

**T.C**  
**FATİH ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**Anabilim Dalı Başkanı: Prof. Dr. Cansel TÜRKAY**

**DENEYSEL KARACİĞER FİBROZİSİ OLUŞTURULAN**  
**RATLARDA ROZİGLİTAZONUN ANTİFİBROTİK**  
**VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Arif KAYA**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Prof. Dr. Cansel TÜRKAY**

**Ankara – 2007**

## TEŞEKKÜR

Herőeyden önce tüm ihtisas süremiz boyunca bizlere büyük emek veren ve haklarını hiçbir zaman deyemeyeceğimiz başta tez hocam Prof. Dr. Cansel Türkay olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Ali KoŐar, Doç. Dr. Osman Kaftan, Doç. Dr. Ali Akçay, Yrd. Doç. Dr. Feridun Karakurt, Prof. Dr. Zeki Yıldırım, Doç. Dr. Duygu zol, Yrd. Doç. Dr. Aydın Karanfil ve Prof. Dr. YaŐar Karaaslan'a teşekkür ederim.

ÇalıŐmamda bana göstermiŐ oldukları kolaylıklar nedeniyle dolayı hastane idaresine teşekkür ederim.

YapmıŐ oldukları teknik yardımlardan dolayı patoloji ve biyokimya laboratuvar çalışanlarına, Prof. Dr. Olcay Kandemir' e ve Yrd. Doç. Dr. Efkana Uz' a teşekkür ederim

Yıllar boyunca beraber çalıştığımız, dertlerimizi ve mutluluklarımız paylaŐtıėımız asistan arkadaşlarıma en samimi Őükranlarımı sunarım.

Son olarak verdikleri moral desteği için çok sevgili eŐime, canım oğluma ve aileme en derin sevgilerimi ve teŐekkürlerimi sunarım.

**Dr. Arif KAYA**  
Kasım 2007, Ankara

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

|   |     |
|---|-----|
| Teşekkür .....  | ii  |
| İçindekiler .....   | iii |
| Kısaltmalar .....   | iv  |
| I. Giriş ve Amaç .....  | 1   |
| II. Genel Bilgiler .....  | 3   |
| II.1. Karaciğerin Anatomisi ve Histolojisi .....                  | 3   |
| II.2. Karaciğerin Fonksiyonları .....                             | 4   |
| II.3. Karaciğerin Hasara Karşı Yanıtı .....                       | 5   |
| II.4. Serbest Radikal Hasarı .....                                | 8   |
| II.5. Antioksidan Savunma Sistemleri .....                        | 9   |
| II.6. Karbontetraklorür Toksisitesi .....                         | 10  |
| II.7. Karaciğer Fibrozisi .....                                   | 11  |
| II.8. Roziglitazon .....  | 30  |
| III. Gereç ve Yöntem .....  | 32  |
| III.1. Deney Hayvanları ve Deney Protokolü .....                  | 32  |
| III.2. Kan ve Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Çalışılması ..... | 32  |
| III.3. İstatiksel Analiz .....                                    | 35  |
| IV. Bulgular .....  | 37  |
| V. Tartışma .....   | 46  |
| VI. Özet .....  | 54  |
| VII. Abstract .....   | 56  |
| VIII. Kaynaklar .....   | 58  |

## KISALTMALAR

|      |   |
|------|---|
| HSH  | : Hepatik stellat hücre                       |
| ECM  | : Ekstrasellüler matriks                      |
| HF   | : Hepatik fibrozis                            |
| PPAR | : Peroxisome proliferator-activated receptors |
| TZD  | : Tiazolidinedion                             |
| PGZ  | : Pioglitazon                                 |
| RZG  | : Roziglitazon                                |
| TGF  | : Transforme edici büyüme faktörü             |
| TNF  | : tümör nekrozis faktör                       |
| PDGF | : Trombosit kaynaklı büyüme faktörü           |
| ROS  | : Reaktif oksijen türevleri                   |
| MDA  | : Malondialdehit                              |
| SOD  | : Süperoksit dismutaz                         |
| CAT  | : Katalaz                                     |
| HYP  | : Hidroksiprolin                              |
| MMP  | : Matriks metalloproteinaz                    |
| TIMP | : Doku metalloproteinaz inhibitörü            |
| ALT  | : Alanin amino transferaz                     |

## I. GİRİŞ ve AMAÇ

Karaciğer fibrozisi etyolojisi farklı olan birçok hastalığın ortak sürecidir. Sıklıkları açısından bölgeler arası farklılıklar olmakla birlikte bu hastalıklar kronik viral hepatitler, non-alkolik steatohepatit, alkol ve diğer toksinler, otoimmün hepatitler, metabolik hastalıklar ve parazit enfestasyonlarıdır (1).

Altta yatan hastalık ne olursa olsun, karaciğerde inflamasyonun ilerlemesi ile fibriler kollajenden -özellikle tip I kollajen – zengin ekstrasellüler matriksin birikimi nedeniyle fibrozis oluşmaktadır. Fibrotik sürecin sonunda siroz diye adlandırdığımız durum ortaya çıkmaktadır (2). Karaciğer, kontrakte olup küçülmekte, şekli bozulmakta, sertleşmekte, beyazlaşmakta, fonksiyonlarını kaybetmekte ve büyük bir skar dokusuna benzer hale gelmektedir. Sirotik sürece bağlı olarak, klinikte hastalar karaciğer yetmezliği, portal hipertansiyon veya karaciğer kanseri ile ilgili bulgular ile karşımıza gelebilmektedir (3).

Karaciğer hastalığı ve buna bağlı komplikasyonlar, giderek artan bir sıklıkta en önemli mortalite ve morbidite sebeplerinden biri haline gelmiştir. Günümüzde sirotik bir karaciğer için tek etkili tedavi yöntemi karaciğer transplantasyonudur (4). Ancak transplantasyon işleminin güçlükleri ve komplikasyonları anti-fibrotik tedavi arayışlarını teşvik etmektedir. Son birkaç dekat içinde fibrozis mekanizmasını anlamaya ve bu mekanizmalar üzerine etkili ajanlar bulmaya yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar neticesinde fibrozis progresyonunu engelleyen çeşitli terapötik ajanlar tespit edilebilmiştir. Buna ilave olarak bilinenin aksine ilerlemiş fibrozisin kısmen de olsa geri dönüşlü olabileceği gösterilmiştir (3,5). Diğer

tarafından fibrozis oluşumunu veya ilerlemesini önlemeye yönelik arayışlar da hızla devam etmektedir.

Yakın zamanda PPAR reseptörlerinin (peroxisome proliferator-activated receptors) fibrozis mekanizmasında anahtar role sahip olduğu bilinen hepatik stellat hücrelerin (HSH) aktivasyonunda rolleri olduğu gösterilmiştir (6-8). PPAR- $\gamma$  reseptörlerine bağlanarak etki gösteren tiazolidinedion (TZD) grubu bir antidiyabetik ilaç olan pioglitazonun (PGZ) fibrozis progresyonunu azalttığı ile ilgili çalışmalar yayınlanmıştır (9-12). Geçen yıllarda yapılan bir çalışmada TZD grubunun diğer üyesi olan rosiglitazon (RZG) isimli ilacın hepatik stellat hücre (HSH) aktivasyonunu engelleyerek kollajen sentezini inhibe ettiği bildirilmiştir. Yine bu çalışmada HSH'lerin PPAR gama reseptörü taşıdığı ve aktive HSH'lerde ise bu reseptörlerin azaldığı belirtilmiştir (9).

Vücudun antioksidan sistemi oksijen radikallerinin zararsızlaştırılmasında yeterli olamazsa bu toksik metabolitlerin zararlı etkileri ile karşılaşılabilir. Hepatik fibrozis gelişiminde oksijen radikallerinin rolü iyi bilinmektedir (13). Şimdiye kadar yapılmış bazı deneysel çalışmalarda, RZG' un karaciğer harici dokularda oksidatif stres ile ilgili inflamasyonda, antioksidan özellikler sergilediği gösterilmiştir (14,15). Bu noktadan hareketle RZG antifibrotik etki mekanizmasında antioksidan özelliğinin bir katkısının olabileceği düşünülebilir. Çünkü karaciğer fibrozisi mekanizmasının merkezinde yer alan HSH' lerin aktivasyonunda reaktif oksijen türevlerinin (ROS) önemli bir yeri vardır.

Biz bu çalışmamızda RZG'un hepatik fibrozis üzerine etkilerini incelemeyi ve bu etkilerinde antioksidan özelliğinin katkısının olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

## **II. GENEL BİLGİLER**

### **II.1. Karaciğerin Anatomisi ve Histolojisi**

Karaciğer, deriden sonra vücudun en büyük organı ve en büyük bezidir. Ağırlığı yaklaşık 1,5-2 kg'dır. Vücudun sağında, diyaframın altında abdominal boşlukta yerleşmiştir. Sağ ve sol olmak üzere iki lobtan oluşan karaciğer hepatik arterden ve portal venden kanlanır. Karaciğere gelen kanın %70-80'i portal venden, %20-30'u hepatik arterden gelir. Tüm ince barsaklar boyunca emilen maddelerin çoğu portal ven yoluyla karaciğere ulaşır, şilomikronlar ise lenfatikler ile gelir. Karaciğer ince bir bağ dokusu kapsülü (Glisson kapsülü) ile örtülüdür. Hilus portal ven ve hepatik arterin giriş, sağ ve sol hepatik kanallar ve lenfatiklerin çıkış yeridir (16).

Karaciğer parankimini oluşturan hepatositler 1-2 nükleolusu ve 1-2 nükleusu olan, polihedral hücrelerdir. Hepatositler, mikroskopta karaciğer lobulu olarak isimlendirilen poligonal, 0.7x2 mm boyutlarında gruplaşmış yapısal birimler halinde görülebilir. Lobuller, portal alan denilen ve lobullerin köşelerinde bulunan bazı bölgelerde safra kanalları, lenfatikler, sinirler ve kan damarları içeren bağ dokusuyla sınırlanmıştır. Her lobulde 3-6 portal triad, portal triadların da herbirinde portal venden gelen bir venül, hepatik arterden gelen bir arteriol, bir safra kanalı ve lenfatik damarlar bulunur. Hepatositler karaciğer lobülü içinde bir-iki hücre kalınlığında tabakalar oluşturacak şekilde lobulün periferinden merkezine doğru ışınsal olarak dizilmişlerdir. Bu hücre dizeleri arasındaki boşluklarda bulunan

kapillerlere karaciğer sinuzoidleri denir. Sinuzoidler, fenestralı endotelyal hücre tabakasından oluşan düzensiz olarak genişlemiş damarsal yapılardır. Endotelyal hücreler hepatositlerden Disse aralığı adı verilen subendotelyal bir boşlukla ayrılırlar. Sinüzoidlerde endotelyal hücrelerin lümene bakan yüzeyinde Kupffer hücreleri adı verilen makrofajlar bulunur (16).

## **II.2. Karaciğerin Fonksiyonları**

Karaciğer, gastrointestinal sistemden emilen besinlerin metabolize edildiği ve depolandığı organdır. Karaciğer kendisi için gerekli proteinlere ek olarak çeşitli plazma proteinlerini (albumin, protrombin, fibrinojen ve lipoproteinler) sentezler. Bu proteinlerin sentezi granüllü endoplazmik retiküluma bağlı poliribozomlarda yapılır. Karaciğerin büyük bir fonksiyonel rezervi ve rejenerasyon kapasitesi vardır ve fulminan hepatik hastalıklar dışında bütün hastalıklarda rejenerasyon gerçekleşebilir. Rejenerasyon sayesinde karaciğer hacmi bir-iki hafta içinde yenilenir. Eğer bağ dokusu çatısı sağlam kalmışsa masif hepatosellüler nekroz meydana oluştursa bile karaciğer tam veya tama yakın olarak iyileşebilir (17).

Büyük kısmı kan hücrelerinin ve bileşenlerinin metabolizması sonucu oluşan safranın, safra kanalikülleri içine salgılanması ise karaciğerin ekzokrin fonksiyonudur. Safra su, çeşitli elektrolitler, asitleri, fosfolipidler, kolesterol ve bilirubinden oluşur. Safra asitleri, gastrointestinal kanaldaki lipidlerin absorpsiyonunu kolaylaştırmak için lipidleri emülsiyon haline getirmede önemli bir fonksiyona sahiptir (17).



Lipidler ve karbonhidratlar, vücudun öğünler arasındaki enerji gereksinimini karşılamak üzere trigliserit ve glikojen halinde karaciğerde depolanır. Karaciğer vitaminler için büyük bir depo görevi görür. Bunlara ilaveten, karaciğerde lipidler ve aminoasitlerden glukoneogenez adı verilen glikoz sentezi yapılmaktadır. Ayrıca üre de aminoasitlerin deaminasyonu sonucu karaciğerde üretilmektedir. Çeşitli ilaçlar ve maddeler hepatositlerin granülsüz endoplazmik retikulumunda oksidasyon, metilasyon ve konjugasyonla metabolize edilebilir. Glukuronil transferaz, glukuronik asidin bilirubine bağlanması haricinde steroidler, barbitüratlar ve antikonvülzanlar gibi çeşitli ilaçların konjugasyonuna ve bu yolla atılmasına yardımcı olur (17).

### **II.3. Karaciğerin Hasara Karşı Yanıtı**

Karaciğer çeşitli mikrobiyolojik, toksik, metabolik, neoplastik hastalıklar ile dolaşım bozukluklarından zarar görebilir. Karaciğerin depo özelliği nedeniyle, karaciğer bozukluklarının kliniğe yansması bir süre belirgin olmayabilir. Bununla birlikte hasarın kronikleştiği durumlarda karaciğer parankiminin ilerleyici kaybı ve safra akışının çeşitli sebeplerle engellenmesi sonucu karaciğer fonksiyonları ciddi derecede azalabilir. Karaciğerin hasar verici nitelikteki olaylara karşı, nedene bakılmaksızın, beş adet genel cevap şekli vardır (17):

- a) İnflamasyon
- b) Dejenerasyon
- c) Nekroz
- d) Fibrozis
- e) Siroz

Akut veya kronik olaylarda, inflamatuvar hücrelerin karaciğere gelmesi ile ilişkili hepatosit hasarı ile birlikte olan inflamasyon varlığına hepatit denir. İnflamasyonu hepatosit nekrozu veya apoptozisi izleyebilir veya inflamasyona sebep olan durumun düzelmesi ile iyileşme olabilir. İnflamasyon lökositlerin parankime giriş bölgesi olan portal alanda sınırlı olabileceği gibi tüm parankime de yayılabilir (17).

