

**T.C.  
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**TIKANMA İKTERİ OLUŞTURULAN  
RATLARDA KARACİĞERDE APOPİTOTİK  
İNDEKS VE p53 EKSPRESYONUNUN  
İNCELENMESİ  
( DENEYSEL ÇALIŞMA )**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. MEHMET NURİ KOŞAR**

**AFYONKARAHİSAR 2008**

**T.C.  
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**TIKANMA İKTERİ OLUŞTURULAN  
RATLARDA KARACİĞERDE APOPİTOTİK  
İNDEKS VE p53 EKSPRESYONUNUN  
İNCELENMESİ  
( DENEYSEL ÇALIŞMA )**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR.MEHMET NURİ KOŞAR**

**AFYONKARAHİSAR 2008**

**TEZ DANIŞMANI: PROF.DR.YÜKSEL ARIKAN**

**T.C.  
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**Tez Başlığı** : Tıkanma ikteri oluşturulan ratlarda  
**karaciğerde apopitotik indeks ve p53 ekspresyonunun incelenmesi**

**Tezi Hazırlayan** : Dr. Mehmet Nuri KOŞAR

**Tez Savunma Tarihi** :

**Tez Kabul Tarihi** :

**Tez Danışmanı** : Prof. Dr. Yüksel ARIKAN

İş bu çalışma jürimiz tarafından GENEL CERRAHİ ANA BİLİM DALI' nda  
TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Üye

Üye

Üye

Üye

ONAY

DEKAN

Prof. Dr. Necat İMİRZALIOĞLU

## TEŞEKKÜR

Çalışma hayatımdaki ve eğitim sürecimdeki katkılarından ötürü anabilim dalı başkanımız Prof.Dr.Osman Nuri DİLEK'e, başta tez danışmanım Prof.Dr.Yüksel ARIKAN olmak üzere hocalarım Doç.Dr.Gökhan AKBULUT, Doç.Dr.Coşkun POLAT, Doç.Dr.Sezgin YILMAZ, Doç.Dr.Dursun Ali ŞAHİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tezimin oluşturulmasındaki katkılarından dolayı Histoloji AD Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr.Murat TOSUN ve Biyokimya AD Öğretim Üyesi Doç.Dr.Tülay KÖKEN'e, AKÜ Genel Cerrahi AD Araştırma Görevlisi Dr.Ziya Taner ÖZKEÇECİ ve İtern Dr. İlter PAYDUR ' a teşekkürü bir borç bilirim.

Tüm özel ve eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bugünlere gelmemin mimarları olan tüm aile fertlerime minnetimi ayrıca belirtmek isterim.

Dr.Mehmet Nuri KOŞAR

## **TABLULAR**

Tablo - I: Karaciğer ve safra kesesi safralarının bileşenleri

Tablo - II: Biyokimyasal analiz

Tablo - III: Tanımlayıcı İstatistik

Tablo - IV: İstatistiksel Test (b)

## ŞEKİLLER

Şekil - 1: Karaciğer anatomisi

Şekil - 2: Karaciğerin segmentleri

Şekil - 3: Safra yolları anatomisi; a) sağ hepatik kanal b) sol hepatik kanal c) ana hepatik kanal d) sistik kanal e) safra kesesi f) koledok

Şekil - 4: Bilirubinün oluşum, metabolizma ve atılım yolu

Şekil - 5 : Koledok izolasyonu

Şekil - 6 : Fasya kapatılması

## **DİYAGRAMLAR**

Diyagram - 1: Safra asitlerinin oluşumu

Diyagram - 2: Apoptosis - nekroz kaskadı

## RESİMLER

Resim:1. Deney grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde apoptotik hücrelerin (kahverengi çekirdekli) görünümü. Fragel (Calbiochem). X100.

Resim:2. Deney grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde apoptotik hücrelerin (kahverengi çekirdekli) görünümü. Fragel (Calbiochem). X200. Mavi filtre kullanılmıştır.

Resim:3. Deney grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde apoptotik hücrelerin (kahverengi çekirdekli) görünümü. Fragel (Calbiochem). X200. Mavi filtre kullanılmıştır.

Resim:4. Deney grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde apoptotik hücrelerin (kahverengi çekirdekli) görünümü. Fragel (Calbiochem). X400. Mavi filtre kullanılmıştır.

Resim:5. Kontrol grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde parankimin görünümü. Hiçbir apoptotik hücre mevcut değildir. Fragel (Calbiochem). X100. Mavi filtre kullanılmıştır.

Resim:6. Kontrol grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde parankimin görünümü. Hiçbir apoptotik hücre mevcut değildir. Fragel (Calbiochem). X200. Mavi filtre kullanılmıştır.



Resim:7. Deney grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde p53 pozitif hücrelerin (kırmızı sitoplazmalı) görünümü. p53 Clone DO7 (Labvision). X200.

Resim:8. Deney grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde p53 pozitif hücrelerin (kırmızı sitoplazmalı) görünümü. p53 Clone DO7 (Labvision). X200.

Resim:9. Deney grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde p53 pozitif hücrelerin (kırmızı sitoplazmalı) görünümü. p53 Clone DO7(Labvision). X200.

Resim:10. Kontrol grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde parankimin görünümü. Hiçbir p53 pozitif hücre mevcut değildir. p53 Clone DO7 (Labvision). X200.

Resim:11. Kontrol grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde parankimin görünümü. Hiçbir p53 pozitif hücre mevcut değildir. p53 Clone DO7 (Labvision). X200.

# İÇİNDEKİLER

<b>I. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	1
<b>II. GENEL BİLGİLER</b>	2
2.1. KARACİĞER ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ	2
2.2. SAFRA YOLLARI ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ	5
2.3. SAFRA FİZYOLOJİSİ VE SAFRA ASİTLERİNİN OLUŞUMU	8
2.4. SAFRA SEKRESYONUNUN ÖZELLİKLERİ VE TIKANMA İKTERİ	11
2.5. APOPTOSİS	14
2.6. p53	17
<b>III. MATERYAL VE METOD</b>	20
3.1. HİSTOLOJİ	21
3.2. İMMUNOHİSTOKİMYA	22
<b>IV. BULGULAR</b>	23

<b>V. TARTIŞMA</b>	27
<b>VI. SONUÇ</b>	36
<b>VII. ÖZET</b>	37
<b>VIII. SUMMARY</b>	39
<b>IX. KAYNAKLAR</b>	41

# I. GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer dışı safra yollarının herhangi bir nedenle tam olarak tıkanması sonucu gelişen tıkanma sarılığı, cerrahi olarak tedavi edilmesi gerekli bir hastalık grubudur. Tıkanma sarılığı bulunan hastalara uygulanan safra yolları girişimlerinin morbidite ve mortalitesi çok yüksektir. Tıkanma sarılıklarının görünmeyen komplikasyonları, görünen komplikasyonlarından fazladır. Görünen komplikasyonlara bakıldığında ana komplikasyonlar sepsis ve renal yetmezliktir.

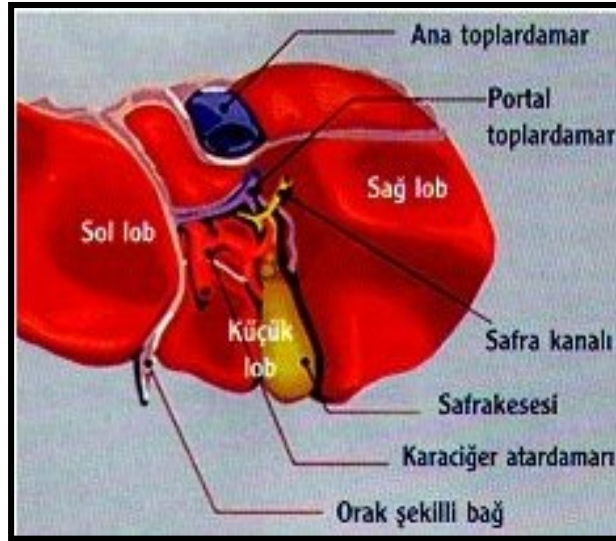
Apoptosis, DNA bağımlı hücrelerde fizyolojik ve patolojik durumlarda meydana gelebilen yüksek düzeyli planlı bir hücre ölümü mekanizmasıdır. Birçok doku; özellikle deri, barsak ve immün sistem hücreleri düzenli olarak yenilenebilmek için apoptosise ihtiyaç duyar. Apoptosiste, hepatositler bu hücrel hasarın etkisini azaltabilmek veya ortadan kaldırmak için kendi nükleuslarında p53 genini aktive ederek hücre siklusunu uzatmakta ve ortaya çıkmış DNA hasarını gidermeye çalışmaktadır. p53 geninin fonksiyonları gereği hücre hasarı sonucu ortaya çıkan bu etki ile ya hücredeki DNA hasarı tamamen ortadan kaldırılmakta veya hasar çok büyükse apoptotik sinyal mekanizmaları aktive edilerek hepatositler intihara zorlanmaktadır. Bu süreçte de apoptotik hücre sayısının artışı vücudu koruyucu bir etki yapmaktadır. Eğer hücre apoptosisle de ölemezse o zaman DNA hasarı kalıcı olur ve hücrelerde kanserleşmeye dek uzanabilecek patolojik değişiklikler başlar ki bu da karşımıza çeşitli klinik tablolarla çıkabilir.

Çalışmanın amacı, deneysel olarak tıkanma sarılığı oluşturulan ratlarda, tıkanma sarılığında mortalite ve morbiditeyi etkileyen septisemi sürecinde önemli bir yer tuttuğuna inanılan apoptosisin karaciğerdeki düzeyinin histolojik olarak belirlenmesidir.

## II. GENEL BİLGİLER

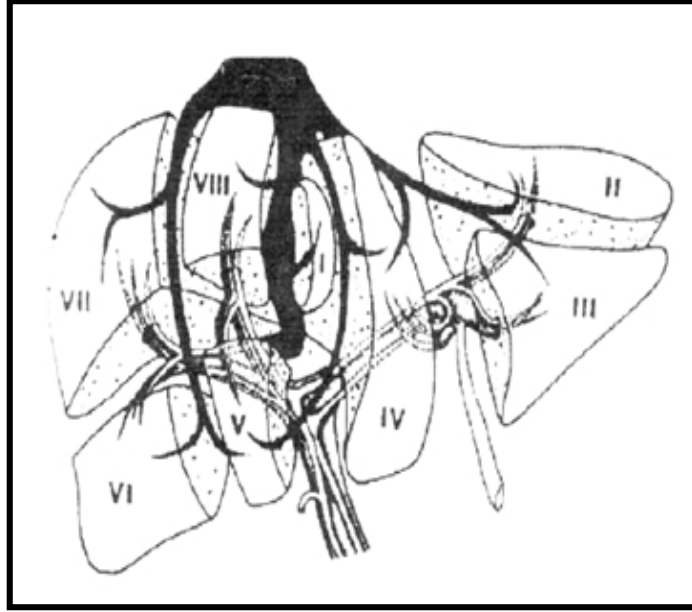
### 2.1 KARACİĞER ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Karaciğerin fizyolojik anatomisine bakıldığında ağırlığı erişkin bir insanda 1400-1700 gr arasındadır. Genişliği 14 cm, yüksekliği ise 16 cm kadardır. Karaciğerin diyaframla komşu olan yüzü konveks (facia diaphragmatica), iç organlarla komşu olan yüzü ise konkavdır (facia viseralis). Önde ve sağda bu iki yüzü birleştiren keskin kenara margo inferior, arkadaki künt ve yuvarlak kenara da margo dorsalis denir. Karaciğerin iç organlarla komşu olan yüzünde üç oluk bulunur. Enine durumda olan ve iki yan oluğu birbiriyle birleştiren orta oluğa karaciğer kapısı (porta hepatis) denilir. Buradan, karaciğere giren çıkan kan damarları, safra yolları, sinirler ve lenf damarları geçer. Bu üç oluk karaciğerin alt yüzünü dört loba ayırır. Sağ oluğun sağında bulunan kısma sağ lob, sol oluğun solundakine sol lob, porta hepatisin önündeki parçaya lobus quadratus, arkasındakine lobus caudatus denir. Lobların en geniş ve kalını sağ lobdur (2).



Şekil-1: Karaciğer anatomisi (1).

Fakat gelenekselleşmiş bu tanımlama gerçek segmental anatomiye açıklamaktan uzaktır. Karaciğer portal triadın dalları tarafından kanlanan segmentlere ayrılır ve hepatic venler ile drene olur. 1957 yılında Couinaud tarafından tanımlanan bu anatomik ayırım, sol ve sağ loblar arasındaki anatomik bölünme safra kesesi yatağının medial kenarından arkada vena kavaya olan hattı takip eder. Bu sınıflamaya göre üç segmentli sol lob; sol medial segmenti (segment IV) ve sol lateral segmentleri (segment II ve III) içerir. Sağ lob, portal ven ve hepatic arterin dallarına göre dört segmente ayrılır; anterior-inferior (segment V), posterior-inferior(segment VI), posterior-superior(segment VII) ve anterior-superior(segment VIII). Kaudat lob (segment I) arkada sağ ve sol hepatic loblar arasında ayrı vasküler yapılar ile yerleşmiştir. Segmentler arasındaki üç ana hepatic ven karaciğerin üst kısmında vena kavaya açılır (2).



**Şekil-2:** Karaciğerin segmentleri (3).

A.hepatika kommunis, turunkus çöliakus'dan çıkar. Hepatoduodenal ligament boyunca yükselir ve hilusta sağ ve sol dallarına ayrılmadan önce a. gastrika dekstra ve a.gastroduodenalis'i verir ve daha sonra karaciğere girer. Bir

dakikada karaciğere gelen 1500 ml kanın % 25' i a.hepatika'ya % 75' i ise v. porta'ya aittir. V. porta, içinde kapak bulunmayan bir damardır ve mide, ince ve kalın barsaklar, pankreas ve dalaktan gelen kanı karaciğere taşır. V.mezenterika süperior ile v. lienalis'in birleşmesinden oluşur. V. mezenterika inferior ise v.lienalis'e drene olur. Karaciğer lobüllerindeki santral venlerin son ortak yolları hepatik venlerdir. Sol, sağ ve orta olmak üzere üç ana hepatik ven vardır. Orta hepatik ven, ana lobar fissür üzerindedir ve sol lobun medial segmenti ile sağ lobun anterior segmentinin alt kısımlarını drene eder. Sol hepatik ven, sol lobun lateral segmentini, sağ hepatik ven ise sağ lobun posterior segmentini ve anterior segmentinin büyük bir kısmını drene eder. Orta hepatik ven, sol ve sağ hepatik ven ile birleşir ve v.kava inferior'a dökülür. Yüzeyel lenfatikler, lobüllerin yüzeyel kısımlarından başlayıp kapsülün altından geçerek diafragma ve karaciğerin asıcı ligamentleri yoluyla posterior mediastene girer. Lobüllerin derin kısımlarından kaynaklanan lenfatikler hepatik venleri takip ederek v. kava inferior boyunca ilerler veya portal venlerle birlikte porta hepatis'e ulaşarak sisterna şiliye oradan da duktus torasikus'a drene olur. Karaciğerin sempatik innervasyonu medulla spinalis'in T9-L1 segmentlerinden, parasempatik innervasyonu sağ ve sol vagustan gelen parasempatik liflerle sağlanır (2,4).

Karaciğer, elastik ve kollajen dokulardan oluşan kalın bir kapsül ile örtülüdür. Glisson kapsülü adıyla bilinen bu kapsül, tabakalar halinde sıralanmış olan ve aralarında sinüzoid adıyla bilinen karmaşık bir kılcal sistemin yer aldığı süngerimsi hücre kitlesini örter. Sinüzoidler, iç yüzlerini örten endotelin Kupffer hücresi adıyla bilinen özel fagositlerle döşenmiş olması ve makromoleküllere karşı daha fazla geçirgenlik göstermesi nedeniyle sistemik kılcal damarlardan ayrılır. Karaciğer hücre tabakaları, besin maddeleri ve metabolizma ürünlerinin rahatça alışverişini sağlayacak şekilde sinüzoidlerle ilişki halindedir (4).

