen hasar, B) Sham grubu karaciğer dokusunda gözlenen hafif lobuler ve portal inflamasyon

Kontrol grubunda portal genişleme, septal formasyon ve belirgin köprüleşme fibrozisine kadar ilerleyen fibrotik değişiklikler gözlemlendi. Sham grubunda fibrozis izlenmedi. Çalışma gruplarının hiçbirinde siroz gelişimine rastlanmadı.

KL+UDKA grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece fibrozis açısından istatistiksel anlamlı fark gözlemlendi ($p=0.028$), lobuler inflamasyondaki azalma belirgin olsa da anlamlı bulunmadı ($p=0.053$).

İlaçlı tedavi gruplarından safra duktus proliferasyonu (karaciğerin koledok obstrüksiyonuna reaktif yanıtı) üzerine en anlamlı etkinlik KL+KROM grubunda gözlemlendi ($p<0.001$) (Şekil 9). Klorfeniramin, ondansetron ve naloksan tedavilerinin safra duktus proliferasyonu üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Rat karaciğerleri nekroz açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı iyileşme KL+KROM grubunda ($p=0.042$) ve KL+SERT grubunda ($p=0.015$) izlendi.

Çalışma gruplarına ait cilt ve periton dokularında spesifik histopatolojik bulgu saptanmadı.



Şekil 9: KL+KROM grubu karaciğer dokusu ışık mikroskopisi görüntüsü, hematoxilen ve eosin boyama

4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

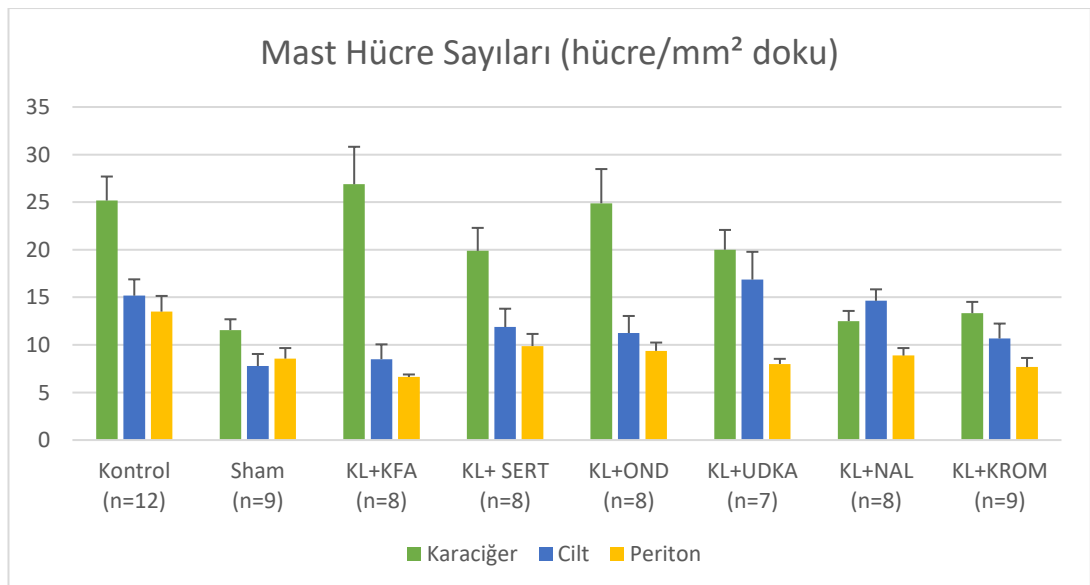
İmmünohistokimyasal uygulanan mast hücre belirteci ile çalışma gruplarına ait karaciğer, cilt ve periton dokularında mast hücre yoğunluğu tespit edildi (Şekil 10,11,12). Grupların ortalama mast hücre sayıları Tablo 10 ve Grafik 7’de verildi.

Tablo 10: Karaciğer, periton ve cilt dokusu mast hücre sayıları

Grup	n	Karaciğer (hücre/mm ² doku)	Cilt (hücre/mm ² doku)	Periton (hücre/mm ² doku)
Kontrol	12	25.17 ± 2.52	15.17 ± 1.72	13.50 ± 1.64
Sham	9	11.56 ± 1.13***	7.78 ± 1.27**	8.56 ± 1.11*
KL+KFA	8	26.88 ± 3.94	8.50 ± 1.56*	6.63 ± 0.26***
KL+ SERT	8	19.88 ± 2.42	11.88 ± 1.92	9.88 ± 1.27
KL+OND	8	24.88 ± 3.60	11.25 ± 1.79	9.38 ± 0.86
KL+UDKA	7	20.00 ± 2.08	16.86 ± 2.92	8.00 ± 0.53**
KL+NAL	8	12.50 ± 1.07**	14.63 ± 1.21	8.88 ± 0.79*
KL+KROM	9	13.33 ± 1.19**	10.67 ± 1.57	7.67 ± 0.96**

Veriler Aritmetik Ortalama ± Standart Hata olarak ifade edilmiştir. Gruplar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann-Whitney U Testi).

Grafik 7: Grupların karaciğer, cilt, periton dokusu mast hücre dağılımları



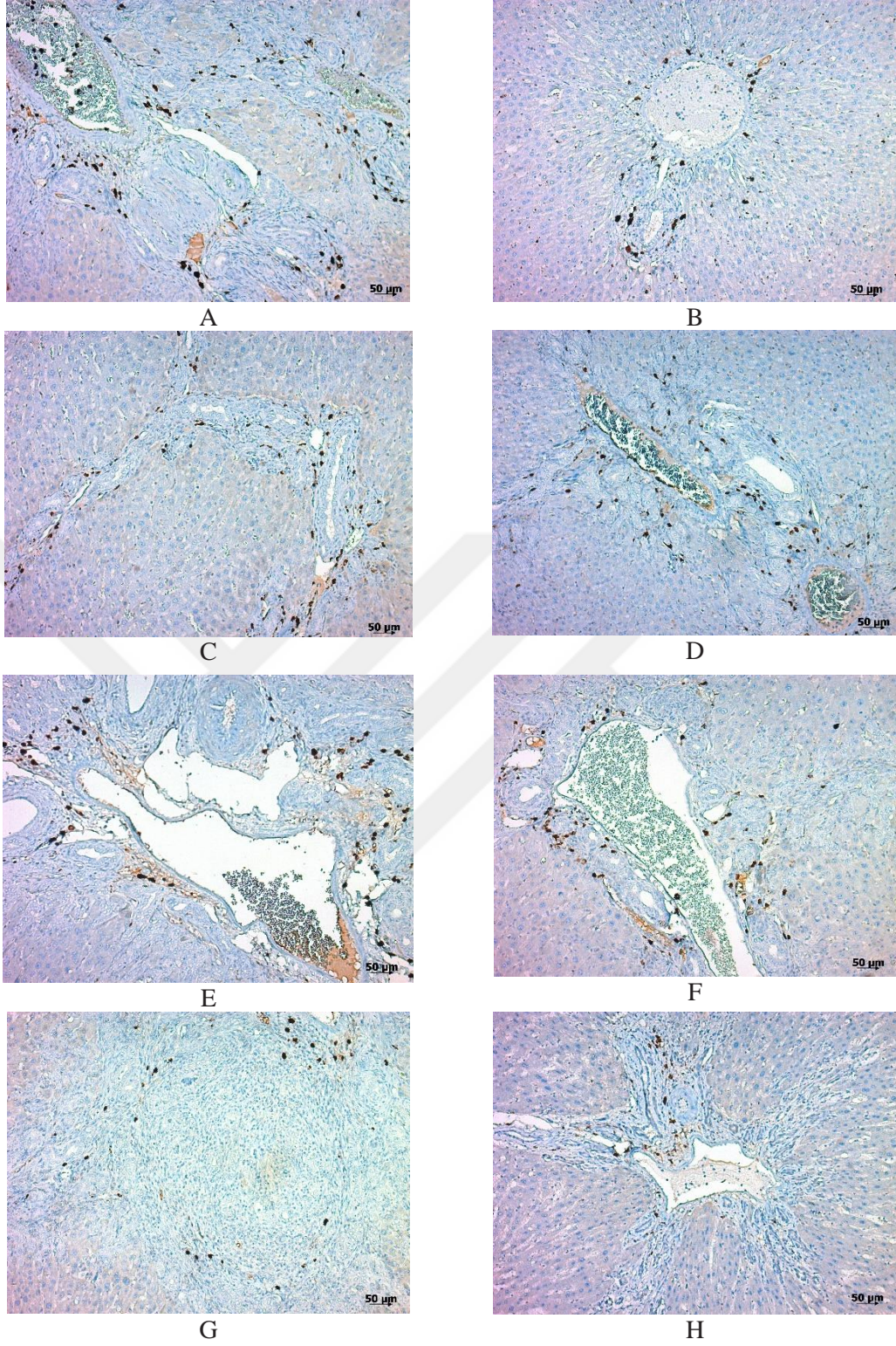
Karaciğer ($p<0.001$), cilt ($p=0.008$) ve periton (0.002) mast hücre sayıları açısından gruplar arası anlamlı istatistiksel fark izlendi.

Gruplar karaciğer mast hücre sayıları açısından değerlendirildiğinde sham grubunda ortalama değer 11.56 ± 1.13 , kontrol grubunda 25.17 ± 2.52 olarak görüldü. Bu değerler KL+KROM grubunda 13.33 ± 1.19 ve KL+NAL grubunda 12.50 ± 1.06 bulunarak kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azaldıkları gözlemlendi (sırasıyla $p=0.003$, $p=0.003$).

İlaçlı tedavi grupları arasından cilt mast hücre sayılarına anlamlı etkinliğin görüldüğü grup ortama 8.50 ± 1.55 ile KL+KFA grubu oldu ($p=0.022$). KL+KROM grubunda cilt mast hücre sayısı ortalama 10.67 ± 1.57 ile azalmış bulunsa da istatistiksel olarak fark saptanmadı ($p=0.09$).