Karaciğer hasarının diğer bir tipi de ödem veya yağ ve diğer maddelerin hepatosit sitoplazmalarında birikmesi sonucu oluşan balonlaşma veya şişme dejenerasyonudur. Bakır, demir, safra materyali gibi bazı maddeler hepatosit sitoplazmasında birikebilir. Lipitlerin hepatosit sitoplazması içinde birikmesine steatoz denir. Nükleusun yerini değiştirmeyen çok sayıda küçük yağ damlacığının varlığına mikroveziküler steatoz denilir. Alkolik karaciğer hastalığı, Reye sendromu ve gebeliğin akut yağlı karaciğeri gibi bazı durumlarda görülür. Nükleusun yerini değiştiren tek büyük yağ damlacığının varlığına ise makroveziküler steatoz adı verilir. Makroveziküler steatoz ise alkolik karaciğer hastalığında, diabette ve obezite varlığında görülebilir (17).

Karaciğerde hasara yol açan herhangi bir olay hepatosit nekrozuna yol açabilir. İskemik nekrozda, soluk boyanan mumyalaşmış hepatositler gözlenir (koagülasyon nekrozu). Toksik veya immünolojik nedenlerle meydana gelen ve hepatositlerin apoptozise gitmeleri sonucu oluşan nekrozda, izole hepatositler, büzülmüş piknotik koyu eozinofilik 'Councilman cisimcikleri' şeklini alırlar. Eğer hepatositler ozmotik etkiyle şişip parçalanırsa buna litik nekroz adı verilir. Nekroz genellikle bölgesel bir yayılım gösterir. Bu durum santral venin hemen çevresindeki hepatositlerin nekrozunda oldukça belirgindir (sentrilobüler nekroz). Bu tip nekrozda inflamasyon

bulgusu yoksa iskemi, ilaçlar ve toksik ajanların yol açtığı hasar düşünülmelidir. Hepatosit nekrozu, hepatik lobüller içinde tek tek hücrelerde görülebilir (odaksal nekroz), ya da periportal parankim ile inflamasyonlu portal bölgeler arasında izlenebilir (güve yeniği nekrozu). Daha ağır iltihabi hasar olursa; hepatosit gruplarının nekrozu, birbirlerine komşu lobülleri, portal-portal, portal-santral veya santral-santral bağlantılar ile birleştirebilir (köprüleşme nekrozu). Tüm lobülün nekrozu (submasif nekroz) ya da karaciğerin büyük bir kısmının nekrozu da (masif nekroz) gözlenebilir. Yaygın kandida veya bakteri enfeksiyonu, hatta makroskopik apseler de meydana gelebilir (17).

Kronikleşen inflamasyonun veya toksik hasara yanıt olarak fibrotik doku birikimi olabilir. Başlangıç döneminde fibrozis portal bölgenin içinde, çevresinde veya santral venler çevresinde gelişebilir veya sinüzoidler içinde depolanabilir. Zamanla fibröz bandlar karaciğerin çeşitli bölgelerini birleştirir (porto-portal, porto-santral, santro-santral) ve bu olaya köprüleşme fibrozisi denir. Geri dönüşümü mümkün olan diğer bütün lezyonlardan farklı olarak ilerlemiş fibrozisin genelde geri dönüşü zordur (17).

Karaciğerde, fibrotik süreç ve parankimal hasar nedeni ile rejenere hepatositlerden oluşan ve skar dokusu ile çevrelenmiş nodüller oluşur ve bu duruma siroz denir. Sirotik bir karaciğer kontrakte olup küçülmekte, şekli bozulmakta, soluklaşmakta ve adeta bir skar dokusunu andırır hale gelmektedir (17).

#### **II.4. Serbest Radikal Hasarı**

Serbest radikal mekanizmaları in vivo olarak hem yararlı, hem de zararlı etkilere sahiptir.

Serbest radikaller aerobik hücre metabolizmasının bir ürünü olarak sürekli üretilmekte olup, protein, lipid ve nükleik asit gibi makro moleküllerle etkileşmeleri sonucu, hücre yapı ve fonksiyonlarında önemli değişikliklere neden olmaktadır. Serbest radikaller antioksidan savunma mekanizmaları ile dengede tutulur ve normal şartlar altında organizma kendini antioksidan mekanizmalarla korur. Oksidan-antioksidan dengenin oksidan lehine bozulmasına oksidatif stres denir (18).

Serbest radikallerin sebep olduğu hasar sonucunda bazı enzimler inaktive, bazı enzimler ise uygun inhibitörün inaktivasyonu ile aktive olurlar. Fazla miktarda disülfid bağı içeren ekstrasellüler proteinler hidroksil ve peroksil radikal saldırısına daha hassastırlar. Serbest radikal (özellikle hidroksil) saldırısı sonrası DNA'da hasar oluşur. Bunun sonucu, sitotoksisite, mutasyon ve malign transformasyon potansiyeli meydana gelir. Poliansatüre yağ asitleri serbest radikal hasarına özellikle hassastır ve bu oksidatif hasara "lipid peroksidasyonu" denir. Sonuçta membran akışkanlığında azalma ve permeabilite değişiklikleri meydana gelir. Hücrelerden başta potasyum olmak üzere çeşitli elektrolitlerin kaybını artırırılar. Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar ve litik enzimleri (elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipooksijenaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz) aktive ederler. Kapiller ve venüllerin endotelial tabakalarında oluşan bu hasarlar, permeabilite artışına ve plazmanın, hatta eritrositlerin ekstrasvazasyonuna yol açar (18-20).

Serbest radikaller, insan plazmasında in vitro olarak kemotaktik faktör oluşturur veya aktive ederler ve dokulara fagositlerin toplanmasına sebep olurlar. Trombosit agregasyonunu artırır. İn vitro olarak, serbest oksijen radikalleri, lipid peroksidazların oluşumundan dolayı, indirekt olarak araşidonik asit metabolizmasını uyarak prostaglandin, tromboksan ve lökotrien konsantrasyonlarını artırır. Bunun sonucu, permeabilite değişimleri ile mikro ve makro dolaşım bozuklukları gözlenir. Bunlara ek olarak mitokondrial oksidasyon, hemoglobin tarafından oksijen transportu ve sitokrom P450 aktivitesi gibi birçok fizyolojik reaksiyonlarda serbest radikal mekanizmalarının temel rol oynadığı düşünülmektedir (18-20).

## **II.5. Antioksidan Savunma Sistemleri**

Oksijen radikallerinin miktarını ve sebep oldukları hasarı azaltmak üzere fonksiyon gösteren maddelere antioksidanlar denir. Radikallerin aşırı reaktif yapılarına bağlı olarak, hücrel komponentlerdeki karbonhidrat, protein ve lipidlerin oksidasyonu ile sonuçlanacak zararın önlenmesi antioksidanların görevidir (18). Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine “toplayıcı etki”, serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekile dönüştürme işlemine “baskılayıcı etki”, serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak reaksiyon zincirini kıran etkiye “zincir kırıcı etki” ve tamir fonksiyonuna da “onarıcı etki” denir (20). Vücudun endojen antioksidanları ‘Tablo 1’ de görülmektedir (18-20).

**Tablo 1:** Vücutun endojen antioksidanları.

| <b>Enzimatik antioksidanlar</b> | <b>Enzimatik olmayan antioksidanlar</b> |
|---------------------------------|---|
| Sitokrom oksidaz sistemi        | $\alpha$ - tokoferol                    |
| Süperoksid dismutaz             | $\beta$ - karoten                       |
| Katalaz                         | Askorbik asit                           |
| Glutasyon peroksidaz            | Ürat                                    |
|                                 | Sistein                                 |
|                                 | Albümin                                 |
|                                 | Bilirubin                               |
|                                 | Seruloplazmin                           |
|                                 | Transferrin                             |
|                                 | Laktoferrin                             |
|                                 | Ferritin                                |
|                                 | Glutasyon                               |
|                                 | Melatonin                               |

## **II.6. Karbontetraklorür Toksisitesi**

Karbontetraklorür ( $CCl_4$ ) temizlik maddelerinin ve solventlerin yapımında, tahılların ilaçlanmasında ve kloroflorokarbonların sentezinde ara ürün olarak yaygın bir şekilde kullanılmakta iken, toksisitesinin keşfedilmesi ve florokarbon kullanımının azalmasıyla üretimi azalmıştır. İlaçlanmış tahıllarda en yüksek seviyede bulunurlar ve bunlardan yapılan yemeklerle insanlar etkilenebilir.  $CCl_4$ 'ten en fazla etkilenen organlar karaciğer ve böbreklerdir (21).

$CCl_4$ 'ün hepatotoksik etkisi, kısa yaşam süreli reaktif ara ürünlerinin metabolik aktivasyonu ile yakından ilişkilidir.  $CCl_4$  ile oluşan hücre hasarı lipid peroksidasyonundaki artışa bağlıdır. Bu artış reaktif ara ürünlerin hücresel

komponentlere kovalent bağlanmasına veya doymamış yağ asitlerinin de artmasına sebep olan, serbest radikal ara ürünlerin oksijenle birleşmesi sonunda meydana gelir. Bunun sonucunda da intrasellüler membranlarda ve plazma membranında hasar gözlenir. Parçalanma ürünleri (en çok reaktif aldehitler), hücrede birikerek hasarın daha da ağırlaşmasına sebep olurlar (21).

Düşük parsiyel oksijen basıncı varlığında kovalent metabolit bağlanması ve  $CCl_3$  ile  $CHCl_2$  radikalleri meydana gelirken, yüksek oksijen basıncında  $CCl_3-OO$  radikali oluşur. Bu radikallerin etkileşimleri sonucunda sıklıkla lipid metabolizması etkilenir ve hücrede steatozisten apoptozise kadar olan değişiklikler gerçekleşebilir.  $CCl_4$  ile oluşan karaciğer hasarının gelişim basamakları şöyledir: redüktif dehalojenasyon, radikallerin kovalent bağlanması, protein sentezinin (özellikle de apolipoproteinlerin) inhibisyonu, yağ birikimi, kalsiyum sekestrasyonunda kayıp, apoptosis, fibrozis (21).

## **II.7. Karaciğer Fibrozisi**

Hepatik fibrozis (HF), etyoloji ayırt etmeksizin kronik karaciğer hastalığı olan hemen hemen tüm hastalarda görülen bir süreçtir. Fibrozis, ekstrasellüler alanda fibriller kollajenlerden zengin ekstrasellüler matriksin (ECM) aşırı birikmesi nedeniyle oluşmakta ve genellikle siroz diye adlandırdığımız duruma yol açmaktadır (2). Hastalar karşımıza karaciğer yetmezliği veya portal hipertansiyona bağlı bulgularla gelebilmektedir. Kimi hastalarda ise süreç bununla sınırlı kalmayıp siroz zemininde karaciğer kanseri (HCC) gelişmektedir (3,4).

Kronik karaciğer hastalığı ve ilgili komplikasyonları, dünya genelinde mortalite ve morbidite nedenleri arasında üst sıralarda yer almakta ve sıklığı halen artmaktadır. Diğer tarafta bunların tedavisi için gereken ekonomik yük de giderek ağırlaşmaktadır. Günümüzde ilerlemiş ilerlemiş fibrozis için mevcut olan tek etkili yöntem karaciğer transplantasyonudur (4). Ancak en iyi koşullara rağmen transplantasyon, bir çok zorluğu ve komplikasyonları olan, pahalı bir seçenektir. Bu yüzden HF'in önlenmesi veya tedavi edilebilmesi için medikal tedavi arayışları gittikçe önem kazanmaktadır. Özellikle son yıllarda bir toplum sağlığı problemi haline gelen NASH ve onun siroza yol açtığına gösterilmiş olması bu konunun önemini daha da artırmıştır (3).

Fibrozis son dönem karaciğer hastalığına bağlı komplikasyonların altta yatan nedeni olduğu için, fibrozisin moleküler temellerini bilmek önemlidir. Son birkaç dekatta yapılan araştırmalar neticesinde, fibrozis mekanizmaları günümüzde büyük ölçüde ortaya çıkarılabilmektedir. Günümüzde HF'in aktif ve dinamik bir süreç olduğu, bağ dokusunun yapım ve yıkımı arasında bir dengesizlik olduğu ve ECM birikiminin sanılandan daha 'reversibl' olduğu kanıtlarla gösterilmiştir (3,5).

### **II.7.1. Karaciğer Fibrozisi Patogenezi**

Hepatik fibrozis, karaciğerde kronik hasara yol açan bir nedene karşı verilen yara iyileşme yanıtı olarak değerlendirilebilir (2). Eğer karaciğerde hasara yol açan durum akut ve geçici ise inflamatuvar bir yanıt sonrası parankimal hücreler rejenere olmakta ve nekrotik ya da apoptotik hücrelerin yerini almaktadır. Fakat hasar kronikleşirse



rejenerasyon yetersiz kalır ve hepatositlerin yerini fibriler kollajenden zengin ECM alır. Bu fibröz materyalin birikim yeri, etyolojiye bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Örneğin kronik viral hepatitlerde ve kronik kolestatik hastalıklarda fibrotik materyal portal alanların etrafında birikirken, alkole bağlı karaciğer hastalığında perisentral ve perisinüzoidal alanlarda olmaktadır. Ancak fibrotik süreç ilerledikçe ayırım yapmak güçleşmektedir. Kollajen bantlar, fibrotik köprülere dönüşmekte ve nihayetinde siroz gelişmektedir (3).