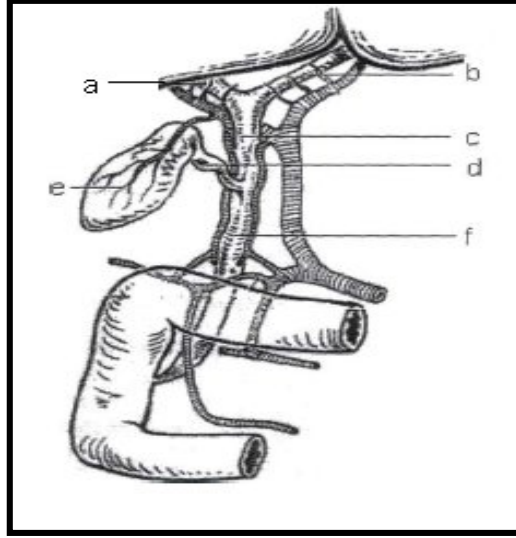
Mikroskopik incelemede karaciğer parankimi, sınırları tam belirli olmayan lobüller halinde görülür. Her lobülün merkezinde karaciğerden kalbe kan taşıyan karaciğer dışı kan akım sisteminin bir dalı olan santral ven yer alır. Bu santral venler giderek genişleyen sublobuler venlerle infrahepatik venlere drene olur ve

en sonunda v.kava inferior'a katılan v.hepatika'yı oluştururlar. Periferde bir çok lobül arasında yer alan bir bağ dokusu topluluğu vardır. Portal traktus veya portal triad adıyla bilinen bu doku topluluğu içinde v. porta, a.hepatika ve safra kanalikülleri yer alır. Vena porta ve a. hepatika'nın dalları bir seri bölünmeden sonra daha küçük dallara ayrılarak doğrudan sinüzoidlere dökülür. Safra yolları sistemi, hücre zarının bir bölümünü oluşturan ince safra kanalikülleri olarak başlar. Safra, hepatositler tarafından bu kanaliküllere drene olur. Safra kanalikülleri yoluyla intralobüler duktuslara ve daha sonra da portal traktus içindeki büyük safra kanallarına dökülür (5). Karaciğerin parankimini oluşturan bu lobüller birkaç milimetre uzunluğunda, 0.8-2 mm çapındadır. Karaciğerde 50.000-100.000 lobül bulunur. Karaciğer lobüleri; hepatik venlere oradan da vena kavaya boşalan bir santral ven etrafındaki yapılardan oluşur. Venöz sinüzoidlerin etrafında tipik endotel hücreleri ve büyük Kupffer hücreleri bulunmaktadır. Venöz sinüzoidleri eviren endotel hücrelerinde yaklaşık 1 mikron çapında çok geniş porlar bulunur. Endotel hücreleriyle karaciğer hücreleri arasındaki çok dar olan doku aralığına Disse aralığı denilir. Endotelin büyük porları nedeni ile plazmadaki maddeler disse aralığına geçebilirler. Karaciğer sinüzoidlerinin i yüzlerinde, kan akımına doğru uzanan pek çok Kupffer hücresi vardır. Bu hücreler çok yüksek fagositik aktivite göstererek portal venöz kandaki bakterilerin % 99'unu, hatta fazlasını kan, karaciğer sinüzoidlerinden ayrılmadan tutarlar. Karaciğerden bir dakikada geçen kan akımı miktarı ortalama 1450 ml kadardır. Bunun 1100 ml'si portal dolaşımdan, 350 ml'si hepatik arter dolaşımından kaynaklanır. Bir dakikada bu kadar fazla miktardaki kanın uğrak yeri olan karaciğerin, makrofaj sistemine katkısı yadsınamaz ölçüdedir (5).

## **2.2 SAFRA YOLLARI ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ**

Ekstrahepatik safra pasajı; sağ ve sol hepatik kanallar, ana hepatik kanal, safra kesesi, sistik kanal ve koledoğu içerir (6).





**Şekil-3:** Safra yolları anatomisi; a) sağ hepatik kanal b) sol hepatik kanal c) ana hepatik kanal d) sistik kanal e) safra kesesi f) koledok (6).

Safra kesesi, karaciğerin alt yüzünde sağ ve sol lobları ayıran olukta yerleşmiştir. Dört-ondört cm uzunluğunda (ortalama 8,5 cm) ve 3 cm genişliğindedir. Ortalama kapasitesi 30-50 ml'dir. Fundusu ve gövdesinin 2/3'ü periton ile çevrelenmiştir ve görülebilir. Safra kesesi, boyun kısmının konfigürasyonuna göre varyasyonlar gösterir. Boyun kısmı uzunsa, safra kesesi tubuler yapıdadır. Boyun kısmı kısa ve genişse, sakküler veya sferik şekildedir. Karaciğer yatağındaki yerleşimine göre 3'e ayrılabilir:

- 1-Safra kesesi karaciğer yatağında sığ yerleşimlidir ve 3/4'ü periton ile örtülüdür.
- 2-Safra kesesi karaciğer yatağında derin yerleşimlidir ve 1/3'ü periton ile örtülüdür.
- 3-'Pendulous' safra kesesi: Kесе tamamen periton ile örtülüdür. Burada sistik arter ve kanalın torsiyon riski vardır.

Safra kesesi değişik varyasyonlarda olabilir: Retroperitoneal, transvers, suprahepatik, 'vesica divisa' denilen çift safra kesesi, aksesuar safra kesesi, 'Rokitansky-Aschoff Sinüs'ü' denilen psödodivertikülüm, genişlemiş intramural uzantı şeklinde olan "Luscka" kanalı, safra kesesi ve sistik kanalın konjenital yokluğu bunlar arasında sayılabilir (6).

Sistik kanal; 3-5 cm uzunluğunda, 2,4-4 mm genişliğindedir. Pars spiralis denilen başlangıç kısmı dar, mukoza kıvrıntısı gibidir, kanüle etmek zordur. Sonraki kısmı sinüzoid eğim olarak tanımlanır ve ana hepatik kanalla birleşerek ana safra kanalını oluşturur. İnsanların % 75'inde sistik kanal, sağ lateralden, duodenum ile hepatik hilusun arasında, safra kanalının orta segmentine, dorsal veya ventralden, 40° açı ile açılır. Sistik kanalın, ana hepatik kanalı önden veya arkadan çaprazlayarak soldan giriş yapması anormal bir varyasyonudur. Ana hepatik kanal, 6,5 cm uzunluğunda ve 6,5 mm genişliğindedir. Sağ ve sol hepatik kanalların, porta hepatiste birleşmesiyle oluşur. Sistik kanal ile ana hepatik kanal birleşerek ana safra kanalını (koledok) oluştururlar. Sistik kanal ile ana hepatik kanal, aşağıda, retroduodenal yerleşimli olabilir veya sağ ve sol hepatik kanalın birleşim yeri ile aynı seviyede yani yüksek yerleşimli olabilir. Yüksek yerleşimde ana safra kanalı daha uzundur (7).

Ana safra kanalı, 6-8 cm uzunluğunda, ortalama 7,6 mm genişliğindedir. Çap yaşla artarak 11 mm'ye kadar çıkar. Dört segmente ayrılır:

- 1 - Supraduodenal segment: 2-5 cm uzunluğundadır.
- 2-Retroduodenal segment: 1-3,5 cm uzunluğundadır.
- 3-İntrapancreatik veya retropankreatik segment: 1-2,5 cm uzunluğundadır.
- 4-İntramural veya intraduodenal segment: 0,6-2,2 cm uzunluğundadır.

Ana safra kanalı, pankreas başına 5-7 mm'lik genişçe bir lümen şeklinde açılır. Bu kısmın genişliği yaşla artarak (13 mm'ye kadar çıkar) sakkuler dilatasyon gösterir. Kanalın çapındaki ani düşme sonucu (2,9-4,4 mm'e) koledok sfinkteri oluşur. Duodenuma geçişi sağlayan dar lümenli kısım isthmus veya pars preampullaris olarak adlandırılır. Burada safra ve pankreas kanalı ince bir mukozal septumla ayrılır. Hepatopankreatik ampulladan geçen safra kanalı duodenumun 2. kısmındaki papiller ostiuma açılır (7).

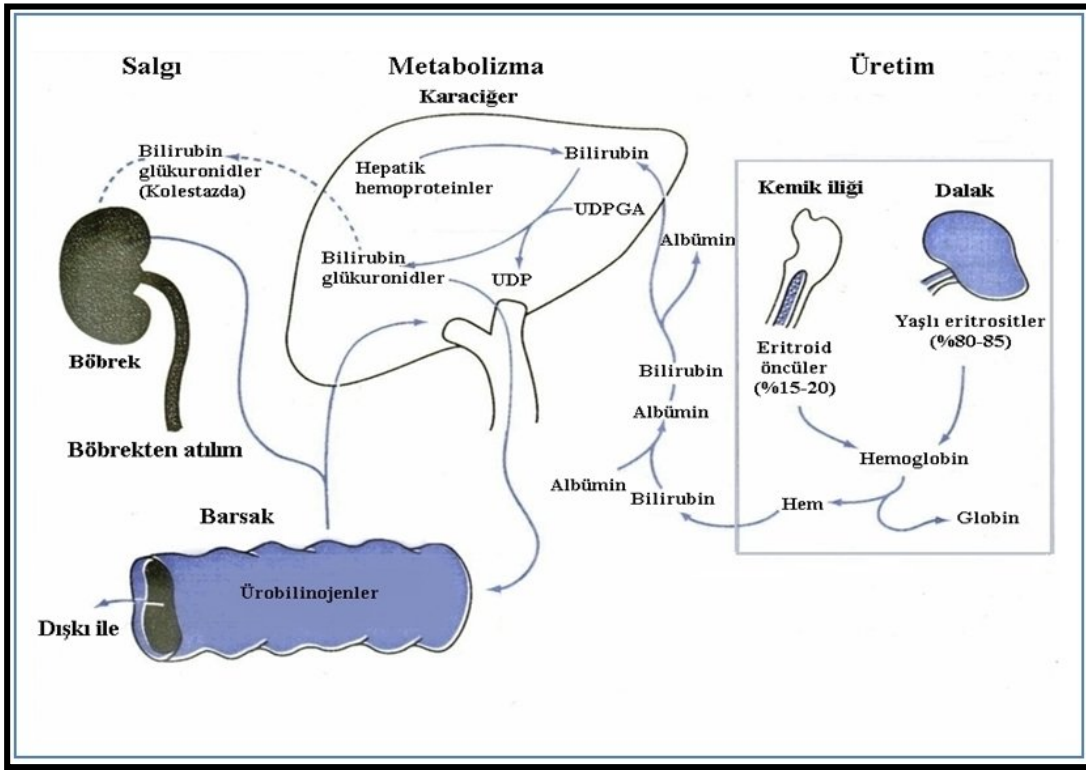
Sistik arter, sağ hepatik arterden ayrılır ve safra kesesini besler. Karaciğer, ana hepatik kanal ve sistik kanalın sınırladığı Calot'un sistik üçgeni içinde bulunur. Karaciğer dışı safra yollarının venöz drenajı v. porta'ya olmaktadır. Safra yolları sisteminin innervasyonu karaciğer gibidir. Vagusun uyarılması safra kesesinin kasılmasına, sempatik uyarı ise gevşemesine sebep olur. Sempatik sinirler içindeki afferent lifler, safra koliği ağrısını iletir (7).

Safra kanalları silindirik epitel ile örtülüdür ve mukus glandları ihtiva eder. Safra kesesi duvarı silindirik epitelden oluşan mukoza, musküler tabaka, subseroza ve serozadan oluşmuştur. Mukus glandları sadece safra kesesinin boyun kısmında bulunur (8).

### 2.3 SAFRA FİZYOLOJİSİ VE SAFRA ASİTLERİNİN OLUŞUMU

Bilirubin, toksik bir maddedir ve safra yolu ile atılması karaciğerin en önemli fonksiyonlarındanıdır. Günlük total safra sekresyonu 700-1400 ml, safra kesesinin maksimum hacmi ise, ancak 30-60 ml kadardır. Bununla beraber 12 saatlik safra salgısı kesede depo edilebilir. Eritrositler 120 günlük yaşamları sonunda doku makrofajları tarafından fagosite edilir. Hemoglobun ilk olarak globin ve hem'e ayrılır. Hem halkası açılarak serbest demir kanda transferinle taşınır, dört pirol çekirdeği düz bir zincir yaparak safra pigmentlerini oluşturur. Oluşan safra pigmentlerinden ilki olan yeşil pigment, biliverdindir. Biliverdin indirgenerek sarı-kırmızı renkteki bilirubini oluşturur. Bilirubin plazmada hafifçe çözünür ve albumine kovalent olmayan bağlarla bağlanarak karaciğere taşınır. Karaciğer hücre membranınca absorbe edilen bilirubin, plazma membranından ayrılarak, karaciğer hücrelerindeki Y ve Z proteinleri adı verilen iki proteinden biri ile birleşir. Ancak, hemen sonra bilirubin bu proteinden ayrılır ve yaklaşık %80'i glukuronik asit ile birleşerek bilirubin glukuronat, %10'u sülfat ile birleşerek bilirubin sülfatı yapar, %10'u ise çeşitli maddelerle birleşir. Non-konjuge bilirubin yağda eriyebilir, toksiktir ve albumine sıkı bir şekilde bağlanarak yüksek kan düzeylerinde bile idrarla atılmayan bir form oluşturur.

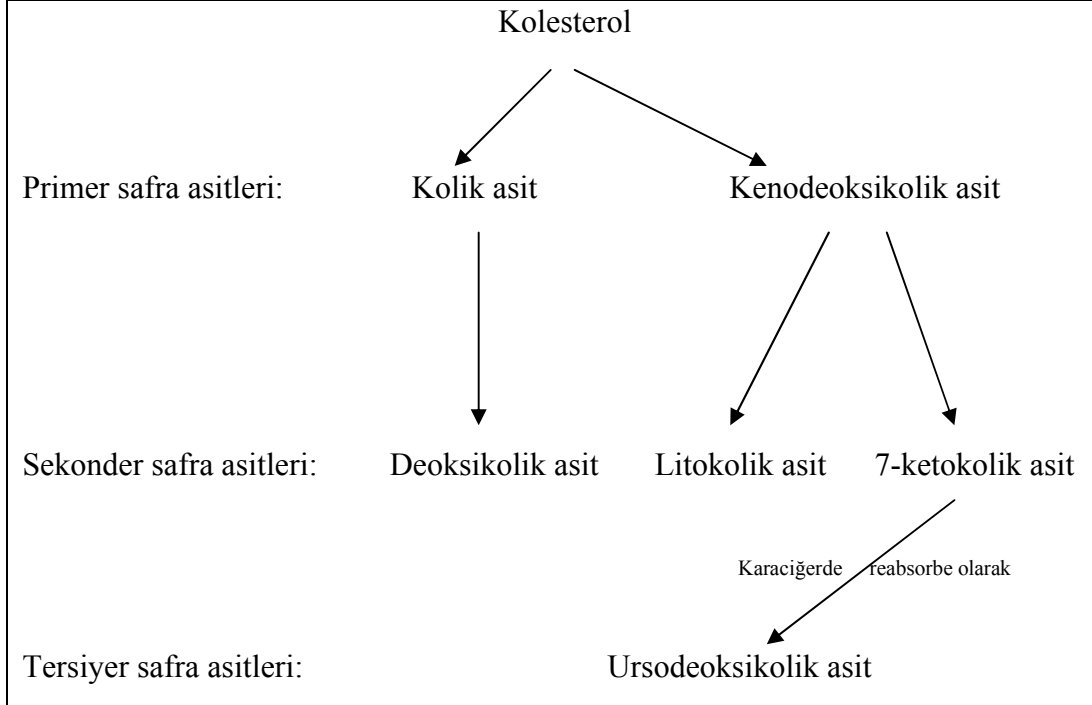
Yüksek kan düzeylerinde dokulara özellikle insanlarda beyine girebilir ve toksik hasara neden olur. Konjuge bilirubin suda eriyebilir, toksik değildir ve sadece gevşek olarak albumine bağlıdır. Plazmada normalden yüksek oranda bulunduğu (tıkanma sarılıklarında olduğu gibi) idrarla atılabilir. Bilirubin bu bileşikler halinde aktif transportla safra kanalcıklarına çıkarılır (7). Barsaklara geçen bilirubinin yaklaşık yarısı bakteriler tarafından suda kolay eriyen ürobilinojene çevrilir. Ürobilinojenin bir kısmı barsaktan geri emilerek portal dolaşıma geçer ve böbreğe gelerek burada sarı renkli ürobiline çevrilir. İdrara rengini bu madde verir. Dışkıdaki ürobilinojenin çoğu barsak bakterileri tarafından okside edilerek sterkobiline döner ve dışkının tipik rengini verir (9).