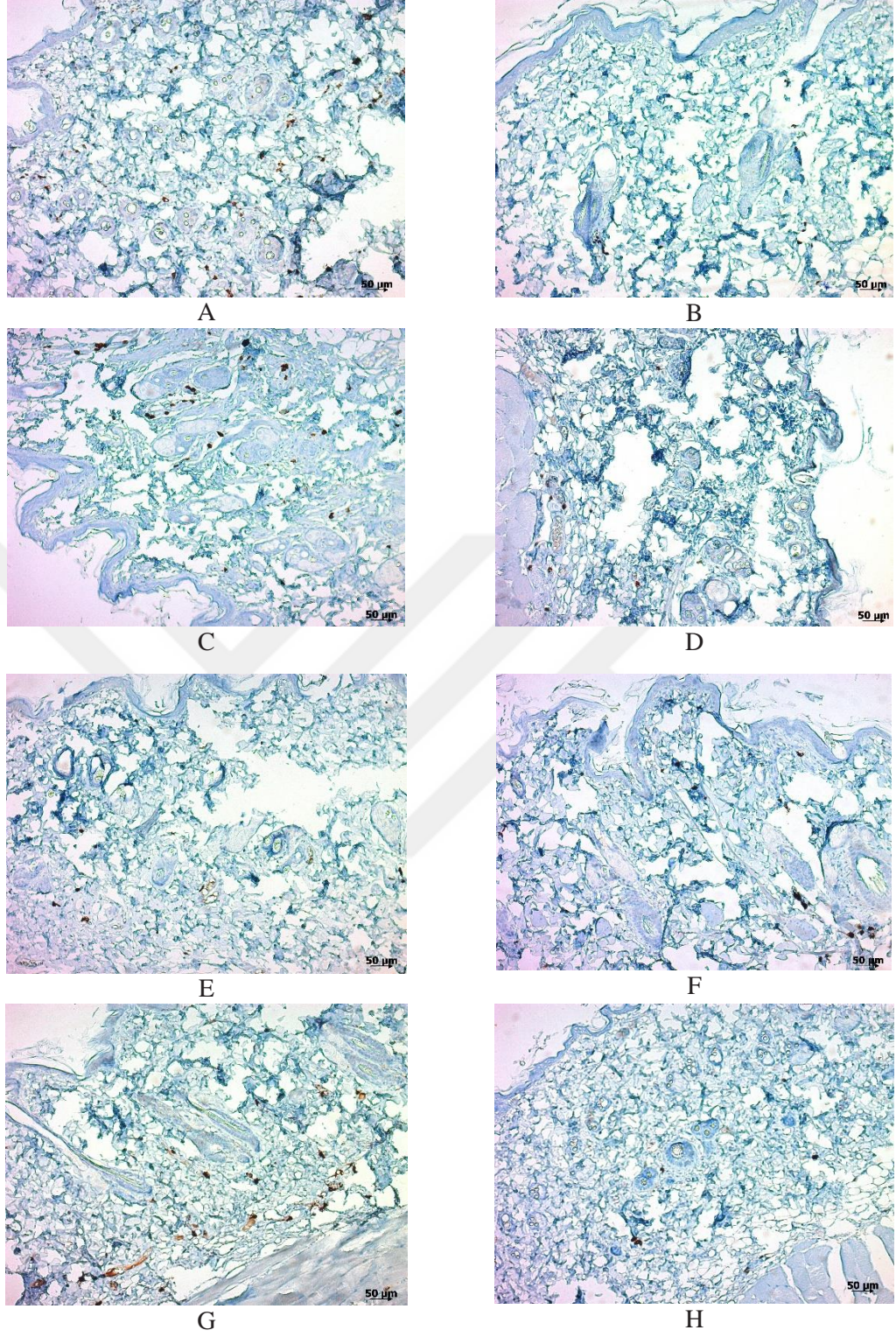
Periton mast hücre sayıları üzerine KL+KROM ($p=0.004$), KL+KFA ($p<0.001$), KL+UDKA ($p=0.009$), KL+NAL ($p=0.016$) gruplarında anlamlı etki gözlemlendi.

İlaçlı tedavi gruplarından KL+SERT ve KL+OND gruplarında karaciğer, cilt ve periton mast hücre sayılarında istatistiksel anlamlı bir azalma gözlenmedi. KL+UDKA grubunda sadece periton mast hücre sayılarının anlamlı olarak azaldığı tespit edildi ($p=0.009$).



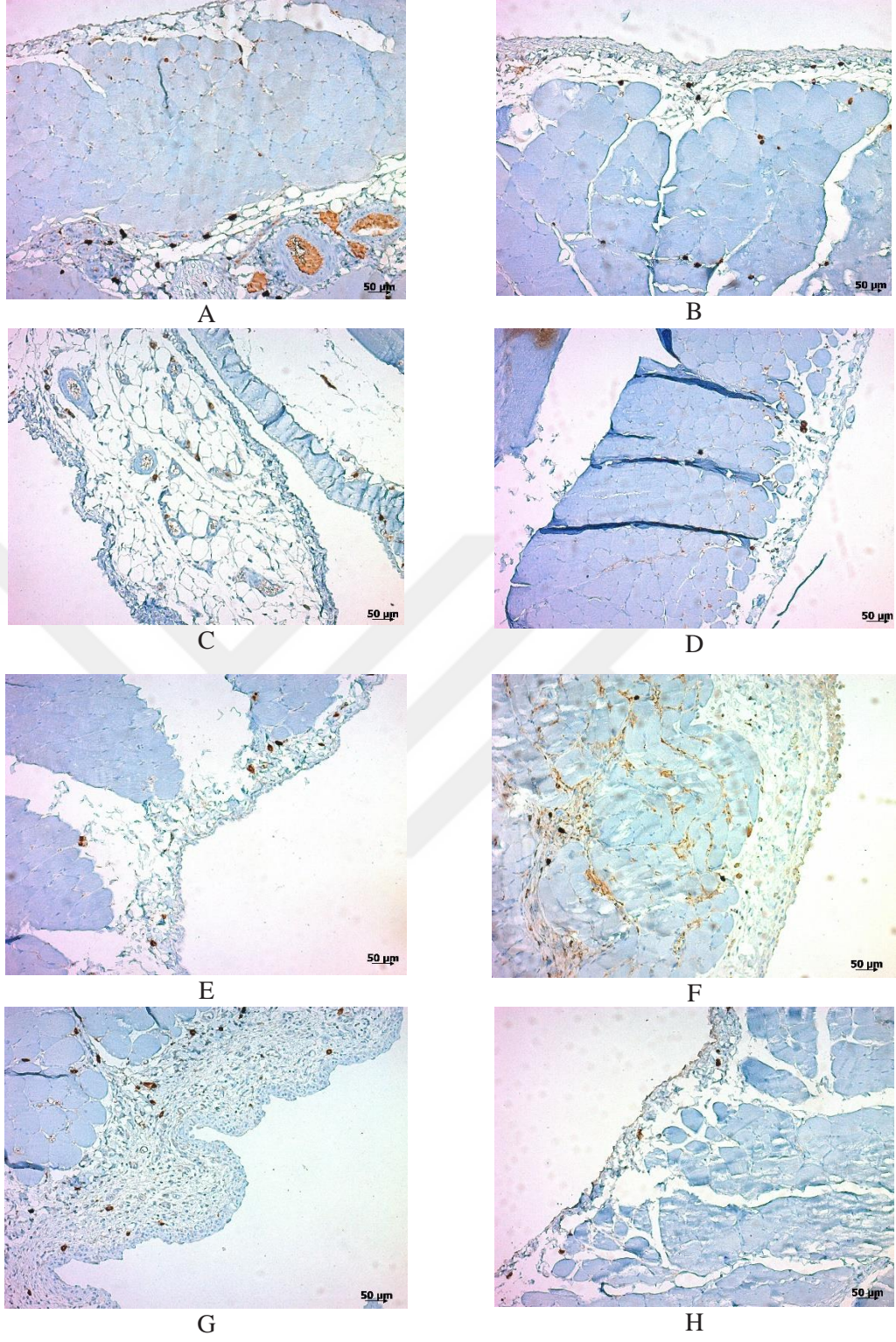
Şekil 10: Karaciğer mast hücreleri dağılımı, immünohistokimyasal boyama

- A) Kontrol grubu, B) Sham grubu, C) KL+KFA grubu, D) KL+SERT grubu,
E) KL+OND grubu, F) KL+UDKA grubu, G) KL+NAL grubu,
H) KL+KROM grubu



Şekil 11: Cilt mast hücreleri dağılımı, immünohistokimyasal boyama

- A) Kontrol grubu, B) Sham grubu, C) KL+KFA grubu, D) KL+SERT grubu,
E) KL+OND grubu, F) KL+UDKA grubu, G) KL+NAL grubu,
H) KL+KROM grubu



Şekil 12: Periton mast hücreleri dağılımı, immünohistokimyasal boyama

- B) Kontrol grubu, B) Sham grubu, C) KL+KFA grubu, D) KL+SERT grubu,
E) KL+OND grubu, F) KL+UDKA grubu, G) KL+NAL grubu,
H) KL+KROM grubu

5. TARTIŞMA

Kolestaz safra sekresyonunda yada akımında azalma, duraklama ile karakterizedir. İntrahepatik kolestaz, karaciğer hücrelerince oluşturulan safra formasyonunun bozulmasıyla gelişirken; ekstrahepatik yada obstrüktif kolestaz, safraı karaciğerden intestinal sisteme taşıyan safra duktus tıkanıklığı ile, biliyer sistemin genellikle ekstrahepatik safra kanalları düzeyinde taş yada tümör tarafından fiziksel tıkanıklığı sonucu gelişir (104). Kolestaz; biliyer atrezi, PBC, PSC gibi kronik inflamasyon zemini bulunan kronik progresif karaciğer hastalıklarının temelini oluşturmakta ve hepatosellüler hasar, ilerleyici hepatik fibrozis, siroz, malign transformasyon ve karaciğer yetmezliğinden ölüme kadar uzanan klinik tablolarla karşımıza çıkmaktadır (147). Obstrüktif kolestaz, klinik ve biyokimyasal olarak değişen derecelerde sarılık, kaşıntı, artmış serum safra asitleri, kolestatik enzimler ve kolesterol düzeyi ile ilişkilidir (104).