İlerlemiş evrelerde, karaciğer normalin 6 katı kadar ECM içermektedir. Bir taraftan inflamatuvar olaylar nedeni ile kollajenler (tip I, III, IV, VI), fibronektin, undulin, elastin, laminin, hyaluronik asit ve proteoglikanlardan zengin ECM sentezi artarken, diğer taraftan, fazla üretilen TIMP ‘doku metalloproteinaz inhibitörleri’ ailesi nedeniyle MMP ‘matriks metalloproteinaz’ enzimlerinin aktivitesi engellenmekte ve biriken ECM yıkılamamaktadır (22).

### **II.7.1.1 Hepatik Stellat Hücreler ve Ekstrasellüler Matriks**

Hepatik stellate hücreler, ECM üretiminde esas hücrelerdir. HSH’ler Disse aralığında, hepatositler ve sinüzoidal hücrelerin arasında bulunmaktadır. A vitamini ve diğer retinoidlerin depolanmasında önemlidirler. Hücre iskeletlerinde desmin ve glial fibriler asidik protein (GFAP) bulunur. HSH’ler karaciğerde kronik hasar varlığında aktive olurlar. Aktive olduklarında kontraktilite, fibrojenik, proinflamatuvar özellikler kazanırlar ve myofibroblastlara dönüşebilirler. Bir taraftan ECM sekrete ederken diğer taraftan ECM yıkımını düzenlerler (1,23).

Ekstrasellüler matris yalnızca bir dolgu malzemesi olmayıp, hücre fonksiyonları da etkileyen dinamik bir dokudur. Disse aralığında, HSH'ler veya diğer ECM üretebilen hücreler tarafından sekrete edilen ECM bir taraftan yeni damarlanmayı uyarırken diğer taraftan içerisindeki glikoproteinler, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar aracılığı ile başka HSH'lere bağlanarak onların da aktive olmasına sebep olabilir. Böylece ECM üretimi daha da artmaktadır. ECM biriktikçe sinüzoidal endotel hücrelerin aralarındaki fenestralar kapanmakta ve hepatositler mikrovilluslarını kaybetmektedir. Bunun neticesinde sinüzoidlerden hepatositlere madde transportu engellenmektedir (1,24).

Hepatik stellate hücrelerin yanında diğer bazı hücreler de ECM birikimine katkıda bulunabilir. Portal fibroblastların, kemik iliği kaynaklı bazı hücrelerin ve epitelyal/mezenşimal transformasyon ile oluşan bazı hücrelerin myofibroblastlara dönüşebileceği ve ECM sekrete edebileceği gösterilmiştir (1,25). HSH'ler kadar olmasa da, sinüzoidal endotel hücreleri de ECM sentezleyebilmektedir. Ancak sinüzoidal endotel hücrelerinin sentezlediği ECM erken fibroziste önemlidir. Bu hücrelerin normalde sentezlediği ECM ile karaciğer hasarı varlığında sentezledikleri ECM farklıdır. Normalde sentezledikleri bazal ECM bir düzen içinde bir taraftan yapılırken diğer taraftan yıkılmaktadır. Hasar varlığında sentezledikleri ECM daha fazla fibronektin içermektedir ve HSH aktivasyonu için daha uygun bir ortam olmaktadır (1).

Hepatik stellate hücre aktivasyonunun iki fazı vardır; başlangıç ve sürdürme. Başlangıç fazında çeşitli dış uyarıların ve sitokinlerin etkileri ile gen ekspresyonu ve hücre şeklinde değişiklik olurken sürdürme fazında kendinin ürettiği veya

çevreden gelen sitokinlerin ve gen ekspresyonlarının etkileri ile ECM sentezi ve fibrozis olmaktadır (1).

Hepatik stellate hücrelerdeki erken değişiklikler, sinüzoidal endotel hücreleri, Kupffer hücreleri, hepatositler ve karaciğerde bulunan trombositler gibi komşu hücrelerden kaynaklanan parakrin uyarılar neticesinde olmaktadır (1). Endotelial hücrelerde oluşan bir hasarda, hücrel fibronektin üretimi uyarılmaktadır. Fibronektinin HSH' leri aktive edici özelliği vardır (26). Endotel hücreleri bununla birlikte fenestralarını kaybetmekte, böylece kandan parankim hücrelerine metabolit geçişi engellenmekte ve doku hipoksisi oluşmaktadır. Diğer yandan endotel hücreleri intrasellüler adezyon molekülü -1 (ICAM-1) gibi adezyon molekülleri, VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) ve diğer proinflamatuvar molekülleri eksprese etmektedir. Ayrıca HSH' ler ile birlikte anjiyojenik yolları aktive etmektedir (27,28). Kupffer hücreleri de özellikle TGF- $\beta$  gibi sitokinler, ROS (reaktif oksijen türevleri) ve lipid peroksidasyon ürünleri aracılığı ile HSH aktivasyonuna katılmaktadır (29).

Hepatik stellate hücre aktivasyonunun idame fazı, hücre karakteristiğindeki 7 önemli değişikliği içermektedir; a-proliferasyon, b-kemotaksis, c-fibrogenesis, d-kontraktilite, e-matriks yıkımı, f-retinoid kaybı, g-lökosit kemoatraktanları ve sitokinlerin salınması. Bu değişikliklerin net etkisi ECM birikimidir (1).

### **II.7.1.2 Matriks Metalloproteinazlar ve Doku Metalloproteinaz İnhibitörleri**

Sağlıklı bir karaciğerde ECM homeostazisi MMP ailesi ve onların spesifik inhibitörleri olan TIMP ailesi arasındaki dengeye bağlı olarak hassas bir biçimde düzenlenmektedir. Karaciğerde kronik bir hasar varlığında HSH' ler aktive olmakta ve myofibroblast benzeri bir şekle dönüşerek ECM sentezlemektedir. Bu durumda yeni sentezlenen ECM normal ECM' den bir takım farklılıklar göstermektedir. Örneğin yeni ECM' de fibriller kollajenler, özellikle tip 1 kollajen, normalden 10 kat fazla bulunmaktadır. Bu da ECM yıkımını zorlaştırmaktadır. Diğer yandan HSH' ler tarafından üretilen büyük miktarlardaki TIMP ailesi nedeniyle, -özellikle TIMP1-, MMP' lerin aktivitesi inhibe edilmekte ve ECM yıkımı engellenmektedir (22).

Matriks metalloproteinaz ailesinin bilinen 22 üyesi vardır (30). Bu MMP' lerin hepsi de geniş bir etki spektrumuna sahip olmakla birlikte ana substratlarına göre; kollajenazlar, gelatinazlar, stromelizinler, matrilizinler, metalloelastazlar ve membran tip MMP'ler şeklinde sınıflandırılabilirler. MMP'ler zimojen moleküller halinde sekrete edilirler ve enzimatik olarak propeptitlerinin ayrılmasıyla aktif enzim haline dönüşürler. Sekrete edildikten sonra MMP'lerin aktiviteleri TIMP'ler bağlanması ile düzenlenir. TIMP1, TIMP2, TIMP3 ve TIMP4 olmak üzere TIMP ailesinin 4 üyesi vardır. Bunlar içinde hepatik fibrozis mekanizmasında en önemli yeri olanı TIMP1' dir (31).

Bilinen MMP'ler içinde birkaç tanesi karaciğer dokusunda bulunmaktadır ve türlere göre farklılık gösterebilmektedir. Örneğin MMP1 insan karaciğerinde bulunurken, bu enzimin yapısal ve fonksiyonel açıdan rat ve farelerdeki benzerinin MMP13 olduğu belirlenmiştir (32). MMP13 HSH' ler, fibroblastlar, Kupffer hücreleri, perisinüzoidal

endotel hücreleri tarafından eksprese edilmektedir (32,33) ve MMP13 ekspresyonu IL (interlökin)-1 $\alpha$  ve  $\beta$ , TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor - $\alpha$  ), EGF (epidermal growth factor) veya TGF-  $\beta$  (transforming growth factor-  $\beta$ ) aracılığı ile indüklenebilmektedir (32,34). Hayvan modellerinde toksik akut karaciğer hasarında MMP13 mRNA ekspresyonunun birkaç saat içinde pik yaptığı ve kısa süre sonra normale döndüğü gösterilmiştir (35). Kronik toksik karaciğer hasarında ise (alkol veya CCl4 ile) MMP13 ekspresyonunun fibrotik süreç boyunca yüksek kaldığı, daha sonraları düştüğü gösterilmiştir (33,36). İmmün boyama yapıldığında MMP13 eksprese eden hücrelerin henüz aktive olmamış sessiz HSH'ler olduğu, desmin ile boyanıp  $\alpha$ -SMA (smooth muscle actin) ile boyanmadığı gösterilmiştir (33). Bu bulgulara göre fibrozis mekanizmasında, karaciğer hasarını takiben MMP13 ekspresyonundaki hızlı artışın HSH'lerin etrafındaki yeni sentezlenmiş normal ECM'in yıkılmasına yol açtığı ve bunun neticesinde ECM'e bağlı durumdaki çeşitli sitokinlerin (TGF-  $\beta$  ve diğerleri) açığa çıkması ile HSH'lerin aktivasyonu, çoğalması ve migrasyonu için uygun mikroçevrenin oluştuğu ileri sürülmektedir (22).

MMP2 (gelatinaz A) ve MMP14, karaciğer hasarını takiben aktive olmuş HSH'ler tarafından eksprese edilmektedir (32). MMP14, MMP2'nin aktivasyonu için gereklidir (22,37). İnsanlarda sirotik karaciğer hastalıklarında, MMP2 ve 14'ün karaciğer dokusunda belirgin olarak arttığı bildirilmektedir (37). HCV ile infekte olan hastalarda ise bu artışın siroz gelişene kadar fibrotik süreç boyunca olduğu, siroz geliştikten sonra olmadığı kaydedilmiştir (37). Hayvan modellerinde sağlıklı karaciğer dokusunda MMP2 tespitinin çok zor olduğu belirtilmiştir (38). CCl4 ile oluşturulan fibrozis modelinde MMP2 düzeylerinin arttığı ve yüksek kaldığı

gösterilmiştir (39). Kültüre HSH'lerde de ROS ve TGF-  $\beta$  ile stimülasyon sonrası MMP2 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (40). MMP2 aynı zamanda HSH'lerin proliferasyon ve migrasyonu için bir otokrin faktördür (37). Bununla ilişkili olarak MMP2 spesifik inhibitörlerinin, uyarılmış HSH'lerin proliferasyon ve migrasyon yeteneklerini azalttığı da gösterilmiştir (41).

MMP3, HSH aktivasyonunun erken fazında sekrete edilmektedir (32). MMP3 zayıf enzimatik aktiviteye sahip olmakla birlikte diğer MMP'lerin (MMP1, 3, 7, 8, 9 ve 13) enzimatik olarak aktivasyonunda önemlidir (22,42).

MMP9 (gelatinaz B), Kupffer hücreleri, hepatositler, HSH'ler ve mononükleer iltihabi hücreler tarafından üretilebilmektedir (22,32). MMP9, HSH aktivasyonu için çok önemlidir, yokluğunda HSH'lerin aktive olamadıkları gözlenmiştir (54). Ayrıca MMP9, latent TGF-  $\beta$ 'nin aktive olmasını sağlayarak, TGF-  $\beta$ 'nin HSH'leri uyararak kollagen sentezini uyarmasından sorumlu olmaktadır (43).

Hepatik fibrozis mekanizmalarında TIMP1 ve 2' nin rolleri daha iyi araştırılmıştır. TIMP3 ve 4 ile ilgili veriler azdır. TIMP1 ve 2 başlıca HSH' ler tarafından üretilmektedir (31). Hem CCl4 hem de safra kanalının bağlanması ile oluşturulan fibrozis modellerinde ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir (44). Kronik hepatit C' li hastalarda, TIMP1 serum düzeylerinin ve mRNA ekspresyonlarının fibrozis derecesi ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur (45). TIMP1' in fibrogenizdeki önemi TIMP1 genini aşırı eksprese eden transgeneik farelerde gösterilmiştir. TIMP1 genini aşırı eksprese eden transgeneik farelerin, CCl4 maruziyetinden sonra normal farelerden daha fazla hastalık belirtileri gösterdiği izlenmiştir. Bununla birlikte yalnız başına artmış TIMP1 ekspresyonunun, herhangi bir hasar etkeni olmadan bir anlamı

olmadığı, fibrozis bulgusu oluşmadığı belirlenmiştir (46). TIMP1, aktive MMP'lere bağlanarak inhibe eder ve yeni sentezlenmiş kollajenin MMP'ler tarafından hemen yıkılmasını engeller (34). Kültüre karaciğer hücreleri içinde sağlam hepatositlerde TIMP2 ekspresyonu gösterilememişken, myofibroblastlarda, aktive HSH' lerde ve Kupffer hücrelerinde gösterilebilmiştir (32). Kronik toksik karaciğer hasarında TIMP2'nin fonksiyonunun sınırlı olduğu belirtilmektedir. Fibrozisin erken döneminde TIMP2 düzeylerindeki geçici yüksekliğin MMP2 aktivasyonu için gerekli olduğu ve bunun neticesinde perisellüler normal ECM yıkımının gerçekleştiği gösterilmiştir. TIMP2 defektli farelerde MMP2 aktivasyonunun gerçekleşmediği saptanmıştır (47).

Hepatik fibrozis sürecinde en belirgin özellik olarak MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki dengenin bozulması kabul edildiğinde, bu iki hedefe yönelik tedavi metodu arayışlarının mantıklı olacağı belirtilmektedir. MMP'lerin aktivitesini artıran veya TIMP'lerin aktivitesini baskılayan stratejilerin başarılı olacağı ileri sürülmektedir (22).