**Şekil-4:** Bilirubinin oluşum, metabolizma ve atılma yolu (9).

Safranın kuru içeriği kolesterol, safra asitleri, bilirubin ve fosfolipidden oluşmaktadır. Safra asitleri hepatositlerde kolesterolden sentezlenen steroid moleküllerdir. Taurin ve glisin ile konjuge edilerek safra yollarına itrah edilirler.

Safrada primer, sekonder ve tersiyer olmak üzere 3 tip safra asidi bulunmaktadır. Kolesterol ile safra asitleri arasındaki ilişki şu şekilde şematize edilebilir:



**Diyagram-1:** Safra asitlerinin oluşumu (10).

Primer safra asitleri, barsakta anaerop bakteriler tarafından sekonder safra asitlerine dönüştürülmektedir. İnsanda safra asitlerinin % 38-54'ü kenodeoksikolik asit, % 26-39'u kolik asit ve % 16-33'ü deoksikolik asitten oluşmaktadır. Ursodeoksikolik asit ve litodeoksikolik asit % 0.1-5 gibi daha az oranlarda bulunur. Safra asitlerinin, kolesterolün taşınması ve taş oluşumlarının engellenmesinin yanında, yağların emiliminde de katkıları olmaktadır. Safra asitleri barsak içindeki endotoksinleri ve bakterileri deterjan etki ile bağlamakta, emilimlerini ve bakterilerin aşırı üremesini engellemektedir (11).

Ursodeoksikolik asit insanda bulunan endojen bir safra asitidir. Diğer safra tuzlarından daha hidrofilik olması nedeniyle ayrılmaktadır. Bu özellik ursodeoksikolik asite düşük toksisite kazandırmaktadır. Klinikte safra taşlarını eritmek amacıyla kullanılan ursodeoksikolik asit, kolestatik karaciğer

hastalıklarında safra asitlerinin yol açtığı toksisitenin baskılanması, hepatosit sitoprotektif etkisi ve immün sistem modülasyonu ile karşımıza çıkmaktadır. Diğer safra asitleri hepatosit membranlarını hasara uğratacak kadar güçlü deterjan özelliklere sahiptirler. Hidrofilik ursodeoksikolik asitin deterjan etkisi çok daha az belirgindir ve hepatotoksik değildir. Ursodeoksikolik asitin hepatosit membranlarına bağlandığı ya da onların yapılarına girerek ve stabilitelerini arttırmak suretiyle membranları hasardan koruduğu ileri sürülmektedir. Ursodeoksikolik asit, veziküler transport yollarını aktive ederek hepatositlerde endotoksinin biliyer itrahını artırmaktadır (12). Aynı zamanda ursodeoksikolik asit immün modülatör etkilere de sahiptir (13,14).

## 2.4 SAFRA SEKRESYONUNUN ÖZELLİKLERİ VE TIKANMA İKTERİ

İkter ( sarılık ) teriminin anlamı vücut dokularının sarıya boyanmasıdır. Böylece deri ve derin dokular sararır. Normalde serbest ve bileşik şekilleri içeren plazma bilirubin konsantrasyonu 0.5 mg/100 ml kadardır. Deri, bilirubin konsantrasyonu normalin üç katına yani 2 mg/100 ml'ye çıktığı zaman sararmaya başlar. Sarılığın en çok rastlanan iki tipi hemolitik nedeni olan ve obstrüktif nedeni olanıdır. Tıkanma ikteri, safra kanallarının tıkanması veya karaciğer hücrelerinin haraplanmasıyla normal miktardaki bilirubin bile gastrointestinal sisteme çıkarılamamasıdır (15).

Karaciğerden safra salgılanması iki aşamada gerçekleşir: 1- önce hepatositler tarafından üretilir ve hepatik hücrelerin arasındaki küçük safra kanaliküllerine salgılanır, 2- daha sonra, interlobüler septumlara doğru akar. Burada kanaliküller terminal safra kanallarına dökülür ve daha sonra giderek daha büyük kanallara dökülerek sonunda hepatik kanal ve koledok kanalına ulaşır. Buradan da ya doğrudan duodenuma ya da sistik kanal yoluyla safra kesesine yönelir (16).

**Tablo - I:** Karaciğer ve safra kesesi safralarının bileşenleri (10).

Bileşen	Karaciğer safrası	Safra kesesi safrası
Su	97.5 gm/dl	92 gm/dl
Safra tuzları	1.1 gm/dl	6 gm/dl
Bilirubin	0.04 gm/dl	0.3 gm/dl
Kolesterol	0.1 gm/dl	0.3-0.9 gm/dl
Yağ asitleri	0.12 gm/dl	0.3-1.2 gm/dl
Lesitin	0.04 gm/dl	0.3 gm/dl
Sodyum	145 mEq/L	130 mEq/L
Potasyum	5 mEq/L	12 mEq/L
Kalsiyum	5 mEq/L	23 mEq/L
Klor	100 mEq/L	25 mEq/L
HCO <sub>3</sub>	28 mEq/L	10 mEq/L

Safra tuzlarının yaklaşık % 94'ü ince barsaklardan absorbe edilir. Bunların yarısı ince bağırsakların proksimal bölümünden difüzyon ile, geri kalanı ise aktif transport ile distal ileumdan emilmektedir. Daha sonra portal sisteme geçerek karaciğere ulaşır. Bu tuzların tamamı karaciğerde ilk geçişte venöz sinüslerden hepatik hücrelere absorbe olurlar ve safraya sekrete edilirler. Safra tuzları feçesle atılmadan önce 18 kez dolaşmış olur. Her siklusda % 5 kadarı atılır. Safra tuzlarının bu dolaşımına enterohepatik dolaşım denir (10).

Ekstrahepatik safra yollarının bir nedenle tıkanması sonucu ortaya çıkan, hiperbilirubinemi ve barsakta safra asitlerinin yokluğuyla karakterize olan tıkanma sarılığında safra yolları cerrahisi yüksek mortalite ve morbidite riski taşır (15-17). Başlıca komplikasyonları sepsis ve renal yetmezliktir. Postoperatif dönemde bu hastalarda sıklıkla görülen intraabdominal infeksiyonlar ve yara infeksiyonları, halen hastalar ve cerrahlar için ciddi bir sorundur (17,18).

Tıkanma sarılığında barsakta safranin yokluğu endotoksemi ve bakteriyal translokasyonu artırmaktadır (19,20). Barsakta safranin yokluğu çekal mikroflorayı değiştirmekte; oral yolla safra ve safra asitlerinin verilmesi tıkanma sarılıklarında enterik bakteri popülasyonunu, intestinal morfoloji ve fonksiyonunu normal hale getirmektedir (11).

Tıkanma sarılıklarında bakteriyal translokasyon ve endotokseminin bir nedeni de immün sistem depresyonudur (21,22). Aynı zamanda Kupffer hücrelerinin fonksiyonlarının depresyonu ve retikuloendotelial sistem (RES) fonksiyonlarının da azaldığı gösterilmiştir (21-24).

Barsak duvarındaki makrofajlar, lenfositler, peyer plakları, mezenter lenf nodları ve karaciğerdeki Kupffer hücreleri, bakteri ve endotoksinler için filtre görevi görürler (25).

Tıkanma sarılığı, immün sistemde belirgin bir depresyon oluşturur ki bu depresyon ancak obstrüksiyon çözüldükçe düzelmektedir (22). RES'in de deprese olduğu, deneysel ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir (21). RES, karaciğer, akciğer ve kemik iliğinde özellikle bakteri, endotoksin, immün kompleks ve hücre debrislerinin temizlenmesinde görevlidir (26,27). Tıkanma sarılığı ve sepsis modeli ile yapılan çalışmalarda (22) Kupffer hücre depresyonu ve RES fonksiyonlarının azaldığı gösterilmiştir. İntraduktal basıncın artması Kupffer hücre sayısını azaltmaktadır. Plazmada toksik maddelerin artması, splenik hepatik kan akımının azalması, serum opsoninlerinin depresyonu, Kupffer hücre aktivitesini azaltmaktadır (21).

Tıkanma sarılığında, serumdaki bilirubin, alkalen fosfataz (ALP) ve alanin aminotransferaz (ALT) yükselmeleri karaciğer hasarını gösteren spesifik belirteçlerdir (28). Tıkanma ikteri nedeniyle opere edilen hastaların büyük bir çoğunluğunda özellikle septik komplikasyon olmak üzere postoperatif komplikasyonlar gözlenmektedir (29,30). Son zamanlarda bu komplikasyonların oluşumunda sepsis sendromunu yöneten olaylar olan portal ve sistemik endotokseminin, bakteriyal translokasyonun tetiklediği proinflamatuar yanıt ve inflammatuar kaskadın aktivasyonunu gösteren çalışmalar vardır (31-33). TNF- $\alpha$  ve interleükin IL-6'nın arttığı, hücrel immünitinin baskılandığı deneysel olarak (34, 35) ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir (36).

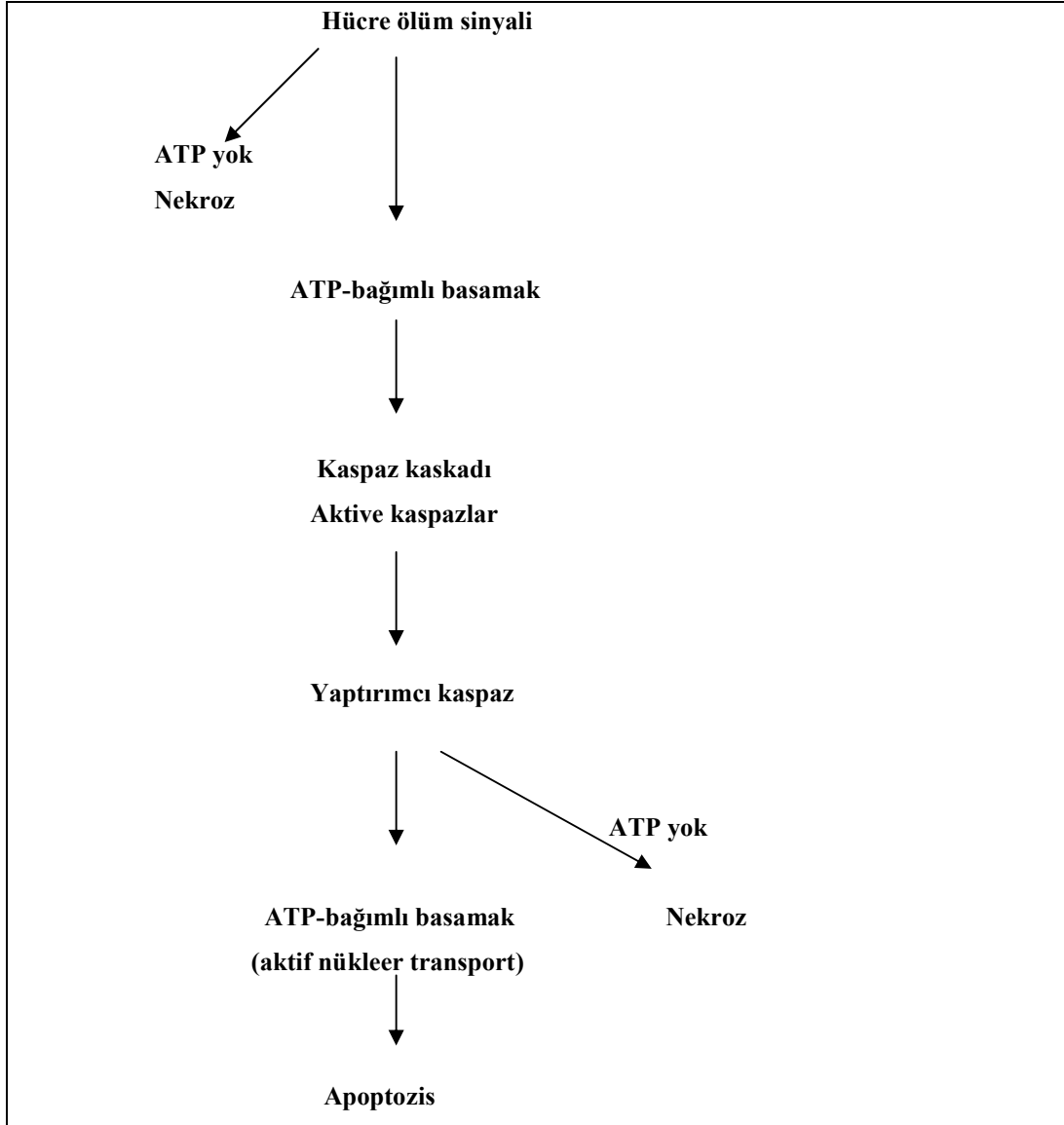


Tıkanma sarılığında görülen akut renal hasar ve sepsisle korele olarak karaciğerdeki RES fonksiyonlarında azalma ve Kupffer hücrelerinin endotoksin temizleme klirensinde düşme görülür (37,38). Tıkanma sarılıklı vakalarda sistemik endotoksemi ve üzerine eklenmiş inflamatuvar yanıt operatif travma ve postoperatif morbiditenin nedeni olarak gözükmektedir (38).

## 2.5 APOPTOSİS

Apoptosis programlanmış hücre ölümünü ifade etmektedir. İç/dış uyarılar sonucu internal olarak kodlanmış intihar programının spesifik aktivasyonu sonucu oluşur. Bir hücrenin mitoz, farklılaşma ve apoptosis olmak üzere önünde üç seçeneği vardır. Ultraviyole, ilaçlar, hormonlar ve lizozomal sitotoksik ajanlar apoptosisin dış uyarılarıyla transkripsiyonel regülatörler ve serbest O<sub>2</sub> radikallerinin yol açtığı DNA hasarı iç uyarılar olarak karşımıza çıkmaktadır. Apoptosis karşımıza sitotoksik T hücrelerinin indüklediği hücre ölümlerinde, parankimatöz organların patolojik atrofisinde, viral hastalıklarda hücre zedelenmesinde, dokularda hücre miktarının sabit tutulmasında, hasarlanmış hücrelerin uzaklaştırılmasında ve yaşlanma sürecinde ortaya çıkmaktadır. Apoptosisde hücreler tek tek etkilenir, fizyolojik uyarılarla tetiklenir, komşu hücre ve makrofajların fagositozu mevcuttur ve inflamatuvar değişiklikler söz konusudur (39).

Apoptosisin morfolojisine baktığımızda hücre büzüşmesi, kromatin kondensasyonu, sitoplazmik bleblerin oluşması, apoptotik cisimlerin oluşması ve fagositoz aşamaları izlenir. Apoptosisde biyokimyasal olarak protein klivajı, protein 'cross-linking', DNA kırılması ve fagositik tanınma özellikleri izlenir. Biyokimyasal özelliklerine baktığımızda ise aktivasyon ve enzimatik basamaklar içeren kontrollü bir süreçte; enerji bağımlı olduğu, random olmayan DNA fragmentasyonu, prelitik DNA fragmentasyonu, mitokondriden sitoplazmaya bazı faktörlerin çıkışı (Apoptosis inducing factor ve cytochrome c), kaspaz kaskadının aktivasyonu ve membran asimetrisinin bozulması gözlenir. Diyagram-2'de hücre ölümünün oluşumu şematize edilmektedir (39).



**Diyagram-2:** Apoptosis - nekroz kaskadı

Karaciğerde apoptosis oluşurken apoptotik yapılar oluşur bunlara ‘councilman cisimcikleri’ denir ve bu dakikalar, saatler içerisinde oluşur. Bu cisimcikler Annexin V boyası ile gösterilebilir. TUNEL boyaması ile de dokuda apoptotik DNA fragmanları saptanır.