Kaşıntı, dermatolojik hastalıkların yanısıra birçok patolojik bozuklukta sekonder semptom olarak sıkça karşımıza çıkan ve kişiyi oldukça rahatsız edebilen, yaşam kalitesini düşürebilen bir durumdur. Metabolik ve sistemik hastalıklar, malignensiler, hematolojik, enfeksiyöz ve nöropsikiyatrik hastalıklarla ilişkili olarak görülebilir. Son evre renal ve hepatik yetmezliği olan hastalarda pruritojenik substantların azalmış renal/hepatik klirensi sonucu kaşıntı gelişebilir (148).

Karaciğer hastalıklarının bir komplikasyonu olan kolestatik kaşıntı, sık karşılaşılan ciddi ve zorlayıcı olabilen klinik bir sorundur. Birçok mekanizma altta yatan temel sorun olarak kabul görmüş olsa da kolestatik kaşıntının esas patofizyolojisi kesinlik kazanmamıştır ve mevcut anti-pruritik ajanların etkinliği, yan etki ile ilişkilendirilmeleri ve kolestatik kaşıntıda tam iyileşme göstermemeleri nedeniyle çoğu zaman hayal kırıklığı yaratmakta, yeni tedavi ajanlarının geliştirilmesi hususunda deneysel çalışmaların konusu olmaya devam etmektedir.

Biz bu çalışmamız ile kolestatik kaşıntı tedavisinde daha önce denenmemiş bir ajan olan mast hücre stabilizatörü kromolin sodyumun kaşıntı üzerinde etkili olup olmadığını ve etkili ise bu etkinin derecesini göstermeyi, bunun yanısıra da kromolin sodyumun kolestazda olası biyokimyasal ve histopatolojik iyileştirici etkilerini

incelemeyi hedefledik. Bu bağlamda, deneysel kolestaz modellemesi olarak ratlar üzerinde koledok ligasyonu metodunu kullandık.

90'lı yılların başından beri hepatoloji araştırmaları, hepatik fibrozis ve biliyer hasarın patofizyolojisine yönelik yeni mekanizmaları ortaya koymak ve yeni tedavi stratejilerinin in vivo etkinliğini gösterebilmek için yeni deneysel hayvan modelleri üzerine yoğunlaşmıştır. Bunlar arasında deneysel kolestaz modellemesi için ilk ve en yaygın kullanılan metod koledok ligasyonu olmuştur (149). 1932'de Cameron ve Oakley tarafınca ilk defa geliştirilmiş olan bu model ana safra kanalının ligate edilmesi ile cerrahi yönetime dayanmaktadır. Koledok ligasyonu kolay uygulama tekniği, düşük maliyetli oluşu ve hızlı karaciğer hasarı gelişimi ile deneysel prosedürleri daha hızlı ve pratik hale getirmesi gibi birçok avantaja sahiptir (150).

Kronik hepatik kaşıntı oluşum mekanizması, çok sayıda sinyal yolağı bulunmuş olmasına rağmen hâlâ gizemini korumaktadır. Spesifik pruritojenlerin patolojik birikimi ile doğrudan yada dolaylı olarak cildi innerve eden miyelinsiz C-liflerini uyararak kaşıntı oluşumunu sağladıkları ileri sürülen mekanizmalardan biridir (151). Mela ve ark.nın bir çalışmasında histamin ve seratonin yolaklarının kolestatik kaşıntıda minör role sahip olduğu ve mast hücrelerinin kaşıntı patofizyolojisinde önemli bir payının olabileceği öne sürülmüştür (152).

Koledok ligasyonu ile kolestaz oluşturulan ratlarda kaşıntı yanıtını değerlendiren bir çalışmada mast hücrelerince aktive edilen protein-aktive reseptör 2 (PAR2) aktivitesi artmış olarak bulunmuş. Ayrıca bu çalışmada histaminerjik ve seratonerjik antagonistik etkisi olan siprohepatadin uygulaması sonrası spontan kaşınma hareketlerinde hafifçe bir azalma olduğu görülmüş (148).

Bir çalışmada karaciğer hastalıklarında artan safra asitlerinin mast hücrelerinden histamin salınımını regüle edebileceği ve kaşıntı yakınmasının kaynağı olabileceği söylenmiş (153).

Bir başka çalışmada Twycross ve ark. kaşıntısı olan kolestatik hastalarda artmış periferik nöroinflamasyon ile birlikte intradermal mast hücrelerinin sayıca arttığını göstermiş (154). Bu bulgular, cilt mast hücrelerinin kolestatik kaşıntının gelişim mekanizmaları arasında rol oynadığını desteklemektedir. Twycross ve ark.nın, intradermal mast hücrelerinin kolestatik kaşıntıda etkin olduğunu belirttikleri çalışmalarına tezat oluşturacak şekilde O'Keeffe ve ark. kütanöz mast hücrelerinin

kolestatik kaşıntıya katkısının olmadığını, kaşıntısı olan ve kaşıntısı olmayan kolestatik karaciğer hasta gruplarından aldıkları cilt biyopsilerinde mast hücrelerinin dermisin papiller ve retiküler tabakasında yoğunlaştığını ve nadiren epidermiste görüldüğünü, mast hücre sayılarında ve dağılımlarında gruplar arası fark bulunmadığını belirtmişler. Ancak araştırmacılar, bu çalışmadaki grupların denek sayısının azlığı nedeniyle çalışma sonucu elde edilen neticeyi desteklemek için yetersizliğini vurgulamışlar (134). Bizim çalışmamızda da koledok ligasyonu ile kolestaz oluşturulan tüm deneklerde sham grubu ile karşılaştırıldığında cilt mast hücre sayısında artış mevcuttu. Bu bulgular literatürle uyumlu olarak kolestaz ile cilt mast hücrelerinin ilişkisini desteklemektedir.

Literatür çalışmaları incelendiğinde mast hücrelerine ilişkin bilgilerimizin son 20 yılda hızlı bir artış gösterdiği aşıkardır. Mast hücreleri aktive olduklarında histaminerjik yanıtları düzenleyen, allerjik reaksiyonlarda rol oynayan hücreler olarak bilirse de günümüzde mast hücrelerinin karaciğer hastalıkları dahil birçok patolojik olayda katkısının olduğu bilinmektedir (155; 156; 157).

Sağlıklı kişilerde az sayıda intrahepatik mast hücresi bulunduğu kabul edilse de bu hücrelerin dağılımı ve kronik karaciğer hastalıklarındaki değişimleri ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Johnson ve ark. 2016'da yaptıkları bir çalışma ile sağlıklı insan ve rat karaciğerinde mast hücrelerinin az sayıda ve esas olarak portal traktlara yakın yerleşimli olduğunu bildirmiştir (158). Kohei ve ark. histaminin hepatik fibrozis üzerindeki etkisini araştırmak için kimyasal indüksiyon ile hepatik hasar oluşturdukları rat deney modelinde fibrozis gelişimi ile uyumlu olarak kollajen liflerin etrafında mast hücrelerinin toplanmaya başladığını, normal ratların bulunduğu kontrol grubunda mast hücrelerinin Glisson kapsülü etrafında ve sadece birkaç adet olduğunu, mast hücre sayısının kontrol grubuna göre deney grubunda belirgin fazla olduğunu görmüşler (159).

O'Rourke ve ark.nın yapmış olduğu bir deneysel hayvan çalışmasında, kronik kolestaz oluşturulan hayvan grubunda artmış cilt mast hücre sayılarının yanısıra eş zamanlı karaciğer histamin düzeylerinin de artmış olduğu belirtilmiş (160).

1976'da Kurokawa, artmış mast hücre sayısının histopatolojik olarak Glisson kapsülü fibrozisi, limiting plate destrüksiyonu, portal traktta inflamatuvar hücre infiltrasyonu gibi stromal değişikliklerle korele olduğunu raporlamış ve özellikle

histamin olmak üzere mast hücrelerinden salınan mediatörlerin hasarlı karaciğer dokusunda fibrozisi arttığı hipotezini ileri sürmüştür (161).

Gittlen ve ark.nın kronik kolestatik karaciğer hastalıklarında plazma histamin düzeyleri üzerine yaptıkları bir çalışmada, hasta grubunda ortalama plazma histamin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuş. Ayrıca plazma histamin düzeyleri kaşıntı semptomu olan hasta grubunda, kaşıntısı olmayan hasta grubuna göre yüksekmiş. Bu bulgularla in vivo mast hücre aktivasyonunun pruritus gelişiminde etyolojik bir faktör olabileceği, artmış safra asitlerinin mast hücreleri üzerine doğrudan etki ederek histamin ve diğer potent medatörlerin salınımını uyarmak suretiyle pruritus patofizyolojisinde rol oynayabileceklerini düşünmüşler (126).

Theodorou ve ark. 1996'da yaptıkları bir çalışmada, mast hücrelerinin efektör immün hücreleri ile etkileşimi sonucu nöroimmun yanıtta rol oynadıklarını, mast hücrelerinden salınan histaminin periferik duyu sinirleri aktive ettiğini ileri sürmüşler (162). Benzer olarak Nelson ve ark. hepatik kaşıntının mast hücrelerinden salınan histamin ve serotoninin, immün hücrelerden salınan endojen opioidlerin birikimi ve sensorial nöronların uyarılması sonucu geliştiğini vurgulamışlar (163).