### **II.7.1.3. Hepatosit Apoptozisi**

Nekrozis veya apoptozis yolu ile hepatositlerin kronik olarak ölmeye devam etmesi, inflamatuvar yanıtları ve HSH aktivasyonunu, dolayısı ile de hepatik fibrozisi tetiklemekte ve kuvvetlendirmektedir. Kronik karaciğer hasarında büyüme faktörlerinin dengesinde bozulma ve karaciğer kan dolaşımının ve mimarisinin bozulması nedeniyle hepatosit rejenerasyonu bozulmaktadır. Hücre artıkları ve

apoptotik cisimler inflamatuvar yanıtları artırmakta bunların arasında bir kısır döngü oluşmaktadır. Böylece fibrozis oluşumu kolaylaşmaktadır (13). HSH'lerin ölen hepatositlerden geri kalan hücre artıklarını ve apoptotik cisimleri fagosite etmesi, aktive olmalarına yol açmaktadır ve HSH'lerin myofibroblastlara transforme olmalarına yol açmaktadır (48). Hepatositler yüzeylerindeki birtakım reseptörlere 'ölüm reseptörleri', ilgili ligandların bağlanmaları ile ekstrinsek yoldan apoptoza yönlendirilebilirler. Fas (CD95), TNF- $\alpha$ -reseptör-1, TRAIL -R1 ve -R2 'TNF- $\alpha$  ilişkili apoptozis uyarıcı ligand -reseptör 1 ve 2' reseptörleri bu tip reseptörlerdendir ve TNF- $\alpha$  bu reseptörlere bağlanarak ekstrinsek yoldan hepatosit apoptozisini tetikleyebilir (49). Deneysel çalışmalarda Fas reseptörlerinin aktivitesinin engellenmesi ile fulminan hepatik yetmezlik ve mortalite önlendiği gibi, fibrozisin de engellendiği görülmüştür (50).

Hepatosit apoptozisinin engellenmesinde, BCL-2 gen ailesi moleküler hedeflerden birisidir. Bu gen ailesinin bazı ürünleri (Bcl-XL, Bcl-w, A1, MCL-1 ve Boo) apoptozisi inhibe ederken, diğerleri (Bax, Bak, Bok, Bik, Bad ve Bid) apoptozisi uyarmaktadır (51). Apoptozis mekanizmasında önemli olan hedeflerden biri de hücre yıkımında görev alan proteolitik 'caspase' enzimleridir. Bu enzimlerden biri olan caspase-8, hücre yüzeyindeki 'ölüm reseptörleri' olarak adlandırılan ve hücreyi apoptoza yönlendiren reseptörlerin etkilerine aracılık etmektedir. Caspase-8 ekspresyonu bloke edildiğinde hepatositlerin Fas-ligand aracılı apoptozdan korunduğu gösterilmiştir (52).



#### II.7.1.4. Transforme Edici Büyüme Faktörü- $\beta$

Transforme edici büyüme faktörü- $\beta$  hepatik fibrozis mekanizmalarındaki en potent sitokinlerden biridir. TGF- $\beta$  hepatosit proliferasyonunu baskılamakta, HSH aktivasyonunu ve ECM üretimini uyarmakta ve hepatosit apoptozisine aracılık etmektedir (53). Normal karaciğerde HSH' ler az miktarda TGF- $\beta$  geni eksprese ederken, sinüzoidal endotel hücreler ve Kupffer hücreleri göreceli olarak daha fazla eksprese etmektedir. Fibrojenik stimulus varlığında ise HSH' ler artmış TGF- $\beta$  üretiminin en büyük kaynağı olmaktadır. Bu yüzden aktive HSH' ler ürettikleri TGF- $\beta$ ' nın otokrin ve parakrin etkileri aracılığı ile tip 1 kollajen üreten esas hücreler olmakta ve bu nedenle fibrozisin en önde gelen sorumlusu olmaktadır (53).

Tip 1 kollajen fibrotik dokuda ECM' in major bileşenidir. İki  $\alpha 1$  ve bir  $\alpha 2$  zinciri olmak üzere heterotrimer yapıdadır. Bu zincirler Col-1-A1 ve Col-1-A2 olmak üzere iki gen tarafından kodlanmaktadır. Artmış tip 1 kollajen üretimi tüm fibrotik hastalıkların ortak belirteçlerinden biridir. Kollajen yapımı ve yıkımı arasındaki denge bir takım sitokin ve büyüme faktörlerinin aracılığı ile kontrol edilmektedir. Bu dengenin bozulması fibrozis ile neticelenmektedir. TGF- $\beta$  tip 1 kollajen gen transkripsiyonunu uyaran en potent faktördür. Bunun yanında MMP' lerin ve TIMP ailesinin üretimi ile ilgili gen ekspresyonlarında da düzenleyici etkileri vardır (53).

Buna karşılık TGF- $\beta$  genini aşırı eksprese eden farelerde fibrojenik ajan maruziyetinden sonra normal farelere göre hepatik fibrozisin daha hızlı geliştiği ve fibrojenik ajanın kesilmesinden sonra da iyileşmenin daha yavaş olduğu gösterilmiştir (54). Bununla ilgili olarak 'truncated' TGF- $\beta$  reseptör tip2 geninin adenoviruslar aracılığı ile transfer edildiği hayvanlarda (TGF- $\beta$ , fonksiyonu olmayan

bu reseptörlere bağlandığında bir etki oluşmamaktadır) dimetilnitrozamin ile oluşturulan fibrozis modelinde mortalitenin azaldığı, hidrokspirolin içeriğinin, AST, ALT düzeylerinin düştüğü ve histopatolojik hasar skorunun daha düşük olduğu gösterilmiştir (55).

#### **II.7.1.5. Tümör Nekrozis Faktör- $\alpha$ ve Kupffer Hücreleri**

Karaciğer hasarlanmasının tüm tiplerinde anahtar konumunda olan TNF- $\alpha$ 'nın ve HSH aktivasyonunda çok önemli rolü vardır (29). Karaciğerde TNF- $\alpha$  üretiminin en büyük kaynağı Kupffer hücreleridir. Hasarlanmış hepatositlerden salınan çeşitli faktörler veya ROS tarafından uyarıldıklarında, Kupffer hücreleri büyük miktarda TNF- $\alpha$  üretmektedir. TNF- $\alpha$  hepatosellüler hasara ve TRAIL reseptörleri aracılığı ile hepatosit apoptozisine katkıda bulunmaktadır (56). Ponnappa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, TNF- $\alpha$  üretiminden sorumlu gen baskılandığında, karaciğer hasarının daha az olduğu karaciğer enzimleri ile ve histolojik olarak gösterilmiştir (57).

Kupffer hücrelerinin fonksiyonlarına aracılık eden önemli sitokinlerden diğeri NF- $\kappa$ B 'nükleer faktör- $\kappa$ B' dir. Benzer şekilde NF- $\kappa$ B üretimi engellendiğinde, hayvanlarda mortalitenin daha az olduğu, proinflamatuvar sitokinlerin üretiminin azaldığı ve histopatolojik olarak sinüzoidal mimarinin korunduğu gösterilmiştir (58).

### **II.7.1.6. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü**

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü 'PDGF', HSH proliferasyonu için en potent mitojendir. PDGF reseptörleri tirozin kinaz aktivitesi göstermektedir (59). PDGF etkileri antikorlar veya reseptör inhibitörleri ile bloke edildiğinde, fibrozis progresyonunun engellendiği çalışmalarla gösterilmiştir (60).

### **II.7.1.7. Reaktif Oksijen Türevleri**

Gerek karaciğere hasar veren ajanın oksidatif yapısından dolayı kendisinden açığa çıkan, gerekse de inflamatuvar hücreler tarafından karaciğerde üretilen ROS' nin, daha önce belirtildiği gibi karaciğer hasarında önemli rolleri vardır. ROS, hepatosit nekrozu ve apoptozu ile HSH aktivasyonuna katılmaktadır (40,61). SOD (süperoksit dismutaz), CAT (katalaz) ve glutatyon peroksidaz antioksidan savunma sisteminde yer alan önemli enzimlerdir. Antioksidan savunma sistemini destekleyen stratejilerin karaciğerde inflamasyonu, kronik süreçte de fibrozisi baskılamaya katkıları olmaktadır. Örneğin, Zhong ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, SOD enziminin izoformlarının (mangan SOD, bakır-çinko SOD) üretiminden sorumlu genlerin adenoviral vektörler ile hepatositlere transfer edilmesi ile bu enzimlerin aşırı eksprese edilmesi ile birlikte, safra kanalı bağlandıktan sonra karaciğer hasarının ve fibrozisin daha az olduğu gösterilmiştir (62).

## II.7.2. Ekstrasellüler Matriks Yıkılması

Daha önceleri hepatik fibrozisin ilerleyici ve geri dönüşsüz olduğu düşünülse de, hayvan modellerinden ve insan çalışmalarından elde edilen veriler yakın zamanlarda bu yargıyı değiştirmiştir (3,5). Fibrotik sürecin değişik safhalarında bazı MMP'ler artarken bazı MMP'ler azalmaktadır. Bu MMP'lerin her birinin ECM'in birkaç komponentine etki ettiği bilinmektedir (4). Bununla birlikte HSH aktivasyon sürecinde Tip 1 kollajen artmadan önce, HSH'ler tarafından TIMP1 ve 2 ekspresyonları artırılmaktadır. Böylece MMP'lerin aktivitesi, 20 kat artmış olan TIMP'ler aracılığı ile inhibe edilmekte ve yeni sentezlenen kollajenin yıkımı engellenmektedir (63). Bu bilgilere dayanarak hepatik fibrozisde en belirgin etkenin MMP'lerin etkilerini kontrol altında tutmaları nedeni ile TIMP ailesi olduğu belirtilmektedir. Buna göre TIMP-MMP dengesizliği, ECM yıkımını kolaylaştıracak şekilde MMP lehine değişirse karaciğer fibrozisinin geri dönüşlü olabileceği söylenmektedir (4).

Fibrozis modellerinde, fibrozise neden olan zararlı etkenin uzaklaşmasından sonra iyileşme sürecinde belirli aralıklarla yapılan değerlendirmelerde TIMP1 ve 2 miktarlarının azaldığı ve buna bağlı olarak kollajenazların aktivitesinin arttığı ve ECM yıkımının gerçekleştiği gösterilmiştir. Hepatik fibrozis rezolüsyonunun major özelliklerinden biri de HSH apoptozisidir (4). Dört haftalık CCl4 maruziyetinden sonra, CCl4'ün kesilmesi ile zaman içinde fibrozisin rezolüsyona uğradığı gözlenmiştir. Benzer sonuçlar safra kanalı bağlanan modelde bilio-jejunal anastomoz yapılması sonrasında da görülmüştür. Ancak karaciğer histolojisinin tamamen normale dönmesinin şüpheli olduğu belirtilmektedir (64).

Hayvan modellerinde hepatik fibrozis rezolüsyonunun ayrıntıları araştırılırken, insanlarda da otoimmün hepatitlerin ve hepatit B ve C infeksiyonlarının antiviral tedavileri ile ilgili geniş çaplı çalışmalardan fibrozis rezolüsyonu ile ilgili veriler elde edilmiştir. Bu bilgilere göre viral eradikasyonun fibroziste gerileme ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır ve insanlarda karaciğer fibrozisinin en azından kısmi geri dönüşlü olduğu gösterilmiştir (65-67).

Bununla birlikte ileri derecede fibrozis gelişmiş sirotik bir karaciğerde, bir noktadan sonra fibrozisin geri dönüşümünün mümkün olmadığını belirten veriler de vardır (68).

### **II.7.3. Karaciğer Fibrozisinin Tedavisi İle İlgili Çalışmalar**

Karaciğer fibrozisinde rol oynayan mekanizmalar daha iyi anlaşıldıkça antifibrotik tedavi seçenekleri geliştirilmesi için olanaklar artmaktadır. Bununla birlikte antifibrotik tedavi konusu halen önemli bir araştırma konusudur ve henüz insanlar için onaylanmış bir antifibrotik ilaç mevcut değildir. Tedavi yöntemleri, uzun yıllar kullanımlarında dahi iyi tolere edilebilir olmalı, mümkün olduğu kadar karaciğere spesifik olmalı ve karaciğer ile karaciğer dışı dokulara yan etkisi en az olmalıdır. Tedaviye aday yöntemlerin antifibrotik etkileri ve etki mekanizmaları hayvan modellerinde açıkça gösterilmelidir. Yalnızca hasar oluşumunu engellemekle kalmayıp, daha önceden hasarlanmış olan karaciğere de etkili olmalıdır (1).

Tedavi stratejileri, HSH' ler merkez alınarak şu başlıklar altında sıralanabilir;

- (a) Primer hastalığın tedavisi veya hasarın önlenmesi,
- (b) HSH aktivasyonunu engellemek için inflamasyonunun veya konak yanıtının baskılanması,
- (c) HSH'lerin proliferatif, fibrojenik veya proinflamatuvar fonksiyonlarının bloke edilmesi,
- (d) Matriks proteazları veya onların inhibitörlerinin bloke edilmesi ile ECM degradasyonu.

Karaciğer fibrozisinin en etkin tedavisi, karaciğer hastalığının primer sebebinin ortadan kaldırılmasıdır. Alkolik karaciğer hastalığında alkol alımının kesilmesi, hemokromatozis ve Wilson hastalıklarında aşırı demir ve bakırın uzaklaştırılması, kronik viral hepatitlerde HBV ve HCV'nin eradikasyonu, şistozomiyazis enfestasyonunda parazitin temizlenmesi, safra yolu mekanik tıkanıklıklarında cerrahi tedavi gibi yöntemler buna örnektir. Daha basit olarak non-alkolik steato hepatitli (NASH) hastalarda kilo verilmesi ile bile histolojik olarak düzelme sağlanabilir (1,69). Karaciğer fibrozisinin tedavisi ile ilgili olarak daha önce antifibrotik özellikleri araştırılmış olan bazı ajanlar 'Tablo 2' de gösterilmiştir (1,22).