Apoptosis, DNA bağımlı hücrelerde fizyolojik ve patolojik durumlarda meydana gelebilen yüksek düzeyli bir planlı hücre ölümü mekanizmasıdır (39). Apoptosis esas olarak vücut için zararlı olan, fazla hale gelen, ihtiyacından daha uzun yaşayan hücrelerden kurtulmayı sağlayan bir metoddur. Birçok doku ve

özellikle deri, barsak ve immün sistem hücrelerinin düzenli olarak yenilenmesi için apoptosise ihtiyaç duyarlar. Aktif hücre sel nekroz ile karşılaştırıldığında nekroz genellikle hücre membranında bir destrüksiyon sonucu oluşurken, apoptosis hücre sel bü zülme ile sonuçlanan bazı morfolojik bulgularla karakterizedir ki bunlar; nükleer ve sitoplazmik bü züşme, membran ayrışması ve bu yapıların içinde oluşan apoptotik cisimciklerdir. Apoptotik hücreler hızlıca tanınırlar ve makrofaj ve/veya dentritik hücrelerce fagosite edilirler. Son günlerdeki kanıtlar göstermektedir ki apoptotik hücreler immün fonksiyon için gerekli olan hücrelere zarar vermekte ve immünsupresyona katkıda bulunmaktadır (40). Septik sendrom sürecinde lenfositlerin apoptosisi, interlökin 2'nin bulunmayışı ile ya da glukokortikoidlerin ve granzimlerin ( sitolitik lenfositlerin granülleri, naturel killer ve sitotoksik T hücreleri ) salınımı ile ya da TNF- $\alpha$  ya da Fas ligandının tetiklediği ölüm aktivatörleri ile gelişir.

Apoptosis sitozolik ve/veya mitokondrial kaspazların (intracelluler sistein proteaz) otoaktivasyonu aracılığıyla ilerler ki bu Bcl-2 genomunun kontrolündeki pro- ve anti-apoptotik proteinlerle düzenlenir (41). Bu kaspaz aktivasyonu apoptoside neredeyse damgasını vurmuş hale gelmiştir. Aktive kaspaz-3 hücre içi apoptotik kaskadda efektör rolü oynamaktadır (42). Apoptosis iskemik kalp hastalığına, felce, nörodejeneratif hastalıklara, sepsis ve multi organ disfonksiyon sendromunda hakim roldedir.

Apoptosisin bir noktada durdurulması, fonksiyonların devamı, büyüme ve T lenfositlerinin diferansiyasyonu için gereklidir. Bununla birlikte apoptosis target hücrelerinin sitotoksik öldürülmesinde ve immün cevapta lenfosit hemostazisinin düzenlenmesinde anlaşılammış rollere sahiptir. Böylece apoptosis, lenfosit popülasyonu etkilerine bağımlı olan konakçı savunmasında avantaj ve dezavantajları ile öne çıkmaktadır (43).

Deneysel hayvan çalışmalarında ve ciddi hastalığı bulunan hastalarda apoptosisin artışının lenfoid organlarda ve bazı parankimal dokularda immün supresyona neden olduğu, anerji oluşturduğu, tedaviye yanıtı zlık oluşturarak

organ sitem disfonksiyonunda temel etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Deneysel hayvan çalışmalarında lenfoid hücreleri inhibe edici tedavinin apoptosisin ilerlemesi ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Anlaşılmaktadır ki apoptosisi bloke edebilecek olan farmakolojik ajanların geliştirilmesi sepsis tedavisine rehberlik edebilecek alışılmamış tedavi yaklaşımlarını gündeme getirebilecektir (44-46).

## 2.6 p53

p53 17. kromozomun kısa kolunda p13.1 bölgesinde yer alan ve 393 amino asit içeren bir gendir. Farklı görevleri olduğu birçok çalışmayla ortaya konmuş olup bilhassa ağır DNA hasarı olan durumlarda hücre çekirdeğinde ortaya çıktığı belirlenmiştir (47). Artmış p53 geni miktarı hücre siklusunun G<sub>1</sub> fazının bir süreliğine duraklamasına neden olur ve bu sayede S fazına girilmeden önce DNA tamiri için hücre zaman kazanmış olur. Bu nedenle p53 “genom koruyucusu” olarak da isimlendirilmektedir (47,48). p53 miktarı artışı ortamdaki hücrelerin apoptosiz ile ölümünü baskılamak suretiyle aşırı hücre çoğalmasını engelleyici etki yapar. Bununla birlikte, bu geni kontrol eden başka genlerin varlığı veya yokluğunda p53 fonksiyonları üzerine belirleyici rol oynar. Örneğin c-Myc gibi bir onkojen tarafından üretilen çoğalma sinyalleri p19 ( ARF ) geni tarafından kontrol altında tutulur (49). Bu gen ortamdaki böyle bir sinyal alındığında mdm2 gen yıkımını uyarmak suretiyle p53 yıkımını engeller ve ortamdaki p53 miktarı artar. Eğer bu gende herhangi bir hasar meydana gelecek olursa p53 miktarının yetersizliğine bağlı olarak dokuda apoptosiz oranı azalır ve malign karakterde klinik tablolar ortaya çıkabilir (50,51).

Birçok hücresel sistemde apoptosizin başlangıcı p53 supresör geninin aktivasyonu ile olmaktadır (52). p53 ya da diğer adıyla tümör protein 53 (TP53), hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Birçok organizmada kanseri baskılamak için çok önemli bir proteindir. Genomda mutasyon olmasını önleyerek genom stabilitesini korur. p53, hücre içerisinde dördü (tetramer) bağ yapmış halde işlevseldir. DNA zarar gördüğünde DNA tamir proteinlerini harekete geçirir. DNA tamir edilemeyecek kadar zarar gördüğünde ‘apoptosiz’ i

başlatır. Bu gen insanlarda 17. kromozomda bulunur. Farelerde 11. kromozomda, sıçanlarda 10. kromozomda, köpekte 5.kromozomda ve domuzda 12. kromozomda yerleşmiştir.

Kanserlerde gen düzeyinde en sık rastlanan değişiklik p53 tümör baskılayıcı gen mutasyonlarıdır. Tümör baskılayıcı gen kaybında veya inaktivasyonunda hücre, malign değişim yolunda önemli bir adım atmaktadır. Deri, akciğer, mide, kolon, meme, mesane, baş-boyun, özefagus gibi insanlarda en sık görülen kanserlerde p53 geni mutasyonlarının görülme olasılığı % 30-70 arasında değişmektedir.

Yaban tip mutasyona uğramamış p53 proteini hücre büyümesinin durdurulması, programlanmış hücre ölümü, hücre farklılaşması ve DNA tamir mekanizmasının başlatılmasında rol alır.

p53 mutasyonlarının çoğu aminoasit değişikliğine yol açan 'missense' mutasyonlardır. Mutasyon genellikle fonksiyon kaybı ile sonuçlanır ve bu durumun tümör prognozu ile ilişkisi gösterilmiştir. Bu nedenle mutasyon analizi kanserin tanısı, tedavisi ve takibinde yararlı bir yaklaşım olabilmektedir.

İnsan kanserlerinde saptanan yüksek p53 geni mutasyon görülme sıklığı, p53'ün tümör gelişiminde önemli işlevlere sahip olduğunun göstergesidir (53). p53 bu işlevlerini gen transkripsiyon kontrolü, DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, genomik stabilite, kromozom segregasyonu, senesens, anjiogenez, apoptosis ve tümör baskılanması gibi hücresel süreçlerde direkt ya da indirekt olarak sahip olduğu moleküler etkileşimler yolu ile yerine getirmektedir (54). Tüm bu işlevleri ve özellikle tümör gelişimini baskılayıcı rolleri ile 'genomun koruyucusu' olarak tanımlanan p53 proteini DNA hasarı, hipoksi, nükleotid havuz depleasyonu, viral enfeksiyonlar ve onkogen aktivasyonu gibi çeşitli genomik stres durumlarında aktive olmaktadır. Ancak normal p53 işlevinin bozulması, kanser gelişimini baskılayan hücre içi yolların işlevlerinin

bozulmasına neden olmakta ve bu durum hücrenin kanserleşme sürecine katkıda bulunmaktadır (53).

p53 geninin allelik heterozigosite kaybına yol açan mutasyonlara insan kanserlerinin yaklaşık olarak %50'sinde rastlanılmaktadır (53). p53 geninde saptanan bu mutasyonlar, genin tümör baskılayıcı işlevini ortadan kaldırmaktadır. Ancak p53 mutasyonları ile histolojik tümör evreleri arasında anlamlı istatistiksel ilişki kurulamamakta ve bu konuda yapılan araştırma sonuçları birbirleriyle çelişmektedir (55).

### III. MATERYAL VE METOD

Bu deneysel çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Cerrahi ve Araştırma Bölümü laboratuvarında, Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi. Çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Cerrahi ve Araştırma Bölümüne bağlı hayvan üretim merkezinden temin edilmiş , ağırlıkları 270 -320 gr arasında değişen 20 adet erkek cins wistar - albino rat ile gerçekleştirilmiştir. Deney öncesi ve sonrasında denekler müstakil eşit büyüklükteki kafeslerde barındırıldı. Standart yem ve çeşme suyu ile beslenmeleri sağlandı. Deney sekizerli gruplarla planlanmış olup gruplardaki deney hayvanı sayısı olası kayıplar planlanarak oluşturuldu. Denekler onarlı iki gruba ayrıldı.

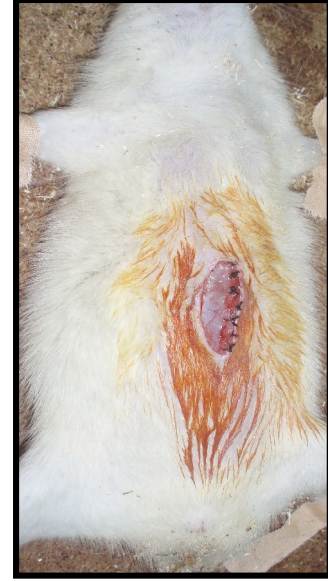
**1.Grup:** ( Kontrol Grubu ): orta hat laparotomi ve koledok eksplorasyonu yapılan grup

**2.Grup:** ( Çalışma Grubu ): orta hat laparotomi, koledok eksplorasyonu ve ligasyonu yapılan grup

Deneyin yapılacağı günün öncesindeki geceyarısından itibaren ratların beslenme süreci durduruldu ve cerrahi girişim sabah 9 ile 12 arasında planlandı. Girişim öncesi deney hayvanlarına anestezik ajan olarak im. Ketamin 100 mg/kg ( Ketalar amp, EIP, İstanbul, Türkiye) ile Xylazine 60 mg/kg (Bayer, İstanbul, Türkiye) uygulandı. Ağrılı uyarana yanıt alınmayınca cerrahi işleme başlandı. Ratlar supin pozisyonunda yatırıldıktan sonra ön ve her iki arka ekstremitesi sabitlendi. %10'luk Betadin ile antisepsi sağlandı. Ardından her iki gruba da üst abdominal orta hat kesisi ile laparotomi uygulandı. Her iki grupta da koledok izole edildi ( Şekil 4 ) ve kontrol grubunda bu aşamada cerrahi sonlandırılırken çalışma grubunda 4-0 ipek (Doğsan, İstanbul, Türkiye) ile koledok iki ayrı yerinden bağlandı ve ligatürler arasından tam kat olarak kesildi. Fasya ve cilt tek tek olarak 3-0 ipek ile ayrı ayrı kapatıldı. ( Şekil 5 ) Ratlar anestezinin etkisinden çıkmak üzere ayrı ayrı kafeslerde infrared kaynağıyla ısıtılan bekleme alanlarına alındı.



**Şekil-5** : Koledok izolasyonu



**Şekil-6** : Fasya kapatılması

Yedi gün boyunca deney hayvanları 24 °C sıcaklığındaki oda ısısında standard yem ve çeşme suyu ile beslenmeye alındı ve 12 saat gece 12 saat gün ışığı alabilen laboratuvar ortamında himaye edildi. Yedinci günün sonunda deney hayvanlarından kontrol grubunda ikter olmadığı ve çalışma grubunda ikter oluşturulduğunun inspeksiyonla saptanmış olmasının dışında biyokimyasal olarak kanıtlanması amacı ile deney hayvanlarının kuyruklarından kan alındı ve analiz edildi.

Biyokimyasal analiz sonucunda tıkanma ikterinin gerçekleştirildiğinin kanıtlanması ile gruptaki deney hayvanları histolojik inceleme için karaciğer örnekleme ve sakrifikasyon amaçlı ikinci kez postoperatif 7. günde eski insizyon üzerinden anestezisi sağlanarak opere edildi ve acı duymamalarına özen gösterildi. Alınan karaciğer örnekleri %10 formol ile tespit edilerek Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı'na incelenmek üzere nakledildi.

### **3.1. HİSTOLOJİ**

Deney ve Kontrol gruplarından alınan karaciğer dokusu örnekleri %10'luk nötral formaline konulmak suretiyle fikse edildi. Fiksasyon sonrası örnekler rutin



histolojik parafin takip metodu kullanılmak suretiyle takip edilerek parafine gömüldü.

### 3.2. İMMUNOHİSTOKİMYA

Her hayvandan alınan 4 µ kalınlığında kesitler PolyLysine kaplı lama alınarak immunohistokimyasal boyama uygulandı. İmmunohistokimyasal olarak p53 ekspresyonunu göstermek için alınan örnekler öncelikle rehidrate edildi. Sonrasında antijen retrieval uygulamak için örnekler Citrate buffer'a konularak mikrodalga fırında 25 dakika süreyle bekletildi. Primer antikör olarak anti-p53 Clone DO-7 (Labvision, Fremont CA, USA) ve sekonder antikör olarak HRP (=Horse Radish Peroxydase) (Labvision, Fremont CA, USA) kullanıldı. Kromojen olarak AEC ve zıt boyama için Mayers Hematoxylen (Sigma, USA) kullanıldı. Boyanan lamlar ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

Öte yandan yine her örnekten alınan diğer 4 µ kalınlığındaki kesitler PolyLysine kaplı lama alınarak apoptosis tespiti amacıyla kullanıldı. Apoptosisin tespiti amacıyla alınan örnekler TUNEL metodu kullanılmak suretiyle boyandı. TUNEL metodu uygulanması için ticari bir kit olan Fragel DNA Fragmentation Detection kit (Calbiochem, Darmstadt, Germany) kullanıldı. Alınan örnekler rehidrate edildikten sonra Proteinase K'da 20 dakika bekletilerek doku permeabilizasyonu sağlandı. Buffer uygulanması sonrası enzim uygulanarak işaretleme yapıldı ve 90 dakika 37 °C'de inkübasyon yapıldı. Sonrasında konjugate uygulanan örnekler, kromojen olarak DAB ve en son basamakta zıt boyama için Metil green ile boyandı. Boyanan örnekler ışık mikroskobu altında incelendi.

Işık mikroskobu altında incelenen örneklerde apoptotik ve p53 pozitif hücreler x20 objektif büyütmede her preparatın farklı 10 bölgesinde sayısal olarak değerlendirildi. Hücrelerin sayımı için UTHSCSA Image Tool Image Analysis Programı kullanıldı. Ancak kontrol grubunda ne apoptotik ne de p53 pozitif hücreler olmadığı için istatistiksel analiz uygulanmadı.

## IV. BULGULAR

Yedinci günde her iki gruptan da kanlar alınarak biyokimyasal analiz yapıldı. Veriler öncelikle tablo haline getirildi ve daha sonra istatistiksel analiz için Mann Whitney-U testi uygulandı.