Clements ve ark. mast hücre kaynaklı histamin salgısının kolestatik kaşıntıda etkili olabileceği hipotezini test ettikleri ratlar üzerindeki bir çalışmalarında, koledok ligasyonu yapılan deney grubu, sham grubu ve hiçbir operasyon yapılmayan kontrol grubu olacak şekilde 3 grup oluşturmuşlar. Deneyin 21. gününde, total kan histamin konsantrasyonu, cilt mast hücre sayısı ve peritoneal mast hücrelerinin histamin içeriğini incelemek üzere örnekler almışlar. Total serum histamin konsantrasyonu ve cilt mast hücre sayısı koledok ligasyonu yapılan grupta belirgin yüksek ölçülmüş. Deney grubunda dermo-epidermal bileşkedeki artmış mast hücre sayısına rağmen cilt histamin konsantrasyonlarında diğer gruplara kıyasla bir farklılık görülmemiş. Her 3 grupta da peritoneal mast hücreleri benzer sayılarda çıkmasına rağmen, intrasellüler histamin konsantrasyonu, mediatörlerin salınımı ile degranülasyonun gerçekleştiğini gösterecek şekilde anlamlı ölçüde azalmış bulunmuş. Sonuç olarak mast hücre aktivasyonunun biliyer obstrüksiyonda rol oynadığını vurgulamışlar ve obstrüktif sarılıkta histamin antagonistleri ve/veya mast hücre stabilizatörlerinin etkin olabileceğine dikkat çekmişler (8).

Glasova ve ark. ise bir çalışmalarında, Clements ve ark.nın çalışmasına tezat oluşturacak şekilde seratonin ve opioid reseptör antagonistlerinin bir kısım kolestatik kaşıntılı hastada terapötik etkinliği olduğu ancak anti-histaminiklerin tedavide etkisiz kaldığını ileri sürmüşler (164). Bu sonuç ise histaminin kolestatik kaşıntıdaki mediatör rolünün zayıf olduğunu düşündürmektedir.

Bizim alışmamızda da kolestaz sağlanan grupların serum histamin düzeylerinin sham grubu değerlerine göre artmış olduğu görüldü. Bu bulgular, mast hücrelerinin salgıladıkları mediatörler aracılığıyla nörosensoriyal etkileşim gösterdiğini ve kaşıntı oluşum mekanizmalarında regülatuvar rol oynadığını destekler niteliktedir.

Mast hücrelerinin, kaşıntı oluşum yolakları üzerinde salgıladıkları çeşitli mediatörler aracılığıyla oynamış olduğu muhtemel rol nedeniyle karaciğer hastalıkları ile ilişkili tipik kaşıntı semptomunun hafifletilmesinde terapötik bir hedef olarak kullanılabileceği açıktır (6).

Literatürde oldukça sınırlı veri bulunmasına karşın kromolin sodyum ile mast hücre stabilizasyonu, başta kolestatik formlar olmak üzere karaciğer hastalığı semptomları, bilhassa kolestatik kaşıntıdan muzdarip hastalar için bir opsiyon oluşturmaktadır.

Kromolin sodyumun anti-astmatik, anti-histaminik, mast hücre stabilizatörü özellikleri ile kullanıldığı bilinmektedir (165; 166). Etki mekanizması tam özölememiş olmakla birlikte kromolin sodyum, mast hücrelerinin yüzeyinde bulunan kalsiyum kanallarını bloke ederek mast hücrelerinden histamin salınımı engeller (167). Vessal ve ark.nın kromolin sodyum alan nefritik sendromlu hastalarda kaşıntı insidansının daha az olduğunu gösterdikleri çalışma bu hipotezi destekler niteliktedir (168).

Son yıllarda artmış serum ototaksin ve lisofosfatidik asit (LPA) düzeylerinin insanlarda kolestatik kaşıntı ile ilişkili mediatörler olabileceği öne sürölmektedir (124; 169). LPA, lisofosfatidilkolinden ototaksin enzimi ile oluşturulmaktadır ve mast hücrelerinden histamin salınımını uyarmasının yanısıra proinflamatuvar transkripsiyonel faktör düzeylerini etkileyerek, sitokin üretimini ve platelet aktivasyonunu desteklemektedir. TNF- α , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin artmış serum düzeylerinin hepatik fibrozis ile ilişkilendirilmesinin yanında kaşıntıda

da etkin olabileceği düşünölmüş ve ototaksinin submukozal mast hücrelerinde yüksek miktarda eksprese edildiği ileri sürölmüştür (148).

Serum safra asidi ve μ -opioidlerinin aksine serum ototaksin aktivitesinin kaşıntı yoğunluğu ile korelasyon gösterdiği bildirilmiş (170) ve bir çalışmada intradermal LPA enjeksiyonu yapılan ratlarda kaşıntı yanıtında artış olduğu gösterilmiş (124).

Kolestatik kaşıntıda; karaciğerde pruritojenik maddelerin oluşumu ve kan dolaşımında artmış düzeyleri ile birlikte cilt ve karaciğerde birikimleri, nöronal etkileşimleri sonucu kaşıntı algısının tetiklenmesinde rol alan patofizyolojik mekanizmalarda temel olarak sorumlu tutulan mediatörler olan safra asitleri, histamin, serotonin ve endojen opioidlere yönelik kullanılan terapötik ajanlarla kısmi iyileşme gözlenirse de tam bir başarı sağlanamamaktadır (171; 172).

Çalışmamızın sonucu göstermiştir ki; koledok ligasyonu ile kolestaz oluşturulan ratlarda kromolin sodyum tedavisi uygulanan grupta, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kaşıntı süresinde ve serum histamin düzeylerinde anlamlı azalma mevcuttu. Plazma total safra asitleri düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı tek medikal tedavi grubu kromolin sodyum uygulanan gruptu. Bu grupta karaciğer ve periton mast hücre sayılarındaki azalma kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde iken cilt mast hücre sayılarında azalma gözlenmiş fakat istatistiksel fark görülmemiştir. Bununla birlikte çalışmamızda, diğer medikal tedavi gruplarında gözlenmeyen ancak kromolin sodyum grubunda izlenen, pruritus ile ilişkilendirilen plazma total safra asitleri, serum histamin ve ototaksin düzeylerinin üçünün birden anlamlı olarak azalması da dikkate alındığında mast hücre stabilizatörü olan kromolin sodyumun kolestatik kaşıntıda etkin bir tedavi yaklaşımı ve ileri incelemelerin yapılması gereken bir terapötik ajan olduğu düşünülmektedir.

Koledok ligasyonunda karaciğer fenotipi; belirgin duktuler reaksiyon ile sonuçlanan kolanjiyosit proliferasyonu, portal inflamasyon, yoğun biliyer fibrozis gibi kolestatik hasarın göstergeleri ile karakterizedir (150).

1983'te Perez-Tamajo, 1988'de Muller ve ark. yaptıkları çalışmalarla koledok ligasyonu ile cerrahi obstrüksiyon sağlandıktan yaklaşık 7 gün sonra hepatik bağ doku artışı, inflamatuvar olaylar ve proliferatif aktivitenin geliştiğini vurgulamışlar (5).

Hinz ve ark.nın ratlarda koledok ligasyonu ile indüklenen histomorfolojik ve biyokimyasal değişiklikleri gösterdikleri çalışmada, sham grubunda deneyin başlangıcından 14 gün sonra karaciğer strüktürel yapılanmasında önemsiz derecede bazı değişiklikler geliştiği, bunun da portal traktlardaki fibroblast ve/veya lenfosit sayısındaki ılımlı artışla sınırlı olduğu, karaciğerin diğer bölgelerinde etkilenme olmadığı belirtilmiş. Koledok ligasyonu yapılan grupta ise kolestatik karaciğer hastalıklarına spesifik yapısal değişikliklerin geliştiği, kolestaz süresi uzadıkça histolojik bulguların daha da belirginleştiği, deneyin 14.gününde safra kanallarının belirgin proliferasyonu ve peri- interduktuler konnektif dokunun artışı sonucu portal bölgelerde genişlemenin izlendiği vurgulanmış. Hepatositlerin trabeküler diziliminde değişiklik görülmemesine karşın sinusoidlerde dilatasyon ve çok daha fazla sayıda inflamatuvar hücre tespit edilmiş. Ligasyondan 21 gün sonra portal alanlardaki duktuler proliferasyonun daha da arttığı, portal bölgelerden kaynaklanan yeni gelişen fibröz septaların parankimi infiltrate etmeye başladığı ve bazı septaların porto-portal köprüleşmeler oluşturduğu görülmüş. Deneyin 4. haftasında duktuler epitel kitlelerinin kısmen birbirine karışacak kadar genişlediği ve bitişiklerindeki hepatositlerde kompresyon ve nekroza neden oldukları görülmüş. Bağ dokudaki artış ve fibröz septaların uzayıp kalınlaşması sonucu porto-portal ve porto-venöz köprüleşmeler gelişmesi ile biliyer tip inkomplet septal karaciğer sirozu gözlenmiş. Çalışmanın serum enzim değişikliklerine bakıldığında koledok ligasyon grubunda ALT düzeylerinde anlamlı bir artış görülürken AST düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmamış. Kolestazın göstergesi olan GGT ve ALP düzeylerinin belirgin olarak arttığı belirtilmiş (5).

Kolestaz sonucu hepatositlerde biriken safra tuzları hepatosellüler apopitoza neden olmaktadır. Safra tuzları deterjan etkisiyle hepatosit membran permeabilite artışı ve hasarına neden olarak serum transaminazlarında artışa neden olabilir. Ayrıca safra yollarında tıkanıklığa bağlı artmış basınç ve hasar nedeniyle serum ALP, GGT ve bilirubin düzeylerinde artış gözlenir (173).