İnflamasyonun ve immün yanıtların baskılanması ile fibrozisin azaldığı birçok yayında gösterilmiştir. Kortikosteroidlerin özellikle otoimmün hepatitli hastalardaki etkileri buna örnek olarak verilebilir (65). Pegile interferon ve ribavirin ile HCV'li hastaların başarılı tedavisi sonrasında fibrozisin azaldığı bildirilmiştir (67). Bununla birlikte safra kanalı bağlanarak oluşturulan deneysel fibrozis modelinde interferon- $\alpha'$ 'nin fibrozisi azalttığı da gösterilmiştir. Bu nedenle interferon- $\alpha'$ 'nin direkt

antifibrotik etkisi olduğu belirtilmektedir (70). Renin-anjiyotensin sistemi de oksidan strese yol açmak suretiyle inflamasyonun artmasına katkıda bulunabilirler. Bu yzden ACE inhibitörleri ve ARB'ler bu yolla antiinflamatuvar ve antifibrotik etki gösteriyor olabilirler (71,72). Pentoksifilin, TNF- $\alpha$  antagonistleri gibi ajanlar TNF- $\alpha$  aracılı inflamasyonu baskılamakta ve antifibrotik etki göstermektedirler (73). Ursodeoksikolik asit, primer bilyer siroz da muhtemelen antiinflamatuvar etkileri nedeniyle faydalı etkileri nedeniyle kullanılan diğer bir antifibrotik ajandır (74).

Çeşitli antioksidanlarla yapılan çalışmalar sonucunda görülmüştür ki, HSH aktivasyonunun önlenmesinde en etkili yaklaşımlardan biri de oksidatif stresin azaltılmasıdır (75,76). İnterferon- $\gamma$  hayvan modellerinde HSH aktivasyonunu engellediği gösterilmiş olan bir sitokin olmakla birlikte, klinik bir çalışmada beklenen antifibrotik etkiyi gösterememiştir (77).

**Tablo2:** Karaciğer Fibrozisinin Tedavisi İçin Araştırılmış Olan Ajanlar

| <b>Hasarın önlenmesi ve inflamasyonun azaltılması</b>                     | <b>HSH aktivasyonunun engellenmesi ve aktive HSH'lerin fonksiyonlarının inhibe edilmesi</b> |
|---|---|
| Viral hepatitler için antiviral tedavi                                    | Antiproliferatif ajanlar  |
| Şistozomiyazis için antihelmintik tedavi                                  | PDGF reseptör antagonistleri  |
| Metabolik hastalıkların tedavisi (demir-bakır şelasyonu gibi)             | FXR agonistleri<br>Antioksidanlar (Sylibin, Sho-saiko-to vb.)                               |
| ARB'ler, ACE inhibitörleri  | HMG CoA redüktaz inhibitörleri  |
| Caspase inhibitörleri   | Plazmin/trombin reseptör antagonistleri   |
| HGF   | PPAR $\gamma$ agonistleri<br>Endotelin reseptör antagonistleri                              |
| <b>HSH apoptozisini uyaranlar</b>   | Nitrik oksit sağlayıcı ajanlar<br>İntegrin  |
| Gliotoksin<br>TIMP antagonistleri   | TGF- $\beta$ antagonistleri (soluble reseptörler, nötralize edici antikorlar)               |
| NGF agonistleri   | Kollajen sentezi inhibitörleri<br>TGF- $\beta$ inhibitors                                   |
| <b>ECM yıkılmasına yol açanlar</b>  | Pentoksifilin<br>Aldosterone antagonistleri   |
| TGF- $\beta$ inhibitörleri  | Vitamin E, PDTC   |
| Direkt kollajenaz tedavisi  | Smad 7 agonistleri  |
| Kollajen çapraz bağlarının inhibisyonu veya transglutaminaz inhibitörleri | İnterferon- $\alpha$  |
| TIMP antagonistleri   |   |

ACE, anjiyotensinojen dönüştürücü enzim; HGF, hepatosit büyüme faktörü; PDTC, pirolidin ditiokarbamat; TGF- $\beta$ , transforme edici büyüme faktörü  $\beta$ ; PPAR, peroxisome proliferators activated reseptör; FXR, farnesyl X reseptör; PDGF, trombosit kaynaklı büyüme faktörü; HMG CoA, 3-hidroki-3-metil-glutaril coenzim A; NGF, sinir büyüme faktörü; ARB, anjiyotensin reseptör blokerleri; CTGF, konnektif doku büyüme faktörü; Smad 7, mothers against DPP homolog 7; TIMP, doku metalloproteinaz inhibitörleri.



PPAR- $\gamma$  nükleer reseptörleri, HSH' ler tarafından eksprese edilmektedir ve PPAR- $\gamma$  reseptörlerine bağlanan ilaçların -tiazolidinedionlar- HSH aktivasyonunu engellediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (7,9). Adiponektin leptinin doğal kontra-regülatuarı olup özellikle NASH' li hastalarda olmak üzere, antifibrotik olarak faydalı olabileceği belirtilmektedir (78).

Hepatik stellat hücre fonksiyonlarının bloke edilmesi, fibrozisin önlenmesi için başvurulacak önemli stratejilerden bir diğeridir. Son yıllarda büyüme faktörlerinin etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılması büyük faydalar sağlamıştır. Özellikle PDGF, FGF (fibroblast büyüme faktörü), TGF- $\beta$  gibi proliferatif sitokinlerin çoğu tirozin kinaz reseptörleri aracılığı ile etki etmektedir. Bu reseptörleri bloke eden tirozin kinaz inhibitörlerinden biri olan imatinib (Gleevec) kemoterapi ilacı olarak lösemi ve çeşitli mezenkimal kanserlerin tedavisinde kullanılmakla birlikte özellikle karaciğer fibrozisini azalttığı gösterilmiştir (79). Ek olarak  $\gamma$ -linoleik asit, lipooksijenaz inhibitörleri, PPAR- $\gamma$  agonistleri, HMG CoA redüktaz inhibitörleri, pentoksifilin ve pirfenidon gibi ajanların da bu reseptörlerin hücre içi sinyal ileti yollarını inhibe ederek karaciğer fibrozisinde etkili olduklarına dair çalışmalar bulunmaktadır (1). Soluble TGF- $\beta$  reseptörleri, rekombinant Smad7 gibi TGF- $\beta$  antagonistleri, TGF- $\beta$  ile uyarılan ECM üretimini engelleyerek fibrozisi azaltabilmektedir (80). Antikoksidal bir bileşik olan halofuginon da kollajen ekspresyonunu inhibe eden ve antifibrotik aktivitesi olan diğer bir ajandır (81).

Endotelin, HSH' lerin kontraktilite ve kan akımının azalması gibi etkilerinde önemli bir düzenleyicidir. Bosentan isimli endotelin reseptör antagonistinin deneysel modelde HSH aktivasyonunu ve fibrozisi azalttığı gösterilmiştir (82).

Gliotoksin gibi HSH apoptozisini uyaran ajanların karaciğer fibrozisini azalttığı bildirilmiştir (83)

Son olarak daha önce de belirttiği gibi MMP aktivitesinin artırılması ve TIMP aktivitesinin baskılanması yöntemleri de karaciğer fibrozisinin önlenmesinde etkili yöntemlerdir (4,22).

## **II.8. Roziglitazon**

Tiazolidinedion (TZD) grubu ilaçların ilk üyesi olan ‘ciglitazon’ ilk olarak 1982 yılında tanımlanmış, ancak etkisi yeterli bulunmadığı ve çeşitli yan etkileri olduğu için klinik kullanıma geçmemiştir. Klinik olarak kullanıma giren ilk TZD ise ‘troglitazon’ dur. Ancak bu da şiddetli hepatotoksisite yan etkisi nedeniyle 2000 yılında kullanımdan çekilmiştir. Roziglitazon, pioglitazon ile birlikte bu gün için kullanımda olan iki TZD’ dan birisidir (84).

Roziglitazon günümüzde tip 2 diyabet tedavisi için kullanımı onaylanmış, insülin duyarlılaştırıcı özelliği olan bir oral antidiyabetik ilaçtır. Oral alımını takiben biyoyararlanımı oldukça yüksektir ve absorbe edildikten sonra %99’ un üzerinde plazma proteinlerine bağlanmaktadır. Başlıca CYP2C8 ve kısmen CYP2C9 enzim sistemi tarafından metabolize edilmektedir. Karaciğer fonksiyonları normal ise, eliminasyon yarı ömrü 3-4 saattir (84).

Etki mekanizması PPAR- $\gamma$  reseptörlerine bağlanması üzerine kuruludur. PPAR- $\gamma$  reseptörleri nükleer transkripsiyon faktörleri grubundandır. Nükleer transkripsiyon

faktörleri hücre fonksiyonlarını düzenleyen çeşitli genlerin ekspresyonlarını etkilemektedir. PPAR- $\gamma$  reseptörleri başlıca yağ hücrelerinde eksprese edilmektedir ve bu yüzden yağ hücreleri PPAR- $\gamma$  ligandlarının başlıca etki yerleridir. Diğer çoğu ilaçtan farklı olarak RZG' un bağlandığı reseptörler hücre membranında değil çekirdektedir. PPAR- $\gamma$  reseptör aktivasyonuna yanıt olarak hedef hücrede yüzlerce genin ekspresyonu gerçekleşmektedir. Sonuç olarak yağ doku, daha kolay almakta ve lipoliz inhibe edilmektedir. Takiben dolaşımdaki serbest yağ asidi düzeyleri azalmakta ve indirekt olarak iskelet kasının glikozu alması kolaylaşmaktadır. Birkaç hafta sonra insülin rezistansında düşme gözlenmektedir. Bu etki mekanizmasının neticesi olarak RZG tedavisi sırasında özellikle subkutan yağ dokusunda olmak üzere vücut yağ kitlesinde artış olmaktadır (84-86). RZG tedavisi vücut ağırlığında ortalama 2-4 kg kadar artışa yol açabilmekle birlikte bu artış insülin direncinde azalma ile paralellik göstermektedir. Bu olay normalde yağ içermeyen ancak insülin direncinde yağlanmış olan karaciğer ve iskelet kası gibi dokuların yağ içeriğinde azalma ile açıklanabilir. RZG' un net etkisi periferik dokularda insülin direncinde azalma ve özellikle iskelet kasında insüline bağlı glikoz 'up-take' inin iyileşmesidir. Karaciğerde de insülin direnci azalmakta ve endojen glikoz üretimi azalmaktadır (85-86).

### **III. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **III.1. Deney Hayvanları ve Deney Protokolü**

Çalışmamızda ağırlıkları  $230\pm 20$  gr olan 21 adet Wistar cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edildi. Ratlar ortama uyum sağlamaları için deney başlangıcından bir hafta önce her grupta 7 adet olacak şekilde üç gruba randomize edildi. Gereksiz rat kullanımından kaçınmak maksadı ile kontrol grubu olarak kullanılmak üzere herhangi bir ilacın verilmediği bir grup oluşturulmadı. Ratlar sınırlama olmadan standart rat yemi (Bil Yem, Ankara) ve şehir şebeke suyu ile beslendi. Ortam ısı  $20-24$  °C arasında tutuldu ve gündüz-gece ışık siklusuna uyacak şekilde aydınlatıldı. Çalışmanın tüm prosedürleri için Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Komitesi'nden onay alındı.

8 hafta süreyle, 1. gruba (kontrol grubu) yalnızca CCl<sub>4</sub> için çözücü olarak kullanılan zeytinyağı, 2. gruba (model grup) yalnızca CCl<sub>4</sub>, 3. gruba (tedavi grubu) ise CCl<sub>4</sub>+RZG verildi. CCl<sub>4</sub> (Merck, Almanya) 1/6 oranında zeytinyağı ile karıştırılarak 1,5 ml/kg dozunda intraperitoneal yoldan haftada 3 kez verildi (96). RZG (Glaxo-Smith Kline) 1 mg/kg/gün dozunda gastrik gavaj yolu ile verildi (9).

#### **III.2. Kan ve Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Çalışılması**

Deney sonunda ratlar, ketamin anestezisi altında vena kavadan 5 ml kan alınmasını takiben 'ekssanguiasyon' metodu ile sakrifiye edildi ve karaciğer doku örnekleri

alındı. Doku örneklerinin bir parçası histopatolojik incelemeler için formaldehit solüsyonu içine konuldu. Kalan kısmı, daha sonra doku tetkikleri için kullanılmak üzere vakit kaybedilmeden -80 °C buzdolabına kaldırıldı. Kan örnekleri 5000 devirde 3 dakika santrifüje edilerek serumları ayrıldı ve serum alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri çalışıldı. ALT düzeyleri Image, Roche-Hitachi cihazında çalışıldı.

Karaciğer dokularında biyokimyasal yöntemlerle SOD ve CAT aktiviteleri ile birlikte malon dialdehid (MDA) ve hidroksi prolin (HYP) düzeyleri bakıldı. Donmuş karaciğer doku örnekleri tartılarak 50 mmol fosfat tampon içinde (pH 7.4) ve etrafında buzlu ortam olmak üzere homojenizatör cihazı ile homojenize edildi (Ultra Turrax T25, Staufen, Almanya). Homojenatın bir kısmı santrifüje edilerek üstte kalan kısımlarından süpernatant ayrıldı. Süpernatant ve homojenatlarından Lowry metodu ile protein içerikleri tespit edildi (87).

### **III.2.1 Antioksidan Parametrelerin Çalışılması**

#### **III.2.1.1. MDA düzeylerinin belirlenmesi:**

MDA düzeyleri, Draper ve Hadley' in (88) çift ısıtmalı metoduna göre çalışıldı. Bu yöntemin esası tiobarbitirik asidin (TBA), MDA ile girdiği reaksiyon sonucu oluşan renk değişiminin spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır. Bu amaçla 100 g/L TBA solüsyonundan 2.5 ml alınarak içinde 0.5 ml süpernatant bulunan santrifüj tüplerine eklendi. Tüpler 15 dakika kaynayan su banyosunda bekletildi. Daha sonra tüpler soğuk su ile soğutuldu ve 1000 devirde 10 dakika santrifüje edildi. Buradan 2 ml süpernatant alınarak, 6.7 g/L TBA solüsyonundan 1 ml içeren test

tüplerine aktarıldı ve tekrar kaynayan su içinde 15 dk bekletildi. Tüpler soğutulduktan sonra oluşan absorbans spektrofotometre cihazında (Shimadzu UV-1601, Kyoto, Japonya) 532 nm dalga boyunda ölçüldü. Bulunan değer absorbans katsayısı ile çarpılarak MDA konsantrasyonu hesaplandı. Sonuçlar nanomol/gram (nmol/g) protein olarak ifade edildi.