**Tablo - II:** Biyokimyasal analiz

KONTROL	GRUBU	ÇALIŞMA	GRUBU
Rat	T.Bil/D.Bil (mg/dl)	Rat	T.Bil/D.Bil (mg/dl)
1	0.07/ <0.01	1	13.67/ 10.33
2	0.12/ 0.05	2	12.73/ 9.05
3	0.35/ 0.13	3	13.87/ 3.38
4	0.86/ 0.33	4	8.7/ 4.0
5	0.16/ 0.08	5	10.22/ 6.76
6	0.09/ <0.01	6	12.86/ 8.63
7	0.76/ 0.26	7	10.28/ 6.49
8	0.65/ 0.18	8	11.34/ 7.34
Ortalama	0.38/ 0.13	Ortalama	11.70/ 6.99

**Tablo - III:** Tanımlayıcı İstatistik

	N	Ortalama	Std.Deviasyon	Alt Değer	Üst Değer
T.Bilirubin	16	6.0456	5.99006	.07	13.87
D.Bilirubin	16	3.5644	3.90866	.01	10.33
Groups	16	1.5000	.51640	1.0 0	2.00

**Tablo - IV:** İstatistiksel Test(b)

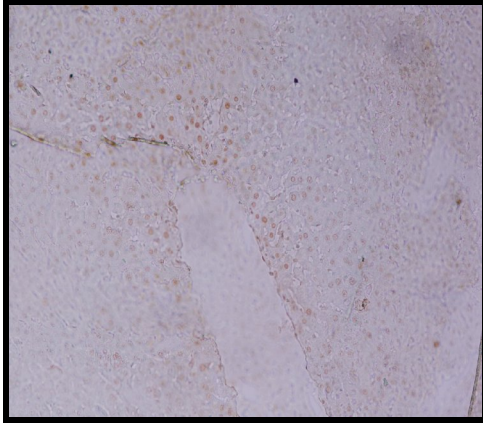
	T.Bilirubin	D.Bilirubin
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	36.000	36.000
Z	3.361	-3.363
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000(a)	.000(a)

a Not corrected for ties.

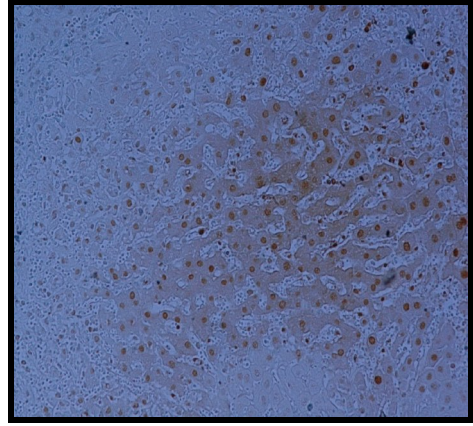
b Grouping Variable: Groups

İstatiksel analiz için SPSS for Windows 15.0 kullanıldı. Tablo-IV’de gösterildiği üzere  $P < 0.05$  istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

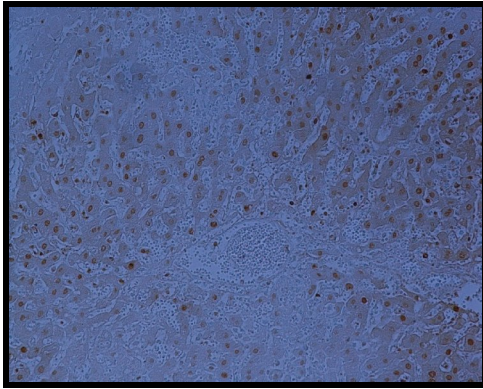
Yapılan ışık mikroskopik incelemede karaciğer hücrelerinde (hepatosit) apoptotik hücrelerin değerlendirilmesinde; apoptotik hücrelerin deney grubundaki tüm ratların karaciğer dokusunda yaygın olarak mevcut olduğu ve bazı bölgelerde yoğun birikim gösterdikleri tespit edildi (Resim:1-4).



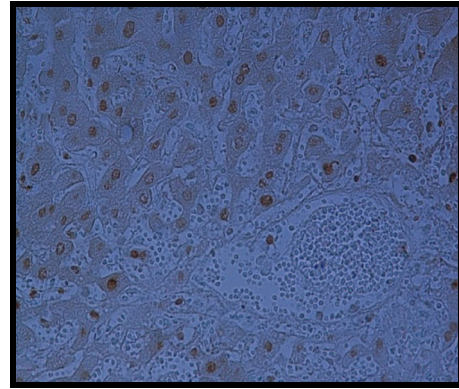
Resim:1. Deney grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde apoptotik hücrelerin (kahverengi çekirdekli) görünümü. Fragel (Calbiochem). X100.



Resim:2. Deney grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde apoptotik hücrelerin (kahverengi çekirdekli) görünümü. Fragel (Calbiochem). X200. Mavi filtre kullanılmıştır.

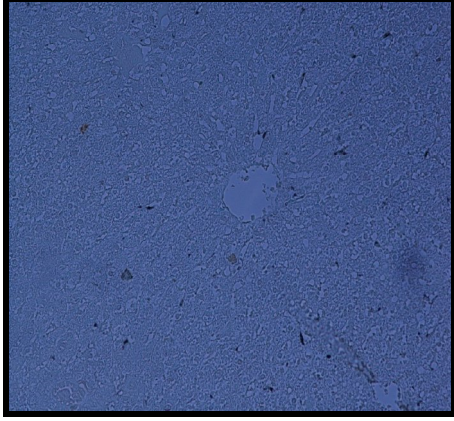


Resim:3. Deney grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde apoptotik hücrelerin (kahverengi çekirdekli) görünümü. Fragel (Calbiochem). X200. Mavi filtre kullanılmıştır.

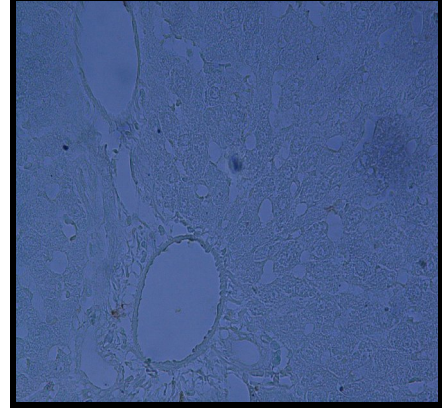


Resim:4. Deney grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde apoptotik hücrelerin (kahverengi çekirdekli) görünümü. Fragel (Calbiochem). X400. Mavi filtre kullanılmıştır.

Bununla birlikte, kontrol grubundaki ratların karaciğer dokusunda hiçbir apoptotik hücreye rastlanmadı (Resim:5-6).

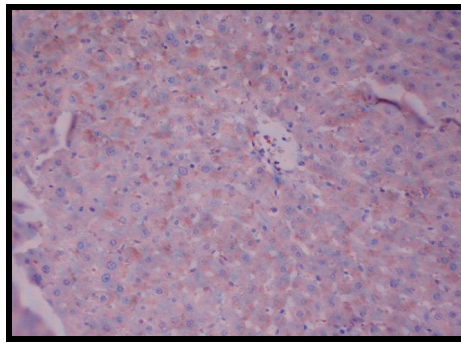


Resim:5. Kontrol grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde parankimin görünümü. Hiçbir apoptotik hücre mevcut değildir. Fragel (Calbiochem). X100. Mavi filtre kullanılmıştır.



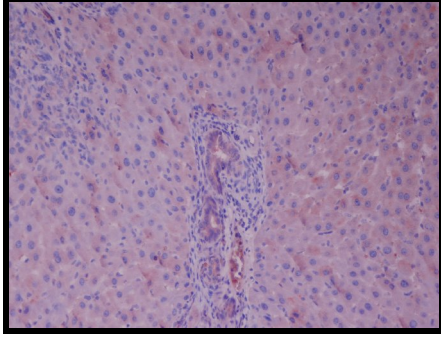
Resim:6. Kontrol grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde parankimin görünümü. Hiçbir apoptotik hücre mevcut değildir. Fragel (Calbiochem). X200. Mavi filtre kullanılmıştır.

Hepatositlerde p53 ekspresyonunun değerlendirilmesi amacıyla yapılan immunohistokimyasal değerlendirmede; p53 pozitif hepatositlerin deney grubundaki ratların karaciğerinden alınan doku örneklerinde oldukça yaygın olarak mevcut olduğu tespit edildi (Resim:7-9).

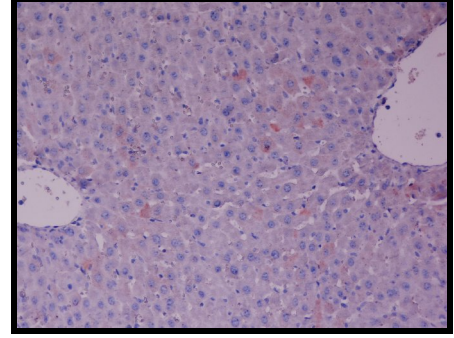


Resim:7. Deney grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde p53 pozitif hücrelerin (kırmızı sitoplazmalı) görünümü. p53 Clone DO7 (Labvision). X200.



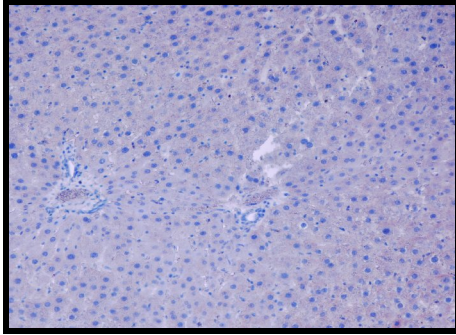


Resim:8. Deneş grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde p53 pozitif hücrelerin (kırmızı sitoplazmalı) görünümü. p53 Clone DO7 (Labvision). X200.

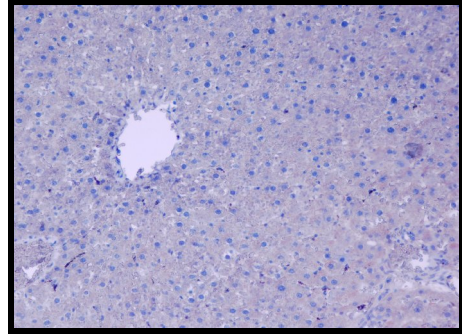


Resim:9. Deneş grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde p53 pozitif hücrelerin (kırmızı sitoplazmalı) görünümü. p53 Clone DO7 (Labvision). X200.

Ancak kontrol grubundaki ratların karaciğerlerinden alınan doku örneşlerinde hiçbir p53 ekspresyonu gösteren hücre tespit edilmedi (Resim:10-11).



Resim:10. Kontrol grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde parankimin görünümü. Hiçbir p53 pozitif hücre mevcut değildir. p53 Clone DO7 (Labvision). X200.



Resim:11. Kontrol grubundan alınan karaciğer dokusu örneğinde parankimin görünümü. Hiçbir p53 pozitif hücre mevcut değildir. p53 Clone DO7 (Labvision). X200.

## V. TARTIŞMA

Kolestazis, insan karaciğer hastalıklarının geniş yelpazesi içerisindeki bir gruptur (56). Tıkanma ikterli hastalardaki peroperatif mortalite oranları % 8-20 olarak rapor edilmektedir (57). Sarılıklı hastalarda yüksek serum bilirubin değerleri ile operatif mortalite arasında bir korelasyon bulunmaktadır (58). Biliyer obstrüksiyonun ( kolestazis, obstrüktif sarılık ) sayısız patofizyolojik durum yarattığı bilinmektedir (59). Kolestazis hepatik xenobiotic enzimlerin birçoğuna eşlik etmektedir (60,61). Bunlar arasında dikkat çekici olansa karaciğerdeki glutatyon konjigasyonundaki metabolik imbalansdır. Tıkanma ikterli vakalarda klinik semptom ve bulgular net olarak belli iken xenobiotic enzimlerin akut ve kronik hallerdeki metabolik durumu tam olarak netlik kazanmamıştır. İşte bu nedenle insandaki tıkanma ikterlerine benzer modeller ratlarda ortak hepatik kanal bağlanarak oluşturulan ekstrahepatik kolestazisli deneylerde major detoksifikasyon yolunda görev alan aromatik aminler, sülfidler ve metiltransferaz enzimatik yolları araştırılmaktadır (62,63). Bizde çalışmamızda ortak hepatik kanalı iki ayrı yerinden bağlayıp keserek tıkanma ikteri modeli oluşturduk.

Klinik gözlemimiz sonucunda hiler biliyer duktus karsinoma ya da biliyer karsinomalı sarılıklı hastalarda hepatektomi tek cerrahi rejimdir fakat cerrahi prosedürlere, artan morbidite ve mortalite eşlik etmektedir. Başlıca postoperatif komplikasyonlar; hepatik sarılık, sepsis, kanama ve renal yetmezliktir (64,65). Bu kadar geniş bir yelpazeye sahip kolestazis ve birçok komplikasyona gebe olan bu hastalık grubu cerrahlar için halen sıkıntı verici bir problem olarak durmaktadır. Tedavisi konusunda da değişik yaklaşımlar olan bu grupta biz de ratlarda tıkanma ikteri modeli oluşturarak apoptosis ve p53 ekspresyonu parametrelerini değerlendirmek istedik. Çünkü apoptosisin sepsis sürecinde çok önemli bir rol oynadığını ve tedavisinde müdahale edilebilecek bir basamak olduğunu düşünmekteyiz. Tıkanma ikterinin komplikasyonlarının biri de sepsis olduğundan bu patolojide apoptosis düzeyinin tespiti önem arz etmektedir.

Bazı çalışmalar preoperatif biliyer drenajın obstrüktif sarılıklı hastalarda mortalite ve morbiditeyi düşürdüğünü gösterirken (66,67) bazıları ise aksi yönde veriler sunmaktadır (68). Bu yayınlar ve kendi klinik deneyimlerimiz göz önüne alındığında kolestazlı hastalarda preoperatif biliyer drenajın gerekli olduğu kabul görmektedir. Tartışmalı olan ise drenajın şekliyle alakalı kısımdır. Bu konudaki görüşlere baktığımızda birçok yazar barsak içerisinde safranin bulunması endotoksemi gelişiminin önlenmesinde ve nutrisyonel halin geliştirilmesinde eksternal biliyer drenaja göre daha önemli bir yere sahiptir derken (69,70) Diamond ve Ark. gastrointestinal kaynaklı endotokseminin gelişiminin önlenmesinde esas önemli olanın biliyer dekompresyonun sağlanması olduğunu vurgulamaktadır (71). Biz de bir çok yazarın kabul ettiği gibi internal drenajın eksternal drenaja göre daha iyi sonuçlar verdiğini klinik gözlemlerimizde gördük. Ancak bir diğer değerlendirmemiz literatürde de belirtildiği gibi bilirubin değeri ile alakalı olan ve 10 mg/dl'nin üzerindeki değerlerde operatif mortalite ve morbiditenin arttığı yönündedir. Bu yüzden safranin drenajı konusunda internal yolun daha iyi olduğunu ancak preoperatif internal drenaj mümkün değil ise eksternal drenaj ile bilirubin değerinin 10mg/dl'nin altına düşürülmesi gerektiğini savunuyoruz. Bu savımızı ve klinik deneyimlerimizin öngörülerini deneysel olarak da görmek istedik. Çalışma grubumuza üçüncü bir grup ekleyerek koledokoduodenostomi ile ikter oluşturduğumuz ratları internal drenaj sonrası değerlendirmeyi planladık. Ancak koledokoduodenostomi yaptığımız hiçbir ratı yedi gün yaşatmayı başaramadık. Bu nedenle de bu grubu çalışmamıza dahil etmedik.

Hiler safra yolu karsinomu veya safra kesesi kanserli sarılıklı hastalarda hepatektomi birinci tercih edilen cerrahi yöntemdir. Göstermiştir ki hepatektomi yapılan obstrüktif sarılık oluşturulmuş ratlardaki operasyon sonrası karaciğer rejenerasyonu sham grubundakiyle benzer sonuçtadır (72). Ancak mortalite ve morbidite oranı yüksek bulunmuştur. Rejenerasyon benzer olmakla beraber bizim çalışmamızdan çıkan anlamlı derecedeki p53 ve apoptosis artışının bu mortalite ve morbiditeyi açıklayabilme ihtimali düşündürücüdür. Çünkü tıkanma ikterinde öne çıkan nekrozdan çok apoptosis sürecinin tetiklenmesi olduğuna inanmaktayız.

Foss A ve Ark. çalışması da bu görüşümüzün oluşmasında pay sahibidir. Çünkü bu çalışmada sham grubunda da çalışma grubunda da karaciğer rejenerasyon oranları benzerdir (72). Her iki grupta da rejenerasyon benzer olmasına rağmen çalışma grubundaki mortalitenin yüksek olmasının sebebi acaba tetiklenen apoptosis sürecinde gruplar arasında bir fark mı olduğu sorusudur ve bunun genetik düzeydeki bir farklılıktan mı kaynaklandığı açıklık kazanmamıştır. Bu yüzden kendi oluşturduğumuz deney modelinde p53 ekspresyonunu da inceledik.