Bu çalışmalarla benzerlik gösterecek şekilde çalışmamızda histopatolojik bulguları; portal inflamasyon, lobuler inflamasyon, safra duktus proliferasyonu, nekroz, fibroz ve safra infarktı yönünden hasarın derecesine göre skorladık. Deneysel çalışmamızın 10. gününde sham grubunda hafif lobuler ve portal inflamasyon dışında başka bir bulgu izlemezen; koledok ligasyonu uygulanan ve 10 gün süreyle serum

fizyolojik uygulanan kontrol grubunda kolestaza bağlı portal ve lobuler inflamasyon, safra duktus proliferasyonu, nekroz, safra infarktı, portal genişleme, septal formasyon ve belirgin köprüleşme fibrozisine kadar ilerleyen fibrotik değişiklikler ile karakterize belirgin karaciğer hasarı tespit ettik. Çalışmamızın biyokimyasal parametrelerine ilişkin bulgularda kontrol grubu serum histamin ve ototaksin düzeylerinin ve kolestazı destekleyecek şekilde plazma AST, ALT, ALP, GGT, bilirubin ile total safra asitleri düzeylerinin sham grubuna göre artmış olduğunu gördük.

Yapılan alışmalar, karaciğer hasarında portal triadda artış gösteren mast hücrelerinin salgıladıkları histamin, heparin, triptaz, interlökinler, sitokinler, TGF-β1, TNFα, ve fibroblast büyüme faktörü gibi çeşitli mediatörler aracılığıyla regülatuvar bir rol üstlendiğini belirtmektedir (174; 175).

Takeshita ve ark. 2004 yılında, kolestazda mast hücrelerinin hepatik remodelingdeki etkilerini göstermek üzere koledok ligasyonu yapılan 200 rat ve sham grubu olarak alınan 25 rat ile yaptıkları çalışmada; safra duktus proliferasyonu ve apopitotik biliyer epitel sayılarındaki değişiklik ile hepatik mast hücre birikiminin paralellik gösterdiğini ortaya koymuşlar. Biliyer epitel hücre apopitozisinin, proliferatif safra kanallarının etrafındaki kapiller alanda yoğunlaşan mast hücrelerinden salgılanan histamin ve eikazanooidler gibi vazoaktif mediatörlerin indüklediği hipoksi sonucu geliştiği yorumunu yapmışlar (7).

Koledok ligasyonu ile indüklenmiş kolestaz oluşturulan ratlarda hepatik mast hücre si gücünü değerlendiren bir çalışmada, Hargrove ve ark. hepatik mast hücre birikiminin 2. günde başladığını ve 14 gün boyunca devam ederek pik yaptığını göstermişler (176). Gulubova ve Vodenicharov, akut kolanjit ve kronik sklerozan kolanjit vakalarından oluşan 38 hastadan alınan koledok biyopsi örneklere ve 5 normal biyopsi spesmeni ile yaptıkları çalışmada kronik kolestatik hastalıklarda mast hücre sayısının arttığını ve mast hücrelerinin safra asidi retansiyonu sonucu oluşan kronik inflamasyona yanıt olarak fibrojenizde, epitelyal hiperplazi ve dejenerasyonda rol oynadıklarını belirtmişler (177). Hatta bir çalışmada mast hücrelerinin kollajen ve laminin gibi ECM komponentlerini doğrudan sentezleme kapasitesine sahip olduğu söylenmiş (178).

Kennedy ve ark. 2014 yılında, koledok ligasyonu ile kolestatiz oluşturdıkları rodentler üzerinde yaptıkları çalışmada mast hücreleri ve bu hücrelerden salınan histaminin biliyer proliferasyon üzerindeki potansiyel parakrin etkilerini göstermek istemişler. Sham grubu, koledok ligasyonu yapılan kontrol grubu ve koledok ligasyonu yapılarak kromolin sodyum uygulanan deney grubu olacak şekilde ratları 3 gruba ayırmışlar. Kontrol grubunda intrahepatik biliyer kitlede ve kolanjiosit proliferasyonunda sham grubu ile karşılaştırıldığında belirgin artış olduğunu, 1 hafta süreyle kromolin sodyum uygulanan deney grubunda intrahepatik biliyer kitlenin ve kolanjiosit proliferasyonunun belirgin şekilde azaldığını immünohistokimyasal olarak göstermişler. Kontrol grubunun hepatic mast hücre sayısının sham grubuna göre yaklaşık 10 kat yüksek olduğunu, bu hücrelerin safra kanallarına yakın yerleşimli olduğunu ve kromolin sodyum tedavisi sonrası mast hücre sayısının kontrol grubuna göre belirgin olarak azaldığını görmüşler. Artmış mast hücre sayısı ile artmış safra kanalı kitlesi koledok ligasyonu yapılan grupta korele bulunmuş. Serum histamin düzeyleri koledok ligasyonu yapılan kontrol grubunda sham grubuna göre yüksek bulunurken kromolin sodyum tedavisi alan grupta kontrol ve sham gruplarına göre anlamlı ölçüde azalmış bulunmuş. Ayrıca kromolin sodyumun in vitro olarak mast hücreleri üzerine doğrudan etki ederken kolanjiositlere dolaylı yoldan etkisi olduğunu bildirmişler. Çalışmalarını, biliyer hastalıklarda mast hücrelerinin ve bu hücrelerden salgılanan histaminin parakrin rolü olduğu yönünde yeni bir kanıt olarak sunmuşlar (6).

Choi ve ark.nın yaptıkları in vitro bir çalışmada, hepatic stellat hücreleri kromolin sodyum ile muamele edildiğinde kollajen birikimi, TGF- β ilişkili mezenkimal dönüşümde, hepatosit yaşlanmasında anlamlı derecede azalma gözlenmiş ve kromolin sodyumun karaciğer fibrozisi ve sirozuna yönelik etkili bir terapötik ajan olabileceği öne sürülmüş (179).

Koledok ligasyon metodu ile kolestatiz oluşturduğumuz deneysel rat modeli çalışmamızda yapılan doku biyopsi materyallerinin immünohistokimyasal incelemeleri sonucu kontrol grubu karaciğer, cilt ve periton mast hücre sayılarının sham grubuna göre artmış olduğunu gördük. Bu bulgular önceki çalışmalarla uyumlu olarak kolestatik karaciğer hasarında mast hücrelerinin rolünü desteklemektedir. Çalışmamızda kromolin sodyum tedavisi uygulanan ratlarda kontrol grubu ratlarına göre karaciğer ve periton mast hücrelerinde anlamlı azalma gözlenirken; cilt mast

hücre sayılarındaki azalma anlamlı düzeyde olmamasına karşın kaşıntı semptomunda ciddi düzelme görüldü. Bu durum kaşıntı patofizyolojisi temelinde değerlendirildiğinde kromolin sodyumun kolestatik hepatik hasardaki iyileştirici etkileri üzerinden tedaviye katkı sağlamış olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızın sonunda elde ettiğimiz veriler ışığında kolestatik kaşıntının tedaviye dirençli olduğu vakalarda, hasta için tedavinin özelleştirilmesi gerekliliği noktasında, sınırlı tedavi seçenekleri arasında mast hücre stabilizatörü kromolin sodyumun uygun bir tercih olabileceğini ve bu terapötik ajanın kullanımını için daha ileri çalışmaların yapılması gerekliliğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızın önde gelen kısıtlaması grupların içerdiği denek sayılarının güçlü sonuçlara ulaşmak için yetersiz olması ve anti-pruritik etkinliğin değerlendirilmesinde deneklerin kaşınma davranışlarının daha sık aralıklarla, daha uzun süre gözlenmesi gerekliliğidir. Bunun yanı sıra; cilt, karaciğer, peritondaki mast hücrelerinin alt tiplerinin yapılmamış olması bir diğer kısıtlamadır.

6. SONUÇ

Bu çalışmamızın sonucunda kolestatik kaşıntıda daha önce denenmemiş bir ajan olan mast hücre stabilizatörü kromolin sodyumun umut vadeci anti-pruritik etkinliği olduğunu, plazma total safra asitleri, serum ototaksin ve histamin düzeylerinde azalma sağladığını; kolestazda biyokimyasal iyileşme ile birlikte karaciğer, cilt ve periton mast hücre sayılarını azalttığını ve karaciğer fibrozisinde iyileştirici etkileri olduğunu gösterdik.



7. KAYNAKLAR

1. VAN GOLEN, Rowan F., et al. The pathophysiology of human obstructive cholestasis is mimicked in cholestatic Gold Syrian hamsters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2018, 1864.3: 942-951.
2. EL MOTTELEB, Dalia M. Abd, IBRAHIM, Islam AAE-H. ve ELSHAZLY, Shima M. Sildenafil protects against bile duct ligation induced hepatic fibrosis in rats: Potential role for silent information regulator 1. *Toxicology and applied pharmacology*, 2017, 335: 64-71.
3. ALLER, Maria-Angeles, et al. Bile duct ligation: step-by-step to cholangiocyte inflammatory tumorigenesis. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 2010, 22.6: 651-661.
4. INAN, Saadet ve COWAN, Alan. Nalfurafine, a kappa opioid receptor agonist, inhibits scratching behavior secondary to cholestasis induced by chronic ethynylestradiol injections in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2006, 85.1: 39-43.
5. HINZ, Sebastian, et al. Histological and biochemical changes induced by total bile duct ligation in the rat. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 1997, 49.3-4: 281-288.
6. KENNEDY, Lindsey L., et al. Inhibition of mast cell-derived histamine secretion by cromolyn sodium treatment decreases biliary hyperplasia in cholestatic rodents. *Laboratory Investigation*, 2014, 94.12: 1406.
7. TAKESHITA, Atsushi ve SHIBAYAMA, Yuro. Role of mast cells in hepatic remodeling during cholestasis and its resolution: relevance to regulation of apoptosis. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2005, 56.4-5: 273-280.
8. CLEMENTS, W. D. B., et al. The role of mast cell activation in cholestatic pruritus. *Agents and actions*, 1994, 41.1: C30-C31.
9. BEUERS, Ulrich, et al. Pruritus in cholestasis: facts and fiction. *Hepatology*, 2014, 60.1: 399-407.