### **III.2.1.2. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi:**

Total (bakır-çinko ve mangan) süperoksit dismutaz (SOD, enzim kodu: EC 1.15.1.1) aktivitesi Sun ve arkadaşlarının tarif ettiği metoda göre çalışıldı (89). Bu metod, nitroblue tetrazoliumun (NBT) redüksiyonunun, bir süperoksit üreticisi olan ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından inhibe edilmesine dayanmaktadır. Aktivite 1 ml etanol/kloroform karışımına aynı miktarda örneğin karışımı ve santrifüje edilmesini takiben elde edilen süpernatanın etanol fazında ölçüldü. Elde edilen ürünün absorbans değeri spektrofotometre cihazında ölçüldü. Bir ünite SOD, NBT redüksiyonunu %50 oranında inhibe eden enzim miktarı olarak tanımlandı ve sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

### **III.2.1.3. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi:**

Katalaz (CAT, enzim kodu: EC 1.11.1.6) aktivitesi Aebi ve arkadaşlarının belirttiği modele göre çalışıldı (90). Metodun esası hidrojen peroksit ayrışımının katsayı oranının 'k' belirlenmesine dayanmaktadır. Enzimin katsayı oranı, dakika başına

absorbans değerindeki değişim ölçülerek hesaplandı. Sonuç k/g protein olarak ifade edildi.

### **3.2.2. Hidroksiprolin düzeylerinin belirlenmesi:**

Hidroksiprolin düzeyleri, rat karaciğerlerinden yanmış parçalarda, dehidratasyon ve hidroklorik asit ile hidroliz aşamalarını takiben Woessner' in metoduna göre çalışıldı (91).

### **III.2.3. Histopatolojik Değerlendirme**

'Hematoksilen-Eozin' ve 'Mason-Trikrom' boyamaları ile doku histolojisi incelenerek ve 'Ishak skorlaması' kullanılarak nekroinflamatuvar aktivite değerlendirildi. Ishak skorlama sistemi tablo 3' te gösterilmiştir (92).

### **III.3. İstatiksel Analiz**

Sonuçlar SPSS istatistik analiz programı yardımı ile Kruskall Wallis yöntemi ile değerlendirildi. Takiben gruplar arası karşılaştırmalar Mann Whitney U testi ile yapıldı.  $P < 0.017$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler ortalama değer  $\pm$  standart sapma ( $\pm$ sd) olarak gösterilmiştir.

**Tablo 3:** Ishak Modifiye Hepatit Aktivite İndeksi (HAI) Skorlama Sistemi

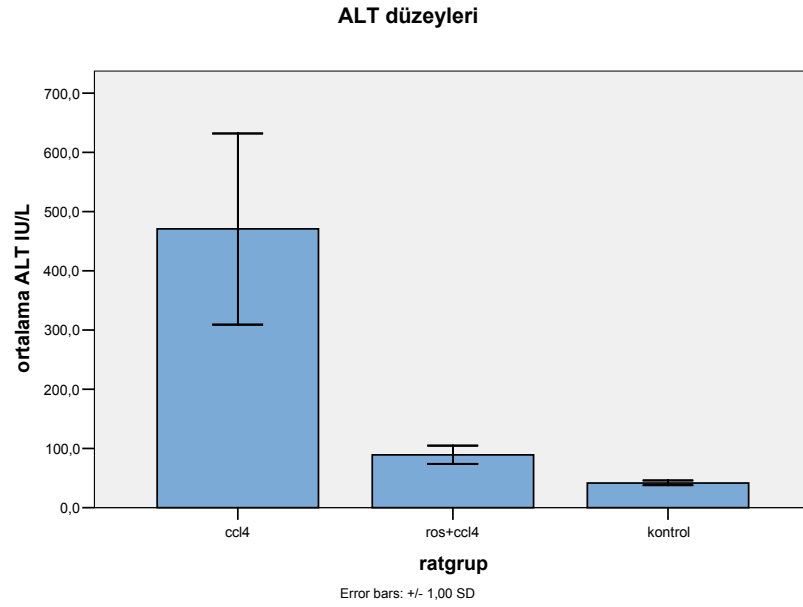
| <b>I-Nekroinflamatuvar Aktivite:</b>   | <b>Skor</b> |
|--|-------------|
| <b>a- Periportal veya periseptal interface hepatit (piecemeal nekroz):</b>                             |             |
| Yok  | 0           |
| Hafif (fokal, birkaç portal alan)  | 1           |
| Hafif/Orta (fokal, portal alanların çoğunda)   | 2           |
| Orta (septa veya traktların %50' sinden azının etrafında devam eden)                                   | 3           |
| Şiddetli (septa veya traktların %50' sinden fazlasının etrafında devam eden)                           | 4           |
| <b>b- Konfluent nekroz:</b>  |             |
| Yok  | 0           |
| Fokal konfluent nekroz   | 1           |
| Birkaç alanda Zon3 nekrozu   | 2           |
| Çok sayıda alanda Zon3 nekrozu   | 3           |
| Zon3 nekrozu + seyrek porto-santral köprüleşme nekrozu   | 4           |
| Zon3 nekrozu + çok sayıda porto-santral köprüleşme nekrozu   | 5           |
| Panasiner veya multiasiner nekroz  | 6           |
| <b>c- Fokal (spotty) litik nekroz, apopitoz ve fokal inflamasyon*</b>                                  |             |
| Yok  | 0           |
| Her x10 büyütmede bir odak   | 1           |
| Her x10 büyütmede 2-4 odak   | 2           |
| Her x10 büyütmede 5-10 odak  | 3           |
| Her x10 büyütmede 10' dan fazla odak   | 4           |
| <b>d- Portal İnflamasyon</b>   |             |
| Yok  | 0           |
| Hafif, portal alanların bazılarında veya tümünde   | 1           |
| Orta, portal alanların bazılarında veya tümünde  | 2           |
| Orta/Belirgin, portal alanların tümünde  | 3           |
| Belirgin, portal alanların tümünde   | 4           |
| <b>II- Fibrozis</b>  |             |
| Fibrozis yok   | 0           |
| Portal alanların bazılarında fibröz genişleme, kısa fibröz septalar ile birlikte veya değil            | 1           |
| Portal alanların çoğunda fibröz genişleme, kısa fibröz septalar ile birlikte veya değil                | 2           |
| Portal alanların çoğunda fibröz genişleme ile birlikte seyrek porto-portal köprüleşme var              | 3           |
| Portal alanlarda fibröz genişleme ve belirgin porto-portal köprüleşme ve/veya porto-santral köprüleşme | 4           |
| Belirgin porto-portal ve/veya porto-santral köprüleşme ile birlikte seyrek nodül formasyonu            | 5           |
| Çok sayıda nodül, siroz  | 6           |



#### IV. BULGULAR

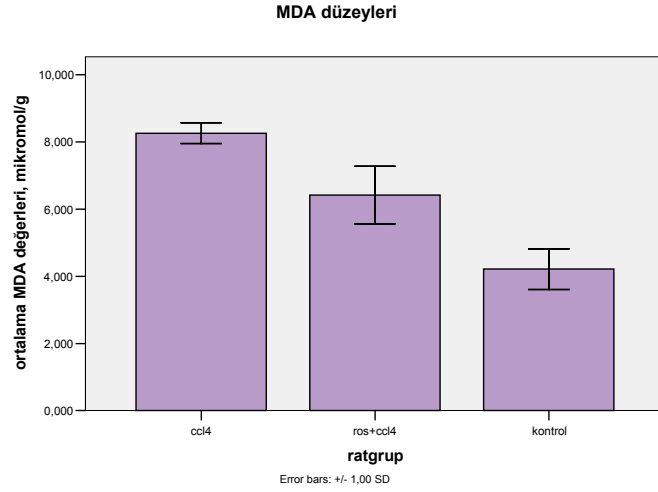
8 hafta sonunda CCl4 grubundaki ratlar zayıf, tüyleri kısmen dökülmüş ve az hareketli durumda idiler. RZG ile tedavi edilen gruptaki ratlar ise kontrol grubuna benzer şekilde sağlıklı görünümde idi.

ALT düzeyleri CCL4 grubunda diğer gruplardan belirgin olarak yüksek bulundu. Tedavi grubunda model gruptan oldukça düşük bulunmasına rağmen, tedavi grubu ile kontrol grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Şekil1).



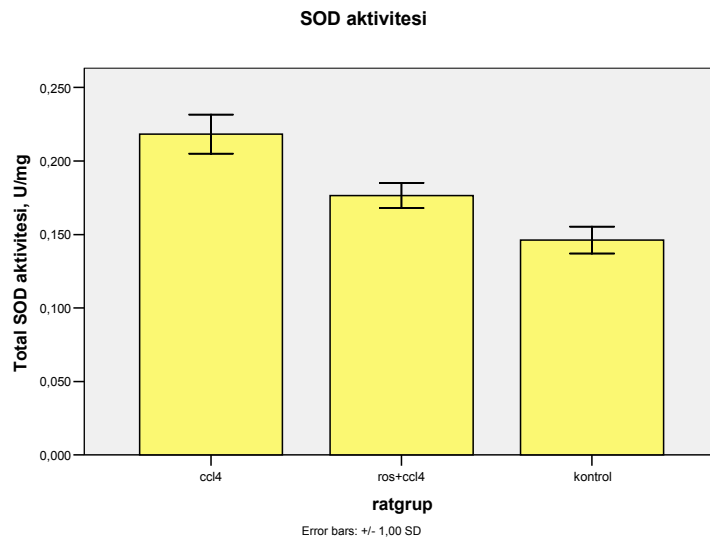
**Şekil 1:** Gruplara göre ALT düzeylerinin grafik ile gösterilmesi

MDA düzeyleri CCl4 grubunda diğer gruplardan yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). CCl4+RZG grubunda ise CCl4 grubundan anlamlı derecede düşük olmasına rağmen kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu (Şekil2).



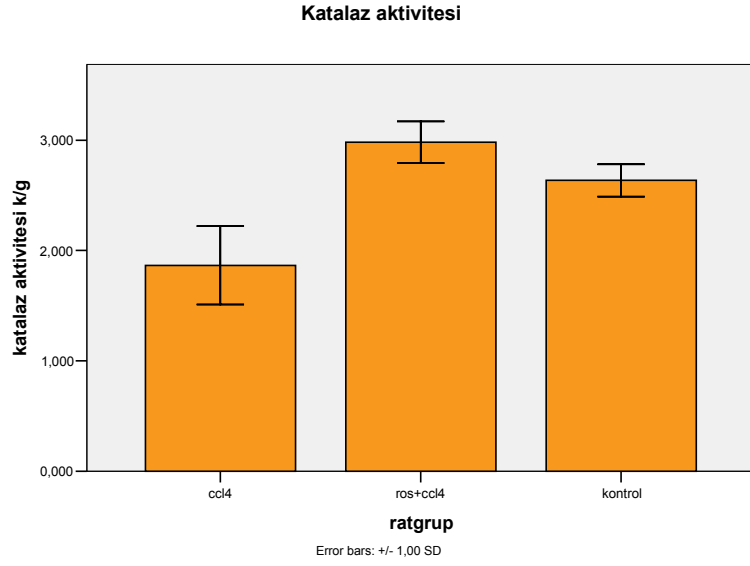
**Şekil 2:** Gruplara göre MDA düzeylerinin grafik ile gösterilmesi

SOD aktivitesi için sonuçlar istatistiksel açıdan MDA düzeyleri ile benzer şekilde tedavi grubunda, CCl4 grubundan anlamlı olarak düşük ancak kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulundu (Şekil 3).



**Şekil 3:** Gruplara göre SOD aktivitesinin grafik ile gösterilmesi

CCl4 grubunda CAT aktivitesi diğer gruplardan anlamlı derecede düşük bulundu. Tedavi grubunda ise model gruptan düşük, kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek saptandı (Şekil 4).



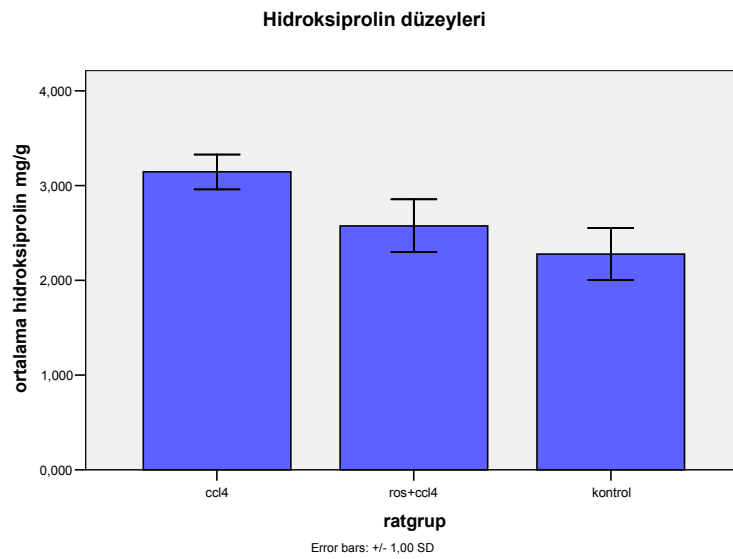
Şekil 4: Gruplara göre CAT aktivitesinin grafik ile gösterilmesi

ALT, MDA, SOD, CAT sonuçları ve bu sonuçlara ilişkin istatistik sonuçları Tablo 3’te gösterilmiştir.