Shuji Saiki ve Ark. Gerçekleştirdiği bir başka çalışmada ise tıkanma ikteri oluşturulan ratlarda karaciğer rejenerasyonunun restorasyonunda biliyer dekompresyonun önemi ve internal drenajın eksternal safra drenajından daha iyi bir rejenerasyon sağladığı savunulmaktadır (73). Aynı çalışmada safra drenajının karaciğer endotelial fonksiyonları üzerine etkisi Engstrom-Laurent A ve Ark. çalışmasındaki gibi hyaluronic asidin serum konsantrasyonu ve endotoksinlerin portal kandaki konsantrasyonları ile gösterilmiştir (74). Bu çalışmada karaciğer endotelial fonksiyonları değerlendirilmekte, internal biliyer drenajın önemi vurgulanmakta ama hücresel düzeyde ve genetik ekspresyon düzeyinde veri sunulmamaktadır. Biz kendi çalışmamızda biyokimyasal parametre olarak yalnız ikter oluşturduğumuzu göstermek amaçlı bilirubin değerlerini çalıştık ve karaciğerin fonksiyonel değerlendirmesini değil hücresel değişikliklerini irdeledik. Tıkanma ikteri oluşturduğumuz ratlarda postoperatif yedinci gün sonunda direkt ve indirekt bilirubin değerlerinin ortalamasını sırasıyla 6.99/11.70 mg/dl olarak bulduk. Mann – Whitney U testi ile istatistiksel olarak da bu sonuçların kontrol grubuna göre anlamlı olduğunu tespit ettik ( P=0.001).

Tıkanma ikterinde mortalite ve morbiditenin artmasından sorumlu tutulan birkaç etyolojik faktör tanımlanmaktadır; hipotansiyon, bozulmuş nutrisyonel durum, deprese olmuş immun sistem, hepatik disfonksiyon ve dolaşımda gezinen toksik safra tuzları (75–77). Örneğin son günlerdeki kanıtlar göstermektedir ki apoptotik hücreler immun fonksiyon için gerekli olan hücrelere zarar vermekte ve immunsupresyona katkıda bulunmaktadır (40). Deneysel hayvan çalışmalarında ve ciddi hastalığı bulunan hastalarda apoptosisin artışının lenfoid organlarda ve



bazı parankimal dokularda immunsupresyona neden olduğu, anerji oluşturduğu, tedaviye yanıtızsızlık oluşturarak organ sistem disfonksiyonunda temel etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Deneysel hayvan çalışmalarında lenfoid hücreleri inhibe edici tedavinin apoptosisin ilerlemesi ile sonuçlandığı gösterilmiştir (44–46).

Birçok yayın obstrüktif sarılığın sadece hepatocellüler fonksiyonları zayıflatmasını değil aynı zamanda immun sistemin bir parçası olan kupffer hücre aktivitesinde depresyon gerçekleştiğini, sonunda hepatik yapısal hasarın gelişimini ve en önemlisi portal hipertansiyon gelişimine yol açtığını vurgulamaktadır (78,79). Çalışmamızda mortalite ve morbiditeyi arttırdığı inancı olan kupffer hücre aktivitesindeki depresyonun kaynağının, ikterik halin karaciğerdeki apoptosis süreci ile olan ilintisini araştırdık. Eğer apoptosisin ne düzeyde etkilendiğini tespit edebilirsek ikter devam ederken tetiklediği bu yolda özellikle medikal bir müdahale ile bu süreç yavaşlatılıp cerraha zaman kazandırılıp kazandırılmayacağını önünü açmak istedik. Nitekim tıkanma ikteri oluşturduğumuz gruptaki tüm ratlarda apoptotik hücre sayısının ve p53 ekspresyonunun arttığını gösterdik.

Bununla birlikte sonuç olarak yara iyileşmesinin bozulması, portal ve sistemik endotoksemi gelişimi, retikuloendotelyal hücre fonksiyonlarında azalma, T hücre cevabında düşme, non-spesifik hücrel immun yanıtta depresyon, bakteriyal klirensde düşme, bakteriyal translokasyonda artma olmaktadır (80,81). Yani mortalite ve morbidite yepazesi çok geniş olmakla beraber biz sadece medikal müdahale edilebilecek bir yönünü irdeledik. Çünkü anlaşılmaktadır ki apoptosisi bloke edebilecek olan farmakolojik ajanların geliştirilmesi sepsis tedavisine rehberlik edebilecek alışılmamış tedavi yaklaşımlarını da gündeme getirebilecektir.

Hepatosit hasarı ve karaciğer hastalığının progresif ilerlemesinin temeline bakacak olursak hepatositler üzerinde toksik hidrofobik safra tuzlarının direkt kimyasal hasarı bulunduğunu savunan yayınlar karşımıza çıkar (82). Yani

obstrüktif sarılık boyunca biliyer bileşenlerin retansiyonu ve yüksek biliyer basınç hepatosellüler hasarlanmadan sorumludur denen yayınlar da mevcuttur (83).

Obstrüktif sarılık boyunca karaciğerdeki hasarlanmadan hepatositlerde birikim yapan toksik safra tuzlarının sorumlu olduğu ve anahtar bir rol oynadığı kanısı bulunmaktadır. Gerçekten de toksik safra tuzları olan kenodeoksikolik asid ve deoksikolatın hepatik seviyeleri ile karaciğer hasarının derecesi arasında bir korelasyon mevcuttur (84). Çünkü kolestatik karaciğer hastalığında yaygın bir nekroz göze çarpmamakta, hepatositlerin ölüm sürecinde kolestazisin nekrozdan çok apoptosise yol açtığı gözükmektedir (85). İşte bu yayınlarda apoptosisi öne çıkarmış ve bu hastalıkta apoptosisin kilit rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

Toksik safra tuzları hepatosit toksisitesine ve böylece apoptosise neden olduğu kabul edilirse ki; toksik hidrofobik safra tuzlarının birikimi ve retansiyonu hepatosit toksisitesi yaparak apoptosisin gelişimini tetikler diyen yayınlar da mevcuttur (86,87). Safra tuzları toksisiteye neden olduğunda tipik olarak hepatositlerde şişmeye sebep olmakta, plazma membran bütünlüğünü bozmakta ve intrasellüler bileşenlerin dağılmasına sebep olmaktadır. Safra tuzlarının etkisi ile aktive olan hepatositteki apoptotik yol ligand bağımsız Fas yolunu başlatmaktadır (87). Bizim çalışmamızda da benzer sonuç çıkmakta ve apoptosis anlamlı derecede artmaktadır. Apoptosis gelişimindeki bu safra tuzlarının yol açtığı mekanizmanın bilinmesi önemlidir. Çünkü bu bilgi sayesinde kolestatik karaciğer hastalıklarında ve postoperatif komplikasyonların azaltılmasında rasyonel stratejiler geliştirilebilecektir. Çalışmalar hepatektomi öncesi gerçekleştirilen biliyer drenajın anlamlı derecede karaciğer fonksiyonlarının yerine gelmesinde ve hepatocellüler apoptosisin azalmasında faydalı olduğunu göstermektedir. Ancak çalışmamızda tıkanma ikteri sonrası internal drenaj uygulanan gruptaki ratları yaşatamadığımız için bu grupta apoptosisin azalıp azalmadığını gösteremedik.

Tartışma, hepatocellüler apoptosisin tıkanma ikteri oluşturulmuş ratların yaşamında oynadığı roldür. Biliyer drenaj daha tercih edilebilir bir tedavi şekli

olmalıdır çünkü ratlarda karaciğer fonksiyonlarının dönmesinde ve hepatosellüler apoptosisin azalmasında anlamlı derecede etkili bir tedavi yaklaşımıdır. Biliyer dekompresyon preoperatif tedavide oldukça etkili bir yöntem olarak gözükmektedir. İşte bu yüzden tıkanma ikterinin komplikasyonlara yol açarken geçtiği süreçlerden biri apoptosistir ve tıkanma ikteri oluşturulan ratlarda karaciğerdeki apoptosisin düzeyini ve p53 ekspresyon derecesinin incelenmesinin gerekli olduğunu düşündük. Bunun için tıkanma ikteri oluşturduğumuz ratlarda apoptotik indekse ve p53 düzeyine bakarak denekleri inceledik. Bulduğumuz sonuçlar anlamlı derecede tıkanma ikterinin apoptosis ve p53 düzeyini arttırdığı yönündedir. Bu sonuçları değerlendirebilmek için apoptosisi anlamlı ve yakın iştirakli yayınları gözden geçirmeliyiz.

Çok çeşitli biyolojik sistemlerde apoptosis önemli bir oluşumdur. Kolestazis ya da zararlı safra oluşumu çok çeşitli insan karaciğer hastalıklarında meydana gelebilir. Toksik hidrofobik safra tuzlarını hepatosit içerisinde biriktirmek hepatosit toksisitesine neden olabilir ve apoptosisi tetikleyebilir. Obstrüktif sarılıklı hastalarda yüksek değerlerde bakteri translokasyonu ve endotoksinler hepatosit apoptosisini indükler. Sheen-Chen SM ve Ark. çalışması da bizim çalışmamız gibi gösterilmiştir ki tıkanma ikteri için ana hepatik kanal ligasyonu yapılan deneklerde hepatositlerdeki apoptosis ve duktal proliferasyon önemli ölçüde artmıştır (88).

Literatürde apoptosis ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Tıkanma ikterinde karaciğerde apoptosisi değerlendiren az sayıda yayın vardır. Parks ve Ark. safra yolu bağlanarak tıkanma sarılığı oluşturulmuş rat modellerinde intestinal mukozanın atrofiye uğradığı, villus dansitesinin ve kalınlığının azaldığı ve distal ileal hücrelerde apoptosis oranının arttığı deneysel olarak gösterilmiştir (89). Bunun dışında deneysel pnömoperitoneum modelinde Arıkan ve Ark. apoptosis ve p53 çalışmışlar ve çalışma sonucunda bizim çalışmamıza paralel olarak apoptosis ve p53 ekspresyonunda anlamlı derecede artış saptamışlardır (90). Apoptosis fizyolojik hücre ölümü olarak adlandırılan bir çeşit hücre ölümüdür. Bu mekanizma intraembriyonel dönemde organların gelişiminde en önemli

oluşumdur (91,92). Hücrelerin yaşam siklusu boyunca fizyolojik dengeyi güçlendirir (93). Aynı zamanda eğer hücre kimyasal ya da radyoaktif ajanlar tarafından hasar görürse ve hasar antionkojenlerle tamir edilemezse apoptotik oluşum p53, bcl2 ve kaspaz tarafından stimüle edilir ve zararlı hücreler malignite gelişimini önlemek için elenir. Normal dokularda, mesela dalakda bazı apoptotik hücreler bulunabilir. Bu koruyucu mekanizma organizma içindir ve apoptotik hücrelerin sayısının normal hücrelerin sayısına oranı apoptotik indeksi gösterir. Eğer bazı dokular strese yol açarsa apoptotik indeks artar çünkü hasarlı hücre sayısı da artar. Bu organizma için koruyucudur ama eğer apoptotik indeks azalırsa bu doku yıkımının hatta malignitenin işareti olabilir (90).

Toksik safra tuzlarının apoptosis mekanizması üzerindeki etkileri ilerleyen zamanlarda daha net aydınlanacaktır. Çünkü bu mekanizma üzerinde incelemeleri içeren çalışmalar devam etmektedir. Toksik safra asitleri direkt olarak hepatositleri yiyip bitiren apoptosise neden oluyor olabilir (94). Bizim çalışmamızda da toksik safra asitlerinin birikimi apoptosisi arttırmış olabilir. Çünkü çalışma grubumuzdaki tüm ratlarda kontrol grubunda görülmeyen apoptotik hücreleri ve sayısal artışını tespit etmiş bulunmaktayız.

Apoptosis henüz tam olarak aydınlatılamamış kompleks bir dizi sonucu gelişmektedir ve bu dizide önemli rolü olduğu bilinen sistein endoproteaz ailesinin bir üyesi olan kaspazlar ilgi çekmektedir (95). Apoptosis proteaz ailesinden olan kaspazların görev yaptığı hücre ölümündeki bir orkestra gibidir (95–98). Apoptosis Fas yolunun aktivasyonuna neden olduğu gibi aynı zamanda intrasellüler enzimler olan Caspaslarında aktivasyonunu tetiklemiş olur. Caspases sistein bileşimlerinde, aspartik asid proteaz benzeri zymoijenlerin çözünebildiği sitoplazmalarda, mitokondrial intermembran aralığında ve neredeyse nükleer matrixi bulunan tüm hücrelerde yer alır (99). Apoptotik yol üzerindeki aktivasyon caspasların (8 ve 9) diğer aktif fomlarının oluşmasına, Caspas 3'ün aktivasyonuna ve bununla da diğer caspasların ve daha bir çok çeşitli substratların aktivasyonuna neden olur (100). Safra tuzlarının indüklediği apoptosis, protein kinaz C'nin aktivasyon ve translokasyonuna neden olur ve intrasellüler magnezyum düzeyi

yükselir (101,102). Böylece Mg bağımlı endonükleazlar DNA bölünmesine neden olur. İşte bu nedenden dolayı apoptotik hücre ölümünün son günlerde birçok fizyolojik ve patofizyolojik süreçte santral bir rol oynadığı düşünülmektedir (103,104). Biz de bu süreçteki çalışmalara kendi çalışmamızda tıkanma ikterinde apoptosis artışını ve p53 ekspresyonunu göstererek tıkanma ikterinin patofizyolojisinde apoptosis ve p53'ün santral bir rolde olduğunu desteklediğimizi düşünmekteyiz.

Olgun hücre tiplerinin epitelyum doku içerisinde dağılımı hücre proliferasyonu, farklılaşması ve programlanmış hücre ölümü gibi aşamalara bağlı gerçekleşir. Bu denge epitelyal hasar oluşumuyla değişebilir ve programlanmış hücre ölümünden daha kolay etkilenen bazı hücreler doku yenilenmesine istemli katkıda bulunan diğer hücrelerle tamir edilebilir (105,106). Yani apoptosisin programlanmasında etkili olan bir diğer nokta da genetik kodlanmada saklanmaktadır. Bu yüzden araştırmamıza apoptosisle ilişkilendirilen tümör supresör geni olan p53'ü de dahil ettik. Nitekim biz de çalışmamızda kontrol grubunda p53 ekspresyonu olmazken çalışma grubunda p53 ekspresyonunun bulunduğunu gösterdik.

Birçok hücresel sistemde apoptosisin başlangıcı p53 tümör supresör geninin aktivasyonu ile olmaktadır (107). p53 hedef genlerde transaktivasyonu düzenleyen bir nükleer transkripsiyon faktörüdür ki; p21 buna dahilken, siklin bağımlı kinaz aktivitesi ve bax geni üzerinde inhibitör etki yapar, apoptosis de ise pozitif bir etkiye sahiptir (108,109). p53 genomun koruyucusu olarak adlandırılan en önemli tümör supresör genidir. Eğer DNA bazı ajanlar tarafından hasarlanırsa hücre p53 genini görevlendirir ve hasarlı DNA'yı tamir eder (110). Bununla beraber eğer DNA onarılamayacak kadar hasarlanmışsa p53 apoptosis kaskadını tetikler ve apoptosisi artırarak malign hücre oluşumunu engeller. Bird MA ve Ark. yaptıkları bir deneysel çalışmada obstrüktif sarılıkta NF kappaB'nin hepatosit proliferasyonunu düzenlerken apoptosisin artırılmasında bir etkisinin olmadığı sonucuna varmıştır (111). Biz kendi çalışmamızda tıkanma ikterinde rat karaciğerinde apoptotik hücre sayısının artmış olduğunu tespit ettik.