10. Rutkauskas S, Gedrimas V, Pundzius J, et al. Clinical and anatomical basis for the classification of the structural parts of liver. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 2006; 42:98-106.
11. Abdel-Misih SR, and Bloomston M: Liver anatomy. *Surg Clin North Am* 2010 ve 643-653, 90: pp.
12. Skandalakis J, Skandalakis L, Skandalakis P, et al: Hepatic surgical anatomy. *Surg Clin North Am* 2004; 84: pp. 413-435.
13. Couinaud C. *Le Foie. Etudes Anatomiques et Chirurgicales*. Paris: Masson & Cie; 1957.
14. Healey JJ, Schroy P. Anatomy of the biliary ducts within the human liver: Analysis of the prevailing pattern of branching and the major variations of the biliary ducts. *Arch Surg* 1953; 66:599-616. .
15. KANEL, Gary C. ve KORULA, Jacob. *Atlas of Liver Pathology E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2011.
16. Malarkey D, Johnson K, Ryan L, et al: New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol* 2005; 33: pp. 27-34.
17. Deshpande R, Heaton N, and Rela M: Surgical anatomy of segmental liver transplantation. *Br J Surg* 2002; 89: pp. 1078-1088.
18. Catalano O, Singh A, Uppot R, et al: Vascular and biliary variants in the liver: Implications for liver surgery. *Radiographics* 2008 ve 359-378, 28: pp.
19. Tiniakos DG, Mathew J, Kittas C, et al: Ontogeny of human intrahepatic innervation. *Virchows Arch* 2008; 452: pp. 435-442.
20. Saxena R, Theise N, and Crawford J: Microanatomy of the human liver— Exploring the hidden interfaces. *Hepatology* 1999 ve 1339-1346, 30: pp.
21. Sasse D, Spornitz U, and Maly I: Liver architecture. *Enzyme* 1992 ve 8-32, 46: pp.
22. Trutmann M, and Sasse D: The lymphatics of the liver. *Anat Embryol (Berl)* 1994 ve 201-209, 190: pp.

23. FELDMAN, Mark, FRIEDMAN, Lawrence S. ve BRANDT, Lawrence J. Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease E-Book: pathophysiology, diagnosis, management, expert consult premium edition-enhanced online features. Elsevier Health Sciences, 2010.
24. David H, and Reinke P: The concept of the “perisinusoidal functional unit” of the liver—Importance to pathological processes. *Exp Pathol* 1987 ve 193-224, 32: pp.
25. Roskams T, Theise N, Balabaud C, et al: Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: Canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* 2004 ve 1739-1745, 39: pp.
26. Matsumoto T, and Kawakami M: The unit-concept of hepatic parenchyma—A re-examination based on angioarchitectural studies. *Acta Pathol Jpn* 1982 ve 285-314, 32: pp.
27. Bedossa P, and Paradis V: Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol* 2003 ve 504-515, 200: pp.
28. Hernandez-Gea V, and Friedman SL: Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2011 ve 425-456, 6: pp.
29. Desmet V: Organizational principles. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
30. Zegers M, and Hoekstra D: Mechanisms and functional features of polarized membrane traffic in epithelial and hepatic cells. *Biochem J* 1998 ve 257-269, 336: pp.
31. Ramadori G, Reider H, and Knittel T: Biology and pathobiology of sinusoidal liver cells. In Tavoloni N, and Berk PD (eds): *Hepatic transport and bile secretion: Physiology and pathophysiology*. New York: Raven Press, 1993. pp. 83-102.
32. Xie G, Wang X, Wang L, et al: Role of differentiation of liver sinusoidal endothelial cells in progression and regression of hepatic fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2012 ve 918-927, 142: pp.
33. Wake K, Decker K, Kirn A, et al: Cell biology and kinetics of Kupffer cells in the liver. *Int Rev Cytol* 1989 ve 173-229, 118: pp.

34. Sato M, Suzuki S, and Senoo H: Hepatic stellate cells: Unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct* 2003 ve 105-112, 28: pp.
35. 2004, Senoo H: Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc* ve 3-15, 37: pp.
36. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, et al: TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 2007 ve 1324-1332, 13: pp.
37. Doherty DG, and O'Farrelly C: Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev* 2000 ve 5-20, 174: pp.
38. Wisse E, Luo D, Vermijlen D, et al: On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells. *Semin Liver Dis* 1997 ve 265-286, 17: pp.
39. 2008, Zaret K: Genetic programming of liver and pancreas progenitors: Lessons for stem-cell differentiation. *Nat Rev Genet* ve 329-340, 9: pp.
40. Alpini G, McGill J, and Larusso N: The pathobiology of biliary epithelia. *Hepatology* 2002 ve 1256-1268, 35: pp.
41. Marzioni M, Glaser S, Francis H, et al: Functional heterogeneity of cholangiocytes. *Semin Liver Dis* 2002 ve 227-240, 22: pp.
42. Bogert P, and LaRusso N: Cholangiocyte biology. *Curr Opin Gastroenterol* 2007 ve 299-305, 23: pp.
43. Jones A, Schmucker D, Renston R, et al: The architecture of bile secretion. A morphological perspective of physiology. *Dig Dis Sci* 1980 ve 609-629, 25: pp.
44. Ludwig J, Ritman E, LaRusso N, et al: Anatomy of the human biliary system studied by quantitative computer-aided three-dimensional imaging techniques. *Hepatology* 1998 ve 893-899, 27: pp.
45. Donato P, Coelho P, Rodrigues H, et al: Normal vascular and biliary hepatic anatomy: 3D demonstration by multidetector CT. *Surg Radiol Anat* 2007 ve 575-58, 29: pp.
46. Jones A, and Spring-Mills E: *The liver and gallbladder*. New York: Elsevier, 1983.

47. Masunari H, Shimada H, Endo I, et al: Surgical anatomy of hepatic hilum with special reference of the plate system and extrahepatic duct. *J Gastrointest Surg* 2008 ve 1047-1053, 12: pp.
48. Takasaki S, and Hano H: Three-dimensional observations of the human hepatic artery (arterial system in the liver). *J Hepatol* 2001 ve 455-466, 34: pp.
49. Frierson HF: The gross anatomy and histology of the gallbladder, extrahepatic bile ducts, Vaterian system, and minor papilla. *Am J Surg Pathol* 1989 ve 146-162, 13: pp.
50. Evett R, Higgins J, and Brown AL: The fine structure of normal mucosa in human gallbladder. *Gastroenterology* 1964 ve 49-60, 47: pp.
51. Halilbasic E, Claudel T, and Trauner M: Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond. *J Hepatol* 2013 ve 155-168, 58: pp.
52. D'Aldebert E, Biyeyeme Bi Mve MJ, Mergey M, et al: Bile salts control the antimicrobial peptide cathelicidin through nuclear receptors in the human biliary epithelium. *Gastroenterology* 2009 ve 1435-1443, 136: pp.
53. Vitek L, and Carey MC: New pathophysiological concepts underlying pathogenesis of pigment gallstones. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012 ve 122-129, 36: pp.
54. Porez G, Prawitt J, Gross B, et al: Bile acid receptors as targets for the treatment of dyslipidemia and cardiovascular disease. *J Lipid Res* 2012 ve 1723-1737, 53: pp.
55. Russell D: The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 2003 ve 137-174, 72: pp.
56. 2009, Chiang JY: Bile acids: Regulation of synthesis. *J Lipid Res* ve 1955-1966, 50: pp.
57. Galman C, Angelin B, and Rudling M: Pronounced variation in bile acid synthesis in humans is related to gender, hypertriglyceridaemia and circulating levels of fibroblast growth factor 19. *J Intern Med* 2011 ve 580-588, 270: pp.
58. Chong CP, Mills PB, McClean P, et al: Bile acid-CoA ligase deficiency—A new inborn error of bile acid metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2012 ve 521-530, 35: pp.

59. Ridlon J, Kang D, and Hylemon P: Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 2006 ve 241-259, 47: pp.
60. 2012, Poupon R: Ursodeoxycholic acid and bile-acid mimetics as therapeutic agents for cholestatic liver diseases: An overview of their mechanisms of action. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* ve S3-12, 36: pp.
61. Humbert L, Maubert MA, Wolf C, et al: Bile acid profiling in human biological samples: Comparison of extraction procedures and application to normal and cholestatic patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012 ve 135-145, 899: pp.
62. 2009, Alnouti Y: Bile acid sulfation: A pathway of bile acid elimination and detoxification. *Toxicol Sci* ve 225-246, 108: pp.
63. Uppal H, Toma D, Saini S, et al: Combined loss of orphan receptors PXR and CAR heightens sensitivity to toxic bile acids in mice. *Hepatology* 2005 ve 168-176, 41: pp.
64. Li T, Holmstrom SR, Kir S, et al: The G protein-coupled bile acid receptor, TGR5, stimulates gallbladder filling. *Mol Endocrinol* 2011 ve 1066-1071, 25: pp.
65. Bajor A, Gillberg PG, and Abrahamsson H: Bile acids: Short and long term effects in the intestine. *Scand J Gastroenterol* 2010 ve 645-664, 45: pp.
66. Grosse B, Cassio D, Yousef N, et al: Claudin-1 involved in neonatal ichthyosis sclerosing cholangitis syndrome regulates hepatic paracellular permeability. *Hepatology* 2012 ve 1249-1259, 55: pp.
67. Hohenester S, Wenniger LM, Paulusma CC, et al: A biliary HCO₃⁻. *Hepatology* 2012 ve 173-183, 55: pp.
68. Salas J, Banales J, Sarvide S, et al: Ae2a,b-deficient mice develop antimitochondrial antibodies and other features resembling primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2008 ve 1482-1493, 134: pp.
69. Banales JM, Prieto J, and Medina JF: Cholangiocyte anion exchange and biliary bicarbonate excretion. *World J Gastroenterol* 2006 ve 3496-3511, 12: pp.