**Tablo 3:** ALT ve MDA düzeyleri, SOD ve CAT aktivite sonuçları ile 'P' değerleri

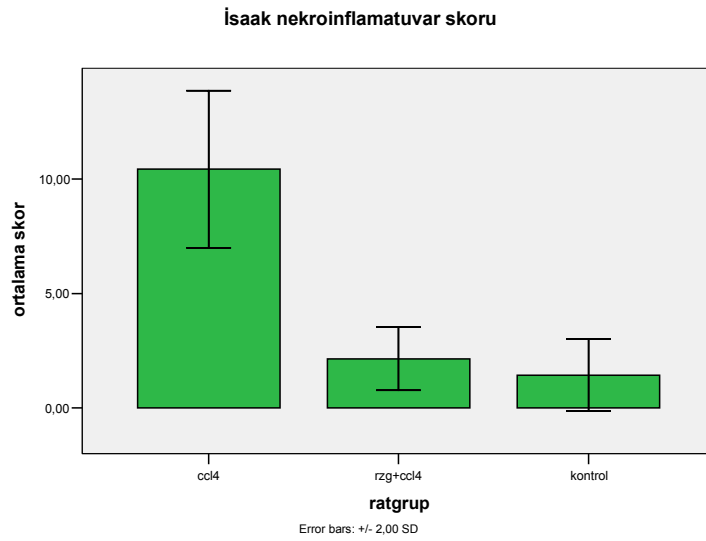
| Gruplar                 | ALT           | MDA          | SOD         | CAT         |
|-------------------------|---------------|--------------|-------------|-------------|
|                         | (IU/L±sd)     | (µmol/g ±sd) | (U/mg ±sd)  | (κ/g ±sd)   |
| Grup I: Kontrol         | 41,8 (4,0)    | 4,20 (0,60)  | 0,14 (0,01) | 2,63 (0,14) |
| Grup II: CCl4           | 470,4 (161,2) | 8,25 (0,30)  | 0,21 (0,01) | 1,86 (0,35) |
| Grup III: CCl4+RZG      | 89,2 (15,2)   | 6,41 (0,85)  | 0,17 (0,01) | 2,98 (0,18) |
| <b>P değerleri, K-W</b> | <0.001        | <0.001       | <0.001      | <0.001      |
| I vs II                 | 0,001         | 0,001        | 0,001       | 0,001       |
| I vs III                | 0,001         | 0,001        | 0,001       | 0,002       |
| II vs III               | 0,001         | 0,001        | 0,001       | 0,001       |

HYP düzeyleri CCl4 grubunda diğer gruplardan yüksek bulunurken tedavi ve kontrol grupları arasında istatistiki açıdan anlamlı fark saptanmadı (Şekil5).

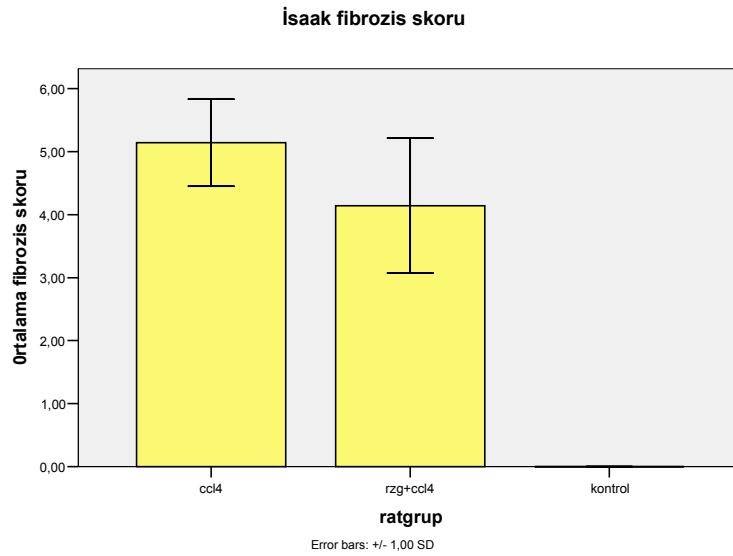


**Şekil 5:** Gruplara göre HYP düzeylerinin grafik ile gösterilmesi

Histopatolojik incelemede Ishak skorlaması kullanılarak yapılan değerlendirme sonucunda CCl4 grubundaki nekroinflamatuvar aktivite diğer tüm gruplardan anlamlı derecede yüksek bulundu. Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. Bununla birlikte Ishak fibrozis skoru hem model hem de tedavi grubunda kontrol grubundan belirgin derecede yüksek hesaplandı. Ancak yine de tedavi grubu ile model grubu arasındaki fark anlamlı olarak saptandı (Şekil 6, 7).



**Şekil 6:** Gruplara göre Ishak nekroinflamasyon skorlarının grafik ile gösterilmesi

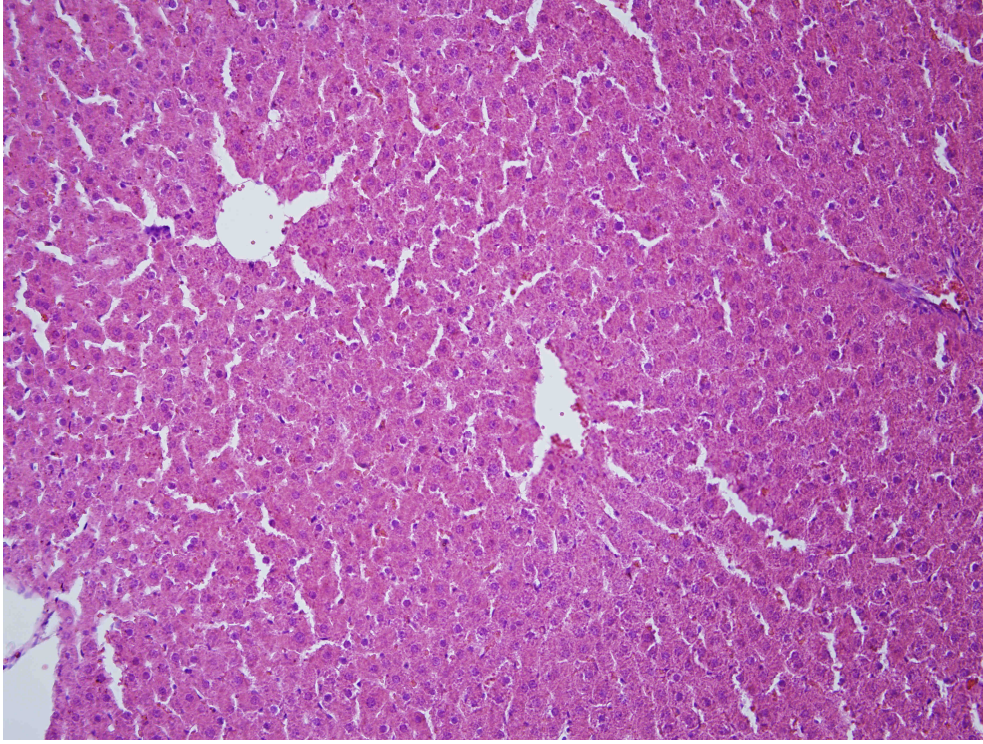


**Şekil 7:** Gruplara göre Ishak fibrozis skorlarının grafik ile gösterilmesi

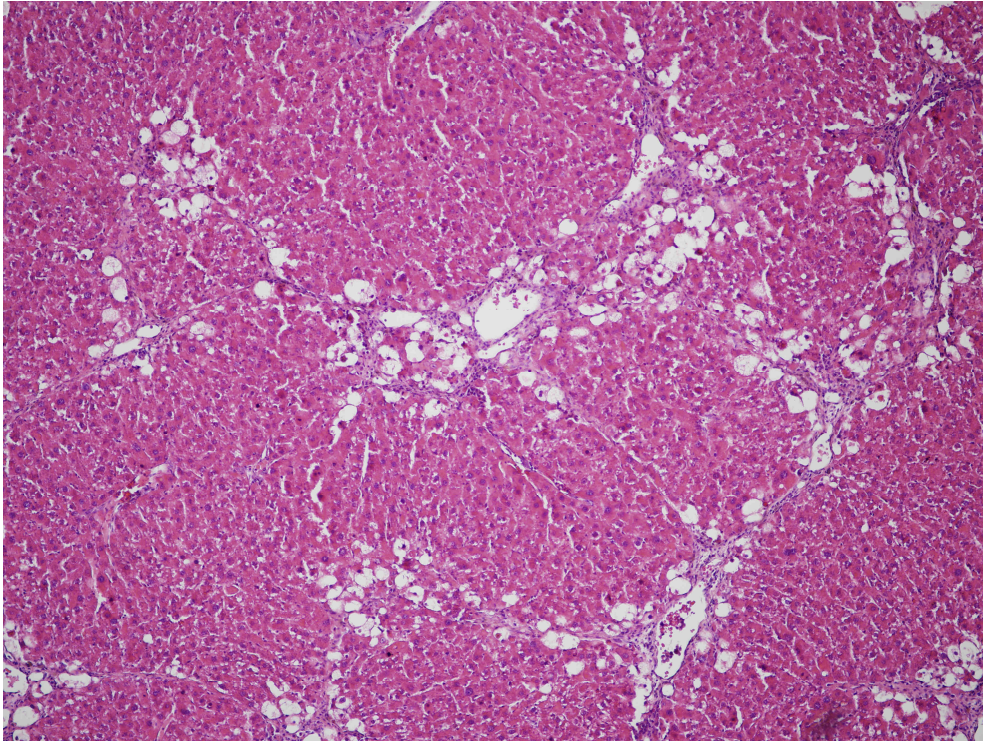
Hidroksiprolin düzeyleri ve histopatolojik değerlendirme sonuçları ve bu sonuçlara ait istatistik değerlendirme sonuçları Tablo 4’ te toplu olarak gösterilmiştir. Gruplara ait histopatolojik görüntü örnekleri Şekil 8-12 de gösterilmiştir.

**Tablo 4:** Hidroksiprolin düzeyleri ve histopatolojik değerlendirme sonuçları ile birlikte ‘P’ değerleri

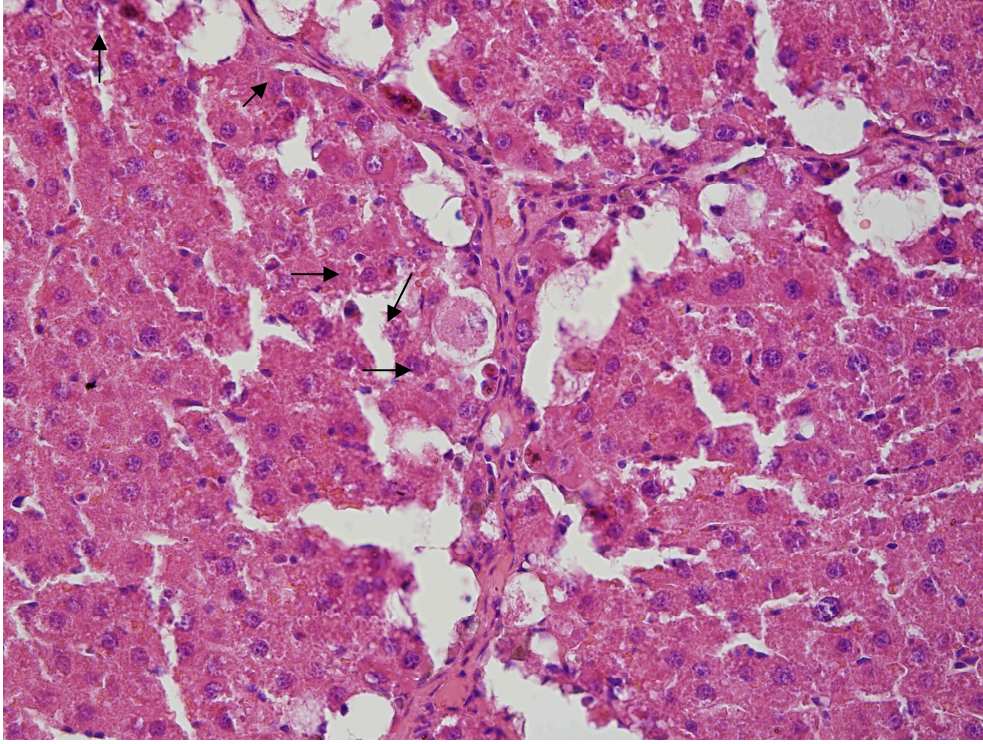
| <b>Gruplar</b>   | <b>HYP<br/>(<math>\mu\text{mol/g} \pm\text{sd}</math>)</b> | <b>Ishak HAI<br/>skoru (<math>\pm\text{sd}</math>)</b> | <b>Ishak fibrozis<br/>skoru<br/>(<math>\pm\text{sd}</math>)</b> |
|------------------|--|--|---|
| Grup 1: Kontrol  | 2,27 (0,27)  | 1,42 (0,7)   | 0,0 (0,0)   |
| Grup 2: CCl4     | 3,14 (0,18)  | 10,42 (1,7)  | 5,1 (0,7)   |
| Grup 3: CCl4+RZG | 2,57 (0,27)  | 2,14 (0,7)   | 4,1 (1,0)   |
| P değerleri, K-W | 0.001  | <0,001   | <0,001  |
| I vs II          | 0.001  | 0,001  | 0,001   |
| I vs III         | 0,097  | 0,097  | 0,001   |
| II vs III        | 0,002  | 0,001  | 0,073   |