Z-Val-Ala-Asp (OMe)-fluoromethyl ketone (ZVAD-fmk) hücre geçirgen irreversible bir caspaz inhibitörüdür ve yeni bazı veriler bazı kaspazların oluşumunun bloka uğratılmasında bu ajanın kullanılabileceğini önermektedir (112-115). Shyr-Ming Sheen-Chen ve Ark. yaptığı bir çalışmada ratlarda oluşturulan tıkanma ikteri modellerinde ZVAD-fmk verildiğinde karaciğerde görülen apoptosisin azaldığı gösterilmiştir (116). Bizim çalışmamızdaki apoptosis artışının ZVAD-fmk verildiğinde azalıp azalmadığını göstermek için bir başka çalışma grubu oluşturulup bu gruba ZVAD-fmk verilerek apoptosis ve p53 ekspresyonu çalışılabilir. Ancak biz kontrol grubundaki ratlarda apoptosis ve p53 ekspresyonu görülmemesine karşın tıkanma ikteri oluşturulan ratlarda apoptosisin arttığını ve bunu onarmak üzere p53 gen ekspresyonunun arttığını tespit etmiş bulunmaktayız.

## VI. SONUÇ

Apoptosis araştırılması gereken ve birçok hastalık sürecinin durdurulmasına ya da iyileşmesinin hızlanmasına olanak sağlayabilecek kapalı bir kutudur. Çalışmamızda ratlarda oluşturduğumuz tıkanma ikterini, apoptosisi tetikleyen stres faktörü olarak kullandık. Böylece karaciğerde apoptosis tetiklendiğinde ortaya çıkan etkileri standard verilerle sunalım istedik. Bunun getirisi olarak az bilinen apoptosis kaskadının önüne geçebilecek düşüncelerin tartışmaya açılacağını öngördük. Belli bir stres faktörü altında karaciğerde esas etkili mekanizma apoptosis ise tedavi yaklaşımında farklılık oluşturacağı kesindir. Bu kaskadın daha da açıklık kazanması ve tedavi yaklaşımındaki değişiklikler için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu kaskadın daha da açıklık kazanması ve tedavi yaklaşımındaki değişiklikler için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Bunlar kaspaz kaskadını önlemek için verilebilecek ajanlar, henüz deney aşaması gerçekleştirilmemiş steroidler, nonsteroid antiinflatuar ajanlar ya da cox-2 enzim inhibitörleri ile yapılacak çalışmalar olarak planlanabilir. Nitekim ZVAD-fmk çalışması buna güzel bir örnektir.

Sonuç olarak verilerimiz safra kanalının tıkanması sonucu hepatositlerde hücresel bir hasarın ortaya çıktığını göstermektedir. Bununla birlikte, hepatositler bu hücresel hasarın etkisini azaltabilmek veya ortadan tamamen kaldırabilmek için kendi nükleuslarında p53 genini aktive ederek hücre siklusunu uzatmakta ve ortaya çıkmış DNA hasarını gidermeye çalışmaktadır. P53 geninin fonksiyonları gereği hücre hasarı sonucu ortaya çıkan bu etki ile ya hücredeki DNA hasarı tamamen ortadan kaldırılmakta veya hasar çok büyükse apoptotik sinyal mekanizmaları aktive edilerek hepatositler intihara zorlanmaktadır. Bu süreçte apoptotik hücre sayısının artışı vücudu koruyucu bir etki yapmaktadır. Eğer hücre apoptosisle de ölemezse o zaman DNA hasarı kalıcı olur ve hücrelerde kanserleşmeye dek uzanabilecek patolojik değişiklikler başlar ki bu da karşımıza çeşitli klinik tablolarla çıkabilir. Çalışmamızda, tıkanma ikteri oluşturduğumuz ratlarda karaciğerde hem apoptotik indeksin arttığını hem de p53 ekspresyonunun immunohistokimyasal çalışmalar sonucu artmış olduğunu tespit ettik.

## VII. ÖZET

**Amaç:** Tıkanma sarılığı, cerrahi olarak tedavi edilmesi gerekli bir hastalık grubudur. Tıkanma sarılığı bulunan hastalara uygulanan safra yolları girişimlerinin komplikasyonları nedeni ile morbidite ve mortalitesi çok yüksektir. Ana komplikasyonlar sepsis ve renal yetmezliktir.

Apoptosis, DNA bağımlı hücrelerde fizyolojik ve patolojik durumlarda meydana gelebilen yüksek düzeyli planlı bir hücre ölümü mekanizmasıdır. Birçok doku ve özellikle deri, barsak ve immun sistem hücrelerinin düzenli olarak yenilenmesi için apoptosise ihtiyaç duyarlar. Apoptosis iskemik kalp hastalığına, felce, nörodejeneratif hastalıklara, sepsis ve multi organ disfonksiyon sendromunda hakim roledir. Anlaşılmaktadır ki apoptosisi bloke edebilecek olan farmakolojik ajanların geliştirilmesi sepsis tedavisine rehberlik edebilecek alışılmamış tedavi yaklaşımlarını gündeme getirebilecektir.

Çalışmanın amacı, deneysel olarak tıkanma sarılığı oluşturulan ratlarda, tıkanma sarılığında mortalite ve morbiditeyi etkileyen septisemi sürecinde önemli bir yer tuttuğuna inanılan apoptosisin karaciğerdeki düzeyinin histolojik olarak belirlenmesidir.

**Materyal ve metod:** Bu deneysel çalışma Afyon Kocatepe Üniveristesi Tıp Fakültesi Deneysel Cerrahi ve Araştırma Bölümü laboratuvarında, Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi. Ağırlıkları 270 -320 gr arasında değişen 20 adet erkek cins wistar -albino rat ile gerçekleştirilmiştir. Denekler sekizerli iki gruba ayrıldı. Her iki grupta da koledok izole edildi ( Şekil 4 ) ve kontrol grubunda bu aşamada cerahi sonlandırılırken çalışma grubunda 4-0 ipek ile koledok iki ayrı yerinden bağlandı ve ligatürler arasından tam kat olarak kesildi. Yedinci günün sonunda deney hayvanlarının kuyruklarından kan alındı ve sonuçları istatistiksel olarak analiz edildi. Deney hayvanları histolojik inceleme için karaciğer örnekleme ve sakrifikasyon amaçlı ikinci kez postoperatif 7. günde eski insizyon üzerinden anestezisi sağlanarak opere edildi ve acı duymamalarına özen gösterildi. Deney ve Kontrol gruplarından alınan karaciğer dokusu örnekleri %10'luk nötral formaline konulmak suretiyle fikse edildi. İmmunohistokimyasal olarak p53 ekspresyonunu göstermek için



primer antikor olarak anti-p53 Clone DO-7 (Labvision, Fremont CA, USA) ve sekonder antikor olarak HRP (=Horse Radish Peroxydase) (Labvision, Fremont CA, USA) kullanıldı. Apoptosisin tespiti amacıyla alınan örnekler TUNEL metodu kullanılmak suretiyle boyandı. Işık mikroskobu altında incelenen örneklerde apoptotik ve p53 pozitif hücreler x20 objektif büyütmede her preparatın farklı 10 bölgesinde sayısal olarak değerlendirildi. Hücrelerin sayımı için UTHSCSA Image Tool Image Analysis Programı kullanıldı.

**Bulgular:** Tıkanma ikteri oluşturduğumuz ratlarda postoperatif yedinci gün sonunda direkt ve indirekt bilirubin değerlerinin ortalamasını sırasıyla 6.99/11.70 mg/dl olarak bulduk. Mann – Whitney U testi ile istatistiksel olarak da bu sonuçların kontrol grubuna göre anlamlı olduğunu tespit ettik.( P=0.001) Yapılan ışık mikroskobik incelemede karaciğer hücrelerinde (hepatosit) apoptotik hücrelerin değerlendirilmesinde; apoptotik hücrelerin deney grubundaki tüm ratların karaciğer dokusunda yaygın olarak mevcut olduğu ve bazı bölgelerde yoğun birikim gösterdikleri tespit edildi (Resim:1-4). Bununla birlikte, kontrol grubundaki ratların karaciğer dokusunda hiçbir apoptotik hücreye rastlanmadı (Resim:5-6). Hepatositlerde p53 ekspresyonunun değerlendirilmesi amacıyla yapılan immunohistokimyasal değerlendirmede; p53 pozitif hepatositlerin deney grubundaki ratların karaciğerinden alınan doku örneklerinde oldukça yaygın olarak mevcut olduğu tespit edildi (Resim:7-9). Ancak kontrol grubundaki ratların karaciğerlerinden alınan doku örneklerinde hiçbir p53 ekspresyonu gösteren hücre tespit edilmedi (Resim:10-11).

**Sonuç:** Apoptosis araştırılması gereken ve birçok hastalık sürecinin durdurulmasına ya da iyileşmenin hızlanmasına olanak sağlayabilecek kapalı bir kutudur. Belli bir stres faktörü altında karaciğerde esas etkili mekanizma apoptosis ise tedavi yaklaşımında farklılık oluşturacağı kesindir. Bu kaskadın daha da açıklık kazanması ve tedavi yaklaşımındaki değişiklikler için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. ZVAD-fmk çalışması buna güzel bir örnektir.

Sonuç olarak çalışmamızda tıkanma ikteri grubunda karaciğerde hem apoptotik indeksin arttığını hem de p53 ekspresyonunun immunohistokimyasal çalışmalar sonucu artmış olduğunu tespit ettik.

## VIII. SUMMARY

**Objective:** Obstructive jaundice is a group of diseases which must be treated surgically. Its morbidity and mortality is very high due to complications of bile ways attempts applied to patients with obstructive jaundice. Main complications are sepsis and renal failure.

Apoptosis is a high level planned cell death mechanism which can occur in DNA-dependent cells in physiologic and pathologic cases. Many tissues and specially skin, intestine and immune system cells need apoptosis for the regular renewal. Apoptosis has a governing role in ischemic heart disease, paralysis, neurodegenerative diseases, sepsis and multi-organ disfunction syndrome. It is well understood that improvement of new pharmacological agents which will be able to block apoptosis will give rise to extraordinary treatment approaches that will lead in sepsis cure.

The aim of this work is to determine the level of apoptosis, which is believed to hold an important role in septicemia process that affects mortality and morbidity in obstructive jaundice, in lingers of rats that were experimentally subjected to obstructive jaundice.

**The material and the method:** This experimental study was performed in Experimental Surgery and Research Laboratories at Faculty of Medicine of Afyon Kocatepe University, under the approval of Animal Ethics Board of Faculty of Medicine-Kocatepe University. Twenty male type wistar-albino rats of which weights ranged between 270gr. and 320gr. were used. The experimentals were separated into two groups of eight. Choledoch was isolated in each group (Figure 4) and while surgery was ended at this level in the control group, choledoch was tied with 4-0 silk from two different places and cut between ligatures full fold. At the end of the seventh day blood was taken from the tails of the experiment animals and the results were analyzed statistically. Experiment animals were operated for the second time in the post-operative seventh day for liver sampling and sacrifice-aimed histological analysis through the old incision with anaesthesia provided and care was taken to make sure that they do not feel pain. Liver tissue samples taken from the experiment and control groups were fixed by

putting them in 10% neutral formalin. To exhibit the p53 expression immunohistochemically, anti-p53 Clone DO-7 (Labvision, Fremont CA, USA) was used as the primer antibody and HRP (=Horse Radish Peroxydase) (Labvision, Fremont CA, USA) as the secondary antibody. Samples taken for the determination of apoptosis were painted by the TUNEL method. In the samples observed under the light microscope, apoptotic and p53-positive cells were evaluated numerically in 10 different regions of every preparation at x20 optics objective zoom. UTHSCSA Image Tool Image Analysis Program was used to count the cells.

**Findings:** At the end of the post-operative seventh day, the averages of direct and indirect bilirubin values in the rats in which obstructive jaundice was generated were found to be as 6.99/11.70 mg/dl, respectively. By Mann-Whitney U test, these results were observed to be statistically meaningful with respect to the control group ( $P=0.001$ ). In the evaluation of apoptotic cells in liver cells (hepatocytes), apoptotic cells were observed to widely exist in the liver tissue and it was determined that they exhibited dense accumulation in some regions (Figure 1-4). Nevertheless, no apoptotic cell was encountered in the liver tissue of the rats in the control group (Figure 5-6). In the immunohistochemical evaluation made for evaluation of p53 expression in hepatocytes, p53-positive hepatocytes were determined to exist quite widely in the tissue samples taken from the livers of rats in the experiment group (Figure 7-9). Nevertheless, no cell exhibiting p53 expression were found in the tissue samples taken from the livers of rats of the control group.

**Result:** Apoptosis is a closed box that must be investigated and which might make it possible to stop the many disease processes or accelerate the healing. If the principal effective mechanism in the liver under a certain stress factor is apoptosis, it is definite that it will make a difference in the treatment approach. There is need for new studies for the clarification of this cascade and the changes in the treatment approach. ZVAD-fmk study is a good example for this.

Consequently, in this study we determined that in the obstructive jaundice group, both apoptotic index and, as a result of the immunohistochemical studies, p53 expression increases in the liver.

## IX. KAYNAKLAR

1. Sobotta İnsan Anatomisi Atlasından değiştirilerek.
2. John L. Cameron: Liver,anatomy. Current surgery 2001;309.
3. Seymour I. Schwartz: Karaciğer. Schwartz cerrahi prensipleri el kitabı 1999;667.
4. Ratych ER, SmithWG: Anatomy and physiology of the liver.(Ed) George D. Zuidema GE : Surgery of the Alimentary Tract, Fourth Edition, Philedelphia,W.B Saunders Company 1996;357-374.
5. Januire LC, Carneo J, Long JA : Digestive Tract .Basic Histology Fifth Edition,Californiya 1996;354-379.
6. Müslümanoğlu M. Safra kesesinin selim hastalıkları: Genel cerrahi/ İ.Ü.T.F. temel ve klinik bilimler ders kitapları 2002; cilt II,sf 1177.
7. Aran Ö: Safra yolları hastalıkları. Sayek İ.(ed)Temel cerrahi 1996;cilt 2:1299.
8. Januire LC, Carneo J, Long JA : Digestive Tract .Basic Histology Fifth Edition,Californiya 1996;354-379.
9. Andreoli T, Bennett J.C, Carpenter C.J, Plum F, Smith L.H: jaundice. Cecil Essentials of medicine Türkçesi 2000; bölüm 6,324-328.
10. Dilek O.N: Karaciğer. Afyon Kocatepe Üniversitesi Klinik Tıp Kitapları Serisi 2003;cilt I:44,46,47.
11. Ding JW, Andersson R, Soltesz V, Willen R, Bengmark S: The role of bile and bile acids in bacterial translocation in obstructive jaundice in rats.Eur Surg Res 1993;25:11-19.
12. Hori Y, Ohyanagi H: Protective effect of the intravenous administration of ursodeoxycholic acid againts endotoxemia in rats with obstruct jaundice. JPN J Surg 1997;27:140-144.
13. Yoshikawa M, Tsujii T, Matsumara K, Yamao J, Matsumara Y, Kubo R: Immunomodulatory effects of ursodeoxycholic acid on immun response. Hepatology 1992;16:358-364.
14. Lacaille PK: The immunosuppressive effect of ursodeoxycholic acid: a comparative invitro study on humans. Hepatology 1993;18:165-172.