70. Galman C, Angelin B, and Rudling M: Bile acid synthesis in humans has a rapid diurnal variation that is asynchronous with cholesterol synthesis. *Gastroenterology* 2005 ve 1445-1453, 129: pp.
71. Konig J: Uptake transporters of the human OATP family: Molecular characteristics, substrates, their role in drug-drug interactions, and functional consequences of polymorphisms. *Handb Exp Pharmacol* 2011 ve 1-28, undefined: pp.
72. Soroka CJ, Mennone A, Hagey LR, et al: Mouse organic solute transporter alpha deficiency enhances renal excretion of bile acids and attenuates cholestasis. *Hepatology* 2010 ve 181-190, 51: pp.
73. Lester R, and Schmid R: Bilirubin metabolism. *N Engl J Med* 1964 ve 779-786, 270: pp.
74. Levi A, Gatmaitan Z, and Arias I: Two hepatic cytoplasmic protein fractions, Y and Z, and their possible role in the hepatic uptake of bilirubin sulfobromophthalein, and other anions. *J Clin Invest* 1969 ve 2156-2167, 48: pp.
75. Bosma P, Seppen J, Goldhoorn B, et al: Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem* 1994 ve 17960-17964, 269: pp.
76. Gatmaitan Z, and Arias I: ATP-dependent transport systems in the canalicular membrane of the hepatocyte. *Physiol Rev* 1995 ve 261-275, 75: pp.
77. Poland R, and Odell G: Physiologic jaundice: The enterohepatic circulation of bilirubin. *N Engl J Med* 1971 ve 1-6, 284: pp.
78. van den Bergh A, and Muller P: Uber eine direkte und eine indirekte Diazoreaktion auf Bilirubin. *Biochem Z* 1916 ve 90, 77: pp.
79. Zieve L, Hill E, Hanson M, et al: Normal and abnormal variations and clinical significance of the one-minute and total serum bilirubin determinations. *J Lab Clin Med* 1951 ve 446-469, 38: pp.
80. Karmen A, Wroblewski F, and Ladue J: Transaminase activity in human blood. *JCI* 1955 ve 126-131, 34: pp.

81. Kallai L, Hahn A, Roeder V, et al: Correlation between histological findings and transaminase values in chronic diseases of the liver. *Acta Med Scand* 1964 ve 49-56, 175: pp.
82. Dong MH, Bettencourt R, Brenner DA, et al: Serum levels of alanine aminotransferase decrease with age in longitudinal analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012 ve 285-290, 10: pp.
83. Cohen J, and Kaplan M: The SGOT/SGPT ratio: An indicator of alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci* 1979 ve 835-838, 24: pp.
84. Diehl A, Boitnott J, Van Duyn M, et al: Relationship between pyridoxal 5'-phosphate deficiency and aminotransferase levels in alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1984 ve 632-636, 86: pp.
85. Nathwani R, Pais S, Reynolds T, et al: Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology* 2005 ve 380-382, 41: pp.
86. Giannini E, Botta F, Fasoli A, et al: Progressive liver functional impairment is associated with an increase in AST/ALT ratio. *Dig Dis Sci* 1999 ve 1249-1253, 44: pp.
87. 1972, Kaplan M: Alkaline phosphatase. *Gastroenterology* ve 452-468, 62: pp.
88. 1986, Kaplan M: Serum alkaline phosphatase: Another piece is added to the puzzle. *Hepatology* ve 526, 6: pp.
89. Bamford K, Harris H, Luffman J, et al: Serum-alkaline phosphatase and the ABO blood groups. *Lancet* 1965 ve 530-531, 1: pp.
90. 1978, Wolf P: Clinical significance of an increased or decreased serum alkaline phosphatase level. *Arch Pathol Lab Med* ve 497-501, 102: pp.
91. Rutenberg A, Goldbarg J, Pineda G, et al: Serum γ -glutamyl transpeptidase activity in hepatobiliary pancreatic disease. *Gastroenterology* 1963 ve 43, 45: pp.
92. Rosalki S, Tarlow D, and Rau D: Plasma gamma-glutamyl transpeptidase elevation in patients receiving enzyme-inducing drugs. *Lancet* 1971 ve 376-377, 2: pp.

93. Hu G, Tuomilehto J, Pukkala E, et al: Joint effects of coffee consumption and serum gamma-glutamyltransferase on the risk of liver cancer. *Hepatology* 2008 ve 7-9, 48: pp.
94. Yang M, Chen T, Wang S, et al: Biochemical predictors for absence of common bile duct stones in patients undergoing laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc* 2008 ve 1620-1624, 22: pp.
95. Pinkham CA, and Krause KJ: Liver function tests and mortality in a cohort of life insurance applicants. *J Insur Med* 2009 ve 170-177, 41: pp.
96. Kaplan M, and Rogers L: Separation of serum alkaline phosphatase isoenzymes by polyacrylamide gel electrophoresis. *Lancet* 1968 ve 1029-1031, 2: pp.
97. Rothschild M, Oratz M, Zimmon D, et al: Albumin synthesis in cirrhotic subjects studied with carbonate . *J Clin Invest* 1969 ve 344-350, 48: pp.
98. Rothschild M, Oratz M, and Schreiber S: Serum albumin. *Hepatology* 1988 ve 385-401, 8: pp.
99. van Zantsen S, Depla A, Dekker P, et al: The clinical importance of routine measurement of liver enzymes, total protein, and albumin in a general medicine outpatient clinic: A prospective study. *N Engl J Med* 1992 ve 53-61, 40: pp.
100. Martinez SM, Crespo G, Navasa M, et al: Noninvasive assessment of liver fibrosis. *Hepatology* 2011 ve 325-335, 53: pp.
101. Plevris J, Kaydon G, Simpson K, et al: Serum hyaluronan: A non-invasive test for diagnosing liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000 ve 1121-1127, 12: pp.
102. Friedrich-Rust M, Martens S, Sarrazin C, et al: Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: A meta-analysis. *Gastroenterology* 2008 ve 960-974, 134: pp.
103. 1997, Trauner M. Molecular alterations of canalicular transport systems in experimental models of cholestasis: possible functional correlations. *Yale J Biol Med* ve 365-378., 70:.

104. RODRÍGUEZ-GARAY, Emilio Alberto. Cholestasis: human disease and experimental animal models. *Annals of hepatology*, 2003, 2.4: 150-158.
105. Lee J, Boyer JL. Molecular alterations in hepatocyte transport mechanisms in acquired cholestatic liver disorders. *Sem Liv Dis* 2000 ve 373-384, 20:.
106. Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 2003 ve 633-671., 83:.
107. Gerk, PM, Vore, M. Regulation of Expression of the Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (MRP2) and Its Role in Drug Disposition. *J Pharmacol Exp Ther* 2002 ve 407-415, 302:.
108. Hitzl M, Klein K, Zanger UM, Fritz P, Nussler AK, Neuhaus P, Fromm MF. Influence of Omeprazole on Multidrug Resistance Protein 3 Expression in Human. *J Pharmacol Exp Ther* 2003 ve 524-530., 304:.
109. 1995, Lee WM. Drug-Induced Hepatotoxicity *N Engl J Med* ve 1118-1127, 333:.
110. Strautnieks SS, Bull L, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, et al. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* 1998 ve 233-238., 20:.
111. Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, Ter Borg F, Scheper RJ, Tytgat GN, et al. A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the DubinJohnson syndrome. *Hepatology* 1997 ve 1539-1542., 25:.
112. Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular regulation of hepatocellular transport systems in cholestasis. *J Hepatol* 1999 ve 165-178, 31:.
113. CECIL, Russell La Fayette, GOLDMAN, Lee ve SCHAFER, Andrew I. *Goldman's Cecil Medicine, Expert Consult Premium Edition--Enhanced Online Features and Print, Single Volume, 24: Goldman's Cecil Medicine. Elsevier Health Sciences, 2012.*
114. Rahner C, Stieger B, Landmann L. Structure-function correlation of tight junctional impairment after intrahepatic and extrahepatic cholestasis in rat liver. *Gastroenterology* 1996 ve 1564-1578., 110:.

115. Stieger B, Landmann L. Effects of cholestasis on membrane flow and surface polarity in hepatocytes. *J Hepatol* 1996 ve 128-134., 24 (Suppl. 1):.
116. Burt AD, MacSween RNM. Bile duct proliferation-its true significance? *Histopathology* 1993 ve 599-602., 23:.
117. Bergasa NV, Mehlman JK, Jones EA. Pruritus and fatigue in primary biliary cirrhosis. *Bailliere's Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2000 ve 643–55., 14:.
118. Pathak B, Sheibani L, Lee RH. Cholestasis of pregnancy. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 2010 ve 269–82., 37:.
119. 2011, Bergasa NV. The itch of liver disease. *Semin. Cutan. Med. Surg.* ve 93–8., 30:.
120. 1982, Tuckett RP. Itch evoked by electrical stimulation of the skin. *J. Invest. Dermatol.* ve 368–73., 79:.
121. Ochoa J, Torebjork E. Sensations evoked by intraneural microstimulation of C nociceptor fibres in human skin nerves. *J. Physiol.* 1989 ve 583–99., 415:.
122. IMAM, Mohamad H., et al. Pathogenesis and management of pruritus in cholestatic liver disease. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 2012, 27.7: 1150-1158.
123. Hashimoto T, Ohata H, Momose K. Itch-scratch responses induced by lysophosphatidic acid in mice. *Pharmacology* 2004 ve 51–6., 72:.
124. Kremer AE, Martens JJ, Kulik W et al. Lysophosphatidic acid is a potential mediator of cholestatic pruritus. *Gastroenterology* 2010 ve e1001., 139: 1008–18. 1018.
125. Oude Elferink RP, Kremer AE, Martens JJ, Beuers UH. The molecular mechanism of cholestatic pruritus. *Dig. Dis.* 2011 ve 66–71., 29:.
126. Gittlen SD, Schulman ES, Maddrey WC. Raised histamine concentrations in chronic cholestatic liver disease. *Gut* 1990 ve 96–9., 31:.
127. Reyes H, Sjovall J. Bile acids and progesterone metabolites in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Ann. Med.* 2000 ve 94–106., 32:.