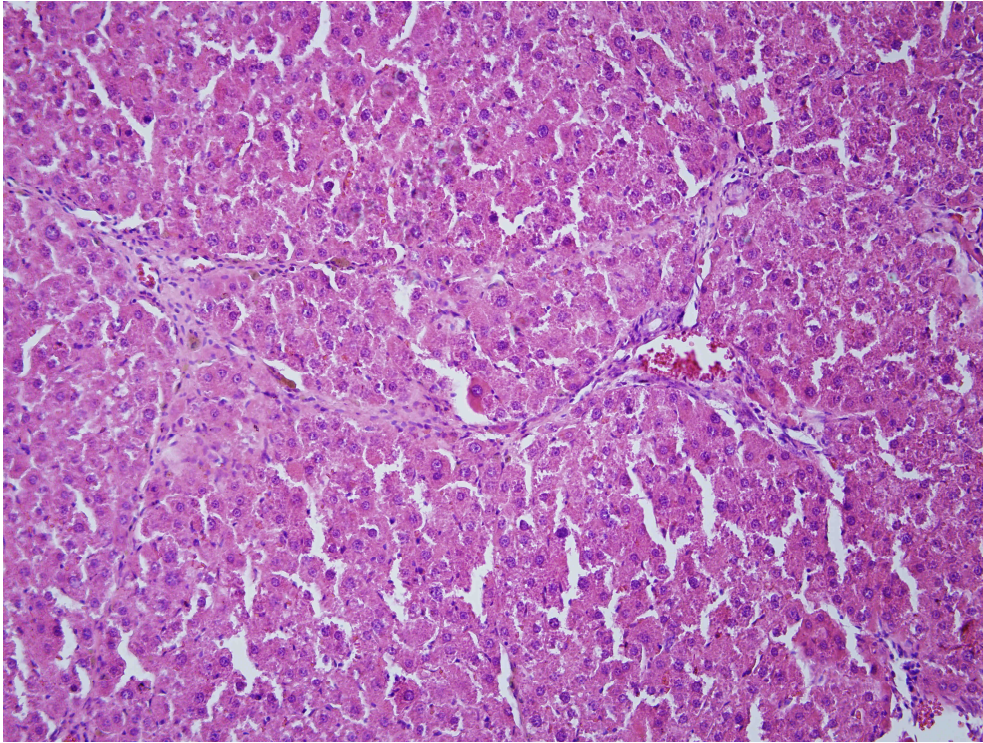
**Şekil 8:** Kontrol grup, HE X200, normal karaciğer dokusu



**Şekil 9a:** Model grup, HE X100, porto-porta uzanan bağ dokusu bantları, periportal alanlarda ve bağ dokusu etrafında inflamasyon ve belirgin makroveziküler yağlanma

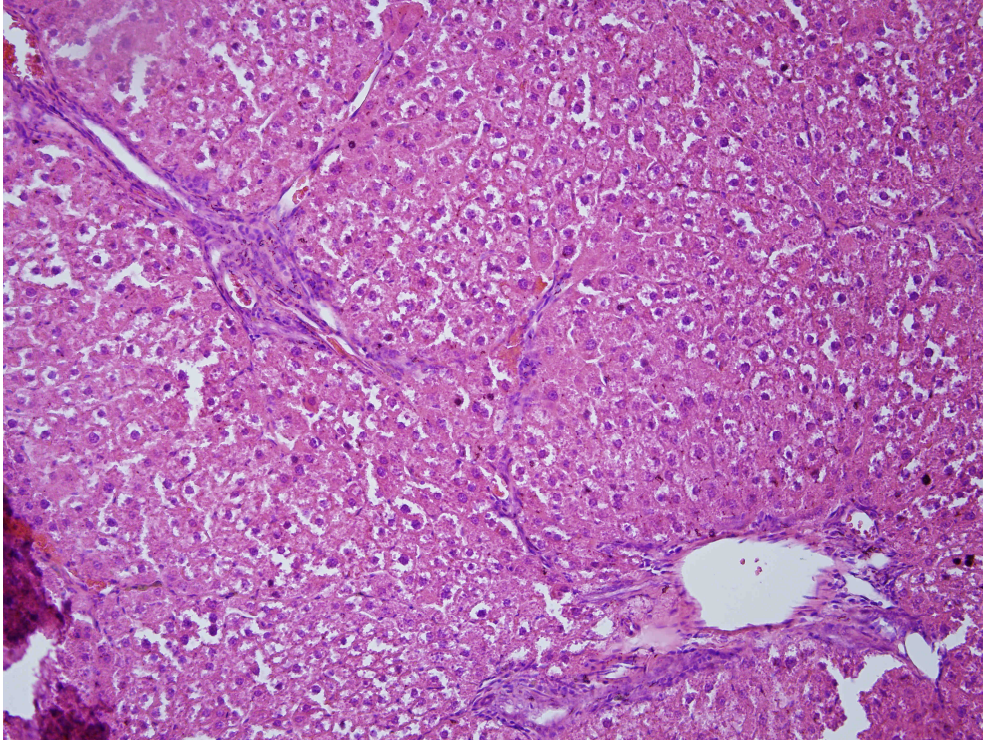


**Şekil 9b:** Model grup, HE X400, apoptozise uğramış hepatositler ok işaretleri ile gösterilmiştir.



**Şekil 10a:** RZG + CCl<sub>4</sub>, HE X200, bağ dokusu bantları daha az sayıda, yağlanma izlenmiyor





**Şekil 10b:** RZG + CCl<sub>4</sub> grubuna ait başka bir karaciğer kesidi, HE X200, şekil 10a' da olduğu gibi bu kesitte de bağ dokusu bantları daha az sayıda, yağlanma izlenmiyor

## V. TARTIŞMA

RZG tip 2 diyabetli hastaların tedavisinde kullanılan ve PPAR- $\gamma$  reseptörleri üzerinden insülin direncini azaltarak etki gösteren bir ilaçtır. Son yıllarda RZG'un anti-diyabetik özelliğinin haricindeki diğer etkileri gittikçe artan oranda dikkat çekmektedir. Bu çalışma RZG isimli ilacın ratlarda, tamamen ortadan kaldıramasa da, antioksidan özelliklerinin de yardımı ile inflamasyonu azaltarak HF gelişimini yavaşlattığını ve ratların genel durumlarının ve karaciğer rezervlerinin korunmasına katkıda bulunduğunu göstermiştir.

Karaciğer fibrozisinin progresyonunun yavaşlatılması ile kronik karaciğer hastalarda beklenen yaşam süresinin artması ve karaciğer transplantasyonu ihtiyacının azalması beklenebilir. Son birkaç dekat içinde yapılmış olan birçok çalışma sayesinde karaciğer fibrozisinin hücrel ve moleküler mekanizmaları ayrıntılı olarak anlaşılabilmiştir (3). Karaciğer hücrelerinde veya safra yollarında bir hasarlanma olduğunda, mezenkimal kaynaklı hücreler aktive olarak myofibroblast benzeri bir fenotip kazanmakta ve proliferatif, ECM üreten, çeşitli sitokinler salgılayan hücelere dönüşmektedirler ve böylece progresif olarak fibrotik dokunun birikmesi ile sonuçlanan bir yara iyileşmesi yanıtı oluşmaktadır. Myofibroblast benzeri hücrelerin en büyük kaynağının, aktive HSH' ler olduğu belirtilmektedir (1,25).

Bununla birlikte, bu kadar bilgi birikimine rağmen, karaciğer fibrozisinin tedavisi için henüz hiçbir ilaç onaylanmamıştır. TZD' lar ile yapılmış olan birkaç çalışmada hepatik fibrozis üzerine olumlu etkiler bildirilmiş ve bu ilaçların hepatik fibrozis tedavisinde umut vaat eden yeni bir grup olabileceği belirtilmektedir (93).

Tiazolidinedionların bağlanma yerleri olan PPAR- $\gamma$  reseptörleri diğer PPAR- $\alpha$  ve - $\beta$  ile birlikte çekirdek reseptörleri süperaillesinin üyeleridir. Bu reseptör ailesinin üyelerine spesifik ligandlarının bağlanmaları bir çok genin ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır (84,94). Diğer PPAR' larda olduğu gibi, PPAR- $\gamma$  reseptörü ilgili ligandın bağlanması ile birlikte retinoid x reseptörü (RXR) ile heterodimerize olarak hedef DNA sekansına bağlanmaktadır. PPAR- $\gamma$  reseptörleri bazı genlerin ekspresyonunda artışa yol açtığı gibi bazı transkripsiyon faktörlerinin de gen transkripsiyonlarını baskılayabilmektedir. Örneğin NF- $\kappa$ B' nin gen transkripsiyonunu, hedef DNA sekansına bağlanmasından bağımsız olarak baskılayabilmektedir (94). PPAR- $\gamma$  reseptörleri diğer birçok dokuda düşük düzeylerde eksprese edilirken adipoz dokuda yüksek düzeylerde eksprese edilmektedir. TZD' ların insülin duyarlılaştırıcı etkileri multifaktöryel olmakla birlikte tam olarak anlaşılammıştır. Yağ dokusunda yağ asitlerinin depolanmasında artma ile birlikte, anti-inflamatuvar ve antifibrotik özellikleri olan adiponektinin önemli bir rolü olabileceği belirtilmektedir (84,93).

Karaciğer fibrozisi ile PPAR- $\gamma$  arasındaki ilişki, ilk olarak aynı yıl içinde, birbirinden bağımsız 3 çalışmada, sessiz HSH' lerde bu reseptörün eksprese edildiğinin gösterilmesi ile ortaya konmuştur. Yine bu çalışmalarda, fibrogenez sırasında HSH' lerin aktive olarak fibrogenik özellik kazanmaları ile birlikte bu reseptörlerin

ekspresyonlarının ve transkripsiyon aktivitelerinin azaldığı gösterilmiştir (6-8). Ayrıca, HSH'lerin, aktive olduklarında kazandıkları bir takım özelliklerin TZD maruziyeti sonrasında geri döndüğü de görülmüştür. HSH'lerin PDGF'e yanıt olarak sergiledikleri proliferasyon ve migrasyon yeteneklerinin inhibe olduğu, kollajen sentezinin azaldığı, proinflamatuvar sitokinlerin salınmasının engellendiği ve HSH apoptozisinin uyarıldığı gözlenmiştir (6-9).

Tiazolidinedionların antifibrotik olarak etkilerinin olduğunu gösteren in vitro çalışmaların ardından deneysel çalışmalarla karaciğer hasarında onarıcı etkileri ile ilgili deneysel in vivo çalışmalar yapılmıştır. Galli ve arkadaşları, gerek CCl4 verilerek gerekse de safra kanalı bağlanarak oluşturulan deneysel hepatik fibrozis modelinde, hem raziglitazon hem de pioglitazonun fibrotik doku birikimini ve fibrogenik hücrelerin proliferasyonunu engellediğini göstermiştir (9). Başka bir çalışmada pioglitazonun, deneysel steatohepatit modelinde fibrozis formasyonunu azalttığı görülmüştür (10). TZD'lerin fibrozis oluşumunu azaltmalarında, TGF- $\beta$ , prokollajen-1, fibronektin ve TIMP'lerin ekspresyonlarının azalması gibi olaylar rol oynamaktadır (93). Akut CCl4 toksisitesi oluşturulan deneysel hayvan modelinde, TZD tedavisi ile serum transaminazlarının ve TNF- $\alpha$  düzeylerinin düştüğü ve nekroinflamatuvar yanıtların baskılandığı görülmüştür (11). Ek olarak, safra kanalı bağlanarak oluşturulan kronik kolestaz modelinde, TZD tedavisi ile safra kanaliküllerinde inflamatuvar reaksiyonu azalttığı ve fibrogenik myofibroblastların proliferasyonunun inhibe edildiği izlenmiştir (95). Bu bulgular TZD'lerin, karaciğer fibrozisinde, antifibrotik olarak etkili olabilecek bir ilaç olduğunu desteklemektedir.

Her ne kadar TZD' ların antifibrotik etkileri gösterilmiş olsa da, bu etkilerinde antioksidan özelliklerinin katkısının olup olmadığının üzerinde durulmamıştır. ROS' nin karaciğer fibrozisinde, HSH' lerin uyarılması ve hepatosit hasarlanması olaylarında rol aldıklarından daha önce bahsedilmişti. Bu verilerle ilgili olarak, daha önce yapılmış bazı çalışmalarda oksidatif stresin azaltılması ile hepatik fibrozisin azaltılabileceği gösterilmiştir. Örneğin, Peng ve arkadaşları, CCl4 ile oluşturulan fibrozis modelinde, talidomid tedavisi ile oksidatif stresin azalması ile birlikte fibrozisin azaldığını göstermişlerdir (96). Diğer taraftan TZD' ların, karaciğer dışı dokularda, çeşitli hasar nedenlerine karşı oluşan oksidatif stresi azalttıklarına dair yayınlar da bulunmaktadır (14,15). Bununla birlikte Toyama ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PPAR- $\alpha$  ligandları olan WY-14,643 isimli madde ile fenofibratın antioksidan özellikler sergileyerek antifibrotik etkiler gösterdikleri belirtilmiştir (97). Biz de yaptığımız bu çalışma ile bir PPAR- $\gamma$  ligandı olan RZG' un hepatik fibrozis üzerine etkilerini değerlendirmekle birlikte, bu etkilerinde antioksidan özelliğinin katkısının olup olmadığını araştırdık.

Sekiz haftalık deney süresi sonunda yalnızca CCl4 verilen model gruptaki ratlar daha hareketsiz ve tüyleri kısmen dökülmüş durumda idi. Buna karşılık RZG ile tedavi edilen gruptaki ratlar ise kontrol grubuna benzer şekilde daha sağlıklı görünüyorlardı. Bu durum laboratuvar bulgularının, ratların genel durumlarına olumlu yansımaları olarak değerlendirilmiştir.

ALT enziminde yükselme, karaciğerde oluşan inflamasyonun ve hepatosit hasarının oldukça hassas ve değerli bir bulgusudur. Deney sonunda ratlardan alınan kan örneklerinden çalıştığımız serum ALT düzeyleri, daha önce yapılmış çalışmalarla

uyumlu olarak, model grupta oldukça yüksek bulundu. Buna karşılık tedavi grubundaki ALT düzeyleri model gruba göre oldukça düşük bulundu. Ancak yine de tedavi grubundaki ALT düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü. ALT düzeylerinin model grupta çok yüksek olması model grupta inflamasyonunun yoğun olarak devam ettiğini göstermektedir. Tedavi grubundaki ALT düzeyleri, inflamasyonun model gruba göre belirgin olarak baskılandığını ancak hafif derecede inflamasyonun mevcut olduğunu düşündürmektedir.

ROS, membranda bulunan özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olarak membran bütünlüğünün bozulmasına neden olabilir; hücre için hayati derecede öneme sahip proteinlere bağlanarak bu proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerini etkileyebilir; diğer taraftan DNA ile etkileşime girerek hücrelere ciddi zararlar verebilir (18-20). MDA, ROS' nin