15. Tontuş O, Coşkun S, Erengül C, Pişkinpafla M. Obstrüktif sarılıklı hastalarda cerrahi morbidite ve mortaliteyi etkileyen risk faktörleri. *Klin Den Cerrahi Derg* 1993;1:228-31.
16. Yüzen Y, Öncel T, Engin S, Aldemir S, Akyıldız A. Tıkanma sarılıklarında mortalite ve morbiditeyi etkileyen faktörler. *Ulusal Cerrahi Derg* 1993;9:238-43.
17. Greig JD, Krukowski ZH, Matheson NA. Surgical morbidity and mortality in one hundred twenty-nine patient with obstructive jaundice. *Br J Surg* 1988;75:216-9.
18. Pellegrini CA, Allegra P, Bongard FS, Way LW. Risk of biliary surgery in patients with hyperbilirubinemia. *Am J Surg* 1987;154:111-117.
19. Slocum MM, Sitting KM, Specian RD, Deitch EA: Absence of intestinal bile promotes bacterial translocation. *Am Surgeon* 1992;58:305-310.
20. Çakmakçı M, Tırnaksız B, Hayran M, Belek S, Gürbüz T, Sayek I: Effects of obstructive jaundice and external biliary diversion on bacterial translocation in rats. *Eur J Surg* 1996;162:567-571.
21. Ding JW, Andersson R, Norgren L, Stenram U, Bengmark S: The influence of biliary obstruction and sepsis on Reticuloendothelial function in rats. *Eur J Surg* 1992;158:157-164.
22. Vane DW, Redlich P, Weber T, Leapman S, Siddiqui AR, Grosfeld JL: Impaired immune function in obstructive jaundice. *J Surg Res* 1988;45:287-293.
23. Ball SK, Grogan JB, Collier JB, Scott-Conner CEH. Bacterial phagocytosis in obstructive jaundice. *Am Surg* 1991;57:67-72.
24. Thompson RLE, Hoper M, Diamond T, Rowlands BJ. Development and reversibility of T lymphocyte dysfunction in experimental obstructive jaundice. *Br J Surg* 1990;77:1229-32.
25. Wilmore DW, Smith RJ, O'Dwyer ST, Jacobs DO, Ziegler TR, Wang XD: The gut : A central organ after surgical stress. *Surgery* 1988; 917-922.
26. Rogers DE: Host mechanisms which act to remove bacteria from the blood stream. *Bacteriol Rew* 1960;24:50-66.

27. Saba TM: Physiology and pathophysiology of the reticuloendothelial system. *Arch Intern Med.* 1970; 126:1031-1032.
28. Mishra JP, Singh LN: Changes in serum protease inhibitors and liver specific enzymes in experimental jaundice. *Indian J Med Sci* 1996;50: 221-227.
29. Lacaine F, Fourtanier G, Fingerhut A, Hay JM: Surgical mortality and morbidity in malignant obstructive jaundice: a prospective multivariate analysis. *Eur J Surg* 1995;161:729-34.
30. Sitzmann JV, Grene PS: perioperative predictors of morbidity following hepatic resection for neoplasm. A multivariate analysis of a single surgeon experience with 105 patients. *Ann Surg* 1994;219:13-7.
31. Kimmings AN, van Deventer SJ, Obertop H, Rauws EA, Gouma DJ: Inflammatory and immunologic effects of obstructive jaundice: pathogenesis and treatment. *J Am Coll Surg* 1995;181:567-81.
32. Papakostas C, Bezirtzoglou E, Pitiakoudis M, Polychronidis A, Simopoulos C: Endotoxemia in the portal and the systemic circulation in obstructive jaundice. *Clin Exp Med* 2003;3:124-8.
33. Scott-Conner CE, Grogan JB: The pathophysiology of biliary obstruction and its effect on phagocytic and immune function. *J Surg Res* 1994;57:316-36.
34. Bemelmans MH, Gouma DJ, Greve JW, Burman WA: Cytokines tumor necrosis factor and interleukin-6 in experimental biliary obstruction in mice. *Hepatology* 1992;15:1132-1136.
35. Thompson RL, Hoper M, Diamond T, Rowlands BJ: Development and reversibility of T lymphocyte dysfunction in experimental obstructive jaundice. *Br J Surg* 1990;77:1229-1232.
36. Akiyama T, Hasegawa T, Sejima T, Sahara H. Serum and bile interleukin 6 after percutaneous transhepatic cholangio-drainage. *Hepatogastroenterology* 1998;45:665-671.
37. Diamond T, Rowlands BJ: Endotoxaemia in obstructive jaundice. *HPB Surg* 1991;4:81-94.

38. Tomioka M, Iinuma H, Okinaga K: Impaired Kupffer cell function and effect of immunotherapy in obstructive jaundice. *J Surg Res* 2000;92:276-82.
39. Wyllie AH: Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neo-plastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev* 1992;11:95-103.
40. Sun EW, Shi YF: Apoptosis: the quiet death silences the immune system. *Pharmacol Ther* 2001;92:135-45.
41. Hengartner MO: The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-6.
42. Gren DR: Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 2000;102:1-4.
43. Baumann S, Krueger A, Kirchhoff S, Krammer PH: Regulation of T cell apoptosis during the immune response. *Curr Mol Med.* 2002;2:257-272.
44. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Karl IE: Role of apoptotic cell death in sepsis. *Scand J Infect Dis* 2003;35:585-592.
45. Mahidhara R, Billiar TR: Apoptosis in sepsis. *Crit Care Med* 2000;28:105-113.
46. Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL: Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J* 2001;15:879-92.
47. Gottlieb TM, Oren M. P53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta* 1996;1287:77-102.
48. Donehower LA. Effects of p53 mutation on tumor progression: Recent insights from mouse tumor models *Biochim Biophys Acta* 1996;1242:171-176.
49. Sherr CJ. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev* 1998; 12: 2984-2991.
50. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell.* 1998;92:725-734.
51. Sherr CJ, Weber JD. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev.* 2000;10:94-99.
52. Ding, HF, and Fisher DE. Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Crit Rev Oncog* 1998;9:83-98.

53. Chang F, Syrjanen S, Kurvinen K. The p53 Tumor Suppressor Gene as a Common Cellular Target in Human Carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1993;88:174-86.
54. Bénard J, Douch-Rasy S, Ahomadegbe JC. TP53 Family Members and Human Cancers. *Hum Mutat* 2003;21:182-91.
55. Iacopetta B. TP53 Mutation in Colorectal Cancer. *Hum Mutat* 2003; 21:271-276.
56. Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med* 1998;339:1217-1227.
57. Friedman LS. The risk of surgery in patients with liver disease. *Hepatology* 1999;29:1617-1623.
58. Dixon JM, Armstrong CP, Duffy SW, Davies GC. Factors affecting morbidity and mortality after surgery for obstructive jaundice: a review of 373 patients. *Gut* 1983;24:845-852.
59. Moritz, M. and Snodgrass, P. J. Serum enzymes derived from liver cell fractions. Responses to bile duct ligation in the rats. *Gastroenterology* 1972;62:93-100.
60. Ihm, J. S. and Kim, Y. H. Thiosulfate sulfurtransferase and UDP-glucuronosyltransferase activities in cholestatic rat liver induced by common bile duct ligation. *Korean J. Biochem. (presently Exp. Mol. Med.)* 1997;29:197-201.
61. Kim, Y. J. and Kim, Y. H. Benzoyltransferase and phenylacetyltransferase activities in cholestatic rat liver induced by common bile duct ligation. *J. Biochem. Mol. Biol.* 1999;32:67-71.
62. You Hee Kim<sup>1,2</sup> and Il Joo<sup>1</sup> Arylamine N-methyltransferase and thiol methyltransferase activities in cholestatic rat liver induced by common bile duct ligation *experimental and molecular medicine* 2001;33,1:23-28.
63. De-Sheng Wang, Ke-Feng Dou, Kai-Zong Li, Zhi-Qing Gao, Zhen-Shun Song, Zheng-Cai Liu Hepatocellular apoptosis after hepatectomy in obstructive jaundice in rats *World J Gastroenterol* 2003;9:2737-2741.
64. Su CH, Tsay SH, Wu CC, Shyr YM, King KL, Lee CH, Lui WY, Liu TJ, P'eng FK. Factors influencing postoperative morbidity, mortality, and



- survival after resection for hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 1996;223:384-394.
65. Qin LX, Tang ZY. Hepatocellular carcinoma with obstructive jaundice: diagnosis, treatment and prognosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:385-391.
  66. Smith RC, Pooley M, George CR, Faithful GR. Preoperative percutaneous transhepatic internal drainage in obstructive jaundice: a randomized, controlled trial examining renal function. *Surgery* 1985;97:641-648.
  67. Denning DA, Ellison EC, Carey LC. Preoperative percutaneous transhepatic biliary decompression lowers operative morbidity in patients with obstructive jaundice. *Am J Surg* 1981;141:61-65.
  68. Pitt HA, Gomes AS, Lois JF. Does preoperative percutaneous biliary drainage reduce operative risk or increase hospital cost? *Ann Surg* 1985;201:545-553.
  69. Gouma DJ, Coelho JC, Fisher JD. Endotoxemia after relief of biliary obstruction by internal and external drainage in rats. *Am J Surg* 1986;151:476-479.
  70. Aronson DC, Chamuleau RA, Frederiks WM. The effect of extrahepatic cholestasis on liver regeneration after partial hepatectomy in the rat. *Liver* 1995;15:242-246.
  71. Diamond T, Dolan S, Thompson RL, Rowlands BJ. Development and reversal of endotoxemia and endotoxin-related death in obstructive jaundice. *Surgery* 1990;108:370-375.
  72. Foss A, Andersson R, Ding JW. Effect of bile obstruction on liver regeneration following major hepatectomy: an experimental study in the rat. *Eur Surg Res* 1995;27:127-133.
  73. Shuji Saiki, MD, Kazuo Chijiwa, MD, FACS, Mikio Komura, MD, Koji Yamaguchi, MD, Syoji Kuroki, MD, and Masao Tanaka, MD. Preoperative Internal Biliary Drainage Is Superior to External Biliary Drainage in Liver Regeneration and Function After Hepatectomy in Obstructive Jaundiced Rats *annals of surgery* 1999;230,5:655-662.

74. Engstrom-Laurent A, Loof L, Nyberg A, Schroder T. Increased serum levels of hyaluronate in liver disease. *Hepatology* 1985;5:638-642.
75. Greve JW, Gouma DJ, Soeters PB, Buurman WA. Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins: a study with germ-free rats. *Gastroenterology* 1990;98:478-485.
76. Ito Y, Machen NW, Urbaschek R, McCuskey RS. Biliary obstruction exacerbates the hepatic microvascular inflammatory response to endotoxin. *Shock* 2000;14:599-604.
77. Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumpricht E, Sokol RJ. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 2001;33:616-626.
78. Daglar GO, Kama NA, Atli M, Yuksek YN, Reis E, Doganay M, Dolapci M, Kologlu M. Effect of 5-lipoxygenase inhibition on Kupffer cell clearance capacity in obstructive jaundiced rats. *J Surg Res* 2001;96:158-162.
79. Zimmermann H, Reichen J, Zimmermann A, Sagesser H, Thenisch B, Hoflin F. Reversibility of secondary biliary fibrosis by biliodigestive anastomosis in the rat. *Gastroenterology* 1992;103:579-589.
80. Kimmings AN, van Deventer SJ, Obertop H, Rauws EA, Huibregtse K, Gouma DJ. Endotoxin, cytokines, and endotoxin binding proteins in obstructive jaundice and after preoperative biliary drainage. *Gut* 2000;46:725-731.
81. Megison SM, Dunn CW, Horton JW, Chao H. Effects of relief of biliary obstruction on mononuclear phagocyte system function and cell mediated immunity. *Br J Surg* 1991;78:568-571.
82. Rodrigues CM, Steer CJ. Mitochondrial membrane perturbations in cholestasis. *J Hepatol* 2000;32:135-141.
83. Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular regulation of hepatocellular transport systems in cholestasis. *J Hepatol* 1999;31:165-178.
84. Schmucker DL, Ohta M, Kanai S, Sato Y, Kitani K. Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events. *Hepatology* 1990;12:1216-1221.

85. Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 1995; 21:1725-1741.
86. Benz C, Angermuller S, Tox U, Kloters-Plachky P, Riedel HD, Sauer P, Stremmel W, Stiehl A. Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile-acid-induced apoptosis and cytolysis in rat hepatocytes. *J Hepatol* 1998;28:99-106.
87. Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest* 1999;103:137-145.
88. Sheen-Chen SM, Hung KS, Ho HT, Chen WJ, Eng HL. Effect of glutamine and bile acid on hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the rat. *World J Surg* 2004;28:457-460.
89. Parks RW, Stuart Cameron CH, Gannon CD, Pope C. Changes in gastrointestinal morphology associated with obstructive jaundice. *J Pathol* 2000;192:526-532.
90. Yüksel Arikan & Murat Tosun & Volkan Şaykol & Serpil Kalkan & Serpil Erdem, p53 expression and apoptosis in liver and spleen during CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum, *Langenbecks Arch Surg* DOI 2007;10.1007/s00423-007-0254-6.
91. Tosun M, Kalkan S İntrauterin Dönemde Apoptosis'in Önemi. *Sendrom* 2002;14:95-104.
92. Helal MA, Mehmet H, Thomas NSB, Cox PM, Ralph DJ, Bajoria R, Chatterjee R Ontogeny of human fetal testicular apoptosis during first, second, and third trimesters of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1189-1193.
93. Tosun M, Kalkan S Apoptosis ve Önemi. *Sendrom* 2002;14:120-126.
94. Takikawa Y, Miyoshi H, Rust C, Roberts P, Siegel R, Mandal PK, Millikan RE, Gores GJ. The bile acid-activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway inhibits fas apoptosis upstream of bid in rodent hepatocytes. *Gastroenterology* 2001;120:1810-1817.
95. Behrns KE, Schrum LW, Que FG. Apoptosis: cell death by proteolytic scalpel. *Surgery* 1999;126:463-468.

96. Salvesen GS, Dixit V. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997;91:443-446.
97. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391:43-50.
98. Los M, Van de Craen M, Penning LC, Schenk H, Westendorp M, Baeuerle PA, Droge W, Krammer PH, Fiers W, Schulze-Osthoff K. Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis. *Nature* 1995; 375:81-83.
99. Hatano E, Bennett BL, Manning AM, Qian T, Lemasters JJ, Brenner DA. NF-kappaB stimulates inducible nitric oxide synthase to protect mouse hepatocytes from TNF-alpha- and Fas-mediated apoptosis. *Gastroenterology* 2001;120:1251-1262.
100. Cong B, Li SJ, Yao YX, Zhu GJ, Ling YL. Effect of cholecystinin octapeptide on tumor necrosis factor alpha transcription and nuclear factor-kappaB activity induced by lipopolysaccharide in rat pulmonary interstitial macrophages. *World J Gastroenterol* 2002;8:718-23.
101. Liu XJ, Yang L, Wu HB, Qiang O, Huang MH, Wang YP. Apoptosis of rat hepatic stellate cells induced by anti-focal adhesion kinase antibody. *World J Gastroenterol* 2002;8:734-738.
102. Jones BA, Rao YP, Stravitz RT, Gores GJ. Bile salt-induced apoptosis of hepatocytes involves activation of protein kinase C. *Am J Physiol* 1997;272:G1109-G1115.
103. Hurler JM. Cell death in developing systems. *Methods Archiv Exp Pathol* 1988;13:55-86.
104. Mac Donald HR, Lees RK. Programmed cell death of autoreactive thymocytes. *Nature* 1990;343:642-644.
105. Fuchs E and Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 2000;100:143-155.
106. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000;100:157-168.

107. Liying Yang and Steven D. Leach Charles R. Scoggins, Ingrid M. Meszoely, Michihiko Wada, Anna L. Means, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* p53-Dependent acinar cell apoptosis triggers epithelial proliferation in duct-ligated murine pancreas 2000;279:827-836.
108. El-Deiry WS. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* 1998;8:345-357.
109. Miyashita T and Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of human bax gene. *Cell* 1995;80:293-299.
110. Levine AJ p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-331.
111. Bird MA, Black D, Lange PA, Samson CM, Hayden M, Behrs KE, NFkappaB inhibition decreases hepatocyte proliferation but does not alter apoptosis in obstructive jaundice. *J Surg Res*, 2003;114:110-117.
112. Cohen GM. Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16.
113. Piguet PF, Vesin C, Donati Y, Barazzone C. TNF-induced enterocyte apoptosis and detachment in mice: induction of caspases and prevention by a caspase inhibitor, ZVAD-fmk. *Lab Invest* 1999;79:495-500.
114. Farber A, Connors JP, Friedlander RM, Wagner RJ, Powell RJ, Cronenwett JL. A specific inhibitor of apoptosis decreases tissue injury after intestinal ischemia-reperfusion in mice. *J Vasc Surg* 1999;30:752-760.
115. Daemen MA, van 't Veer C, Denecker G, Heemskerk VH, Wolfs TG, Clauss M, Vandenabeele P, Buurman WA. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J Clin Invest* 1999;104:541-921.
116. Shyr-Ming Sheen-Chen, Hsin-Tsung Ho, Wei-Jen Chen, Hock-Liew Eng Effect of ZVAD-fmk on hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in rat *World J Gastroenterol* 2005;11:2330-2333.