128. Zein CO, Lindor KD. Latest and emerging therapies for primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2010 ve 13–22., 12:.
129. 2004, Bergasa NV. Pruritus in chronic liver disease: mechanisms and treatment. *Curr Gastroent Rep* ve 6:10-16.
130. MICHALAK, Agata, et al. Pruritus in liver disease—pathogenesis and treatment. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 2011, 5.2.
131. Levy C, Lindor KD. Management of primary biliary cirrhosis. *Current Treatment Options in Gastroenterology* 2003 ve 6:493-498.
132. Jones AE, Bergasa NV. The pruritus of cholestasis. *Hepatology* 1999 ve 29:1003-1006.
133. 2000, Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines. *Hepatology* ve 1005–13., 31:.
134. O'KEEFFE, C., et al. Cholestatic pruritus—the role of cutaneous mast cells and nerves. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2004, 19.12: 1293-1300.
135. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium_cromoglycate.
136. HARCHEGANI, Amir Larki, et al. Cromolyn sodium attenuates paraquat-induced lung injury by modulation of proinflammatory cytokines. *Drug research*, 2017, 67.05: 283-288.
137. JIANG, Lu, et al. Inhibition of Mast Cell Degranulation With Cromolyn Sodium Exhibits Organ-Specific Effects in Polycystic Kidney (PCK) Rats. *International journal of toxicology*, 2018, 1091581818777754.
138. IKEDA, Hitoshi ve YATOMI, Yutaka. Autotaxin in liver fibrosis. *Clinica chimica acta*, 2012, 413.23-24: 1817-1821.
139. N. Watanabe, H. Ikeda, K. Nakamura, et al. Plasma lysophosphatidic acid level and serum autotaxin activity are increased in liver injury in rats in relation to its severity *Life Sci*, 81 (2007), pp. 1009-1015.

140. D.S. Manning, N.H. Afdhal Diagnosis and quantitation of fibrosis Gastroenterology, 134 (2008), pp. 1670-1681.
141. K. Nakamura, R. Ohkawa, S. Okubo, et al. Measurement of lysophospholipase D/autotaxin activity in human serum samples Clin Biochem, 40 (2007), pp. 274-277.
142. D.L. Baker, P. Morrison, B. Miller, et al. Plasma lysophosphatidic acid concentration and ovarian cancer JAMA, 287 (2002), pp. 3081-3082.
143. A.E. Kremer, J.J. Martens, W. Kulik, et al. Lysophosphatidic acid is a potential mediator of cholestatic pruritus Gastroenterology, 139 (2010), pp. 1008-1018.
144. ACKERMAN, Zvi, et al. Renal effects of gentamicin in chronic bile duct ligated rats. Digestive diseases and sciences, 2006, 51.2: 406-415.
145. OZTURK, Hulya, et al. Effect of sirolimus on renal injury induced by bile duct ligation in rats. Acta cirurgica brasileira, 2010, 25.5: 401-406.
146. EKEN, Halil, et al. Dose-related effects of dexamethasone on liver damage due to bile duct ligation in rats. World Journal of Gastroenterology: WJG, 2006, 12.33: 5379.
147. PAYABVASH, Seyedmehdi, et al. Endogenous opioids modulate hepatocyte apoptosis in a rat model of chronic cholestasis: the role of oxidative stress. Liver International, 2007, 27.4: 538-547.
148. BELGHITI, Majedeline, et al. Potentiation of the transient receptor potential vanilloid 1 channel contributes to pruritogenesis in a rat model of liver disease. Journal of Biological Chemistry, 2013, jbc. M113. 455162.
149. N. Rosenthal, S. Brown The mouse ascending: perspectives for human-disease models Nat. Cell Biol., 9 (2007), pp. 993-999.
150. R.L. Perlman Mouse models of human disease: an evolutionary perspective Evol. Med. Public Health, 2016 (2016), pp. 170-176.
151. IMAMACHI, Noritaka, et al. TRPV1-expressing primary afferents generate behavioral responses to pruritogens via multiple mechanisms. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106.27: 11330-11335.

152. MELA, M., MANCUSO, A. ve BURROUGHS, A. K. Pruritus in cholestatic and other liver diseases. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2003, 17.7: 857-870.
153. BUNCHORNTAVAKUL, Chalermrat ve REDDY, K. Rajender. Pruritus in chronic cholestatic liver disease. *Clinics in liver disease*, 2012, 16.2: 331-346.
154. TWYLCROSS, R., et al. Itch: scratching more than the surface. *Qjm*, 2003, 96.1: 7-26.
155. BACHELET, Ido, LEVI-SCHAFFER, Francesca ve MEKORI, Yoseph A. Mast cells: not only in allergy. *Immunology and Allergy Clinics*, 2006, 26.3: 407-425.
156. BEAVEN, Michael A. Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *European journal of immunology*, 2009, 39.1: 11-25.
157. ROSENWASSER, Lanny J. ve BOYCE, Joshua A. Mast cells: beyond IgE. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2003, 111.1: 24-32.
158. JOHNSON, Christopher, et al. Inhibition of Mast Cell-Derived Histamine Decreases Human Cholangiocarcinoma Growth and Differentiation via c-Kit/Stem Cell Factor-Dependent Signaling. *The American journal of pathology*, 2016, 186.1: 123-133.
159. KOHEI, Umezu, SATOSHI, Yuasa ve ATSUKO, Sudoh. Change of hepatic histamine content during hepatic fibrosis. *Biochemical pharmacology*, 1985, 34.11: 2007-2011.
160. O'ROURKE, D., et al. Mast cell activation in obstructive jaundice. *J Pathol*, 1993, 170.suppl: 398A.
161. S. Kurokawa, *Jap. J. Gastroent.* 73, 10 (1976).
162. THEODOROU, V., FIORAMONTI, J. ve BUENO, L. Integrative neuroimmunology of the digestive tract. *Veterinary research*, 1996, 27.4-5: 427-442.
163. NELSON, Lisa, et al. Endogenous opioid-mediated antinociception in cholestatic mice is peripherally, not centrally, mediated. *Journal of hepatology*, 2006, 44.6: 1141-1149.

164. GLASOVA, Helena ve BEUERS, Ulrich. Extrahepatic manifestations of cholestasis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 2002, 17.9: 938-948.
165. HERZIG, DAVID J. ve KUSNER, EDWARD J. Effect of cromolyn sodium and deuterium oxide on anaphylactic histamine release from rat peritoneal mast cells in vitro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1975, 194.2: 457-462.
166. MURPHY, Shirley ve KELLY, H. William. Cromolyn sodium: a review of mechanisms and clinical use in asthma. *Drug intelligence & clinical pharmacy*, 1987, 21.1: 22-35.
167. JANSSEN, L. J., WATTIE, J. ve BETTI, P. A. Effects of cromolyn and nedocromil on ion currents in canine tracheal smooth muscle. *European Respiratory Journal*, 1998, 12.1: 50-56.
168. VESSAL, Ghazal, et al. Effect of oral cromolyn sodium on CKD-associated pruritus and serum tryptase level: a double-blind placebo-controlled study. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2009, 25.5: 1541-1547.
169. KREMER, Andreas E., et al. Serum autotaxin is increased in pruritus of cholestasis, but not of other origin, and responds to therapeutic interventions. *Hepatology*, 2012, 56.4: 1391-1400.
170. Lindor KD, Gershwin ME, Poupon R et al. Primary biliary cir-rhosis. *Hepatology* 2009 ve 50:291–308.
171. HEGADE, Vinod S., KENDRICK, Stuart FW ve JONES, David EJ. Drug treatment of pruritus in liver diseases. *Clinical Medicine*, 2015, 15.4: 351-357.
172. BHALERAO, Angeline ve MANNU, Gurdeep S. Management of pruritus in chronic liver disease. *Dermatology research and practice*, 2015, 2015.
173. GUEDES, Pedro Luiz Rodrigues, et al. Increase of glycosaminoglycans and metalloproteinases 2 and 9 in liver extracellular matrix on early stages of extrahepatic cholestasis. *Arquivos de gastroenterologia*, 2014, 51.4: 309-315.
174. JARIDO, Veronica, et al. The emerging role of mast cells in liver disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2017, 313.2: G89-G101.

175. GULUBOVA, Maya V. ve VLAYKOVA, Tatyana I. Mast cells in human bile duct obstruction. *Journal of molecular histology*, 2004, 35.8-9: 791-801.
176. HARGROVE, Laura, et al. Isolation and characterization of hepatic mast cells from cholestatic rats. *Laboratory Investigation*, 2016, 96.11: 1198.
177. GULUBOVA, Maya ve VODENICHAROV, Angel. Structural examination of tryptase-, and VIP-positive mast cells in the common bile duct of patients with lithiasis. *Acta histochemica*, 2001, 103.4: 437-452.
178. THOMPSON, Helen L., et al. Murine mast cells synthesize basement membrane components. A potential role in early fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 1991, 87.2: 619-623.
179. CHOI, Joon-Seok, et al. Identification of cromolyn sodium as an anti-fibrotic agent targeting both hepatocytes and hepatic stellate cells. *Pharmacological research*, 2015, 102: 176-183.

8. EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onayı



T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



TOPLANTI TARİHİ : 02.03.2016

TOPLANTI NO : 2016/03

- 11-** Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2016-19-02/03 Protokol no'lu "Mast Hücre Stabilizatörü Kromalin Sodyumun Deneysel Kolestazda Olası İyileştirici Etkilerinin Araştırılması" konulu çalışmasının Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

Prof. Dr. K. Varım NUMANOĞLU
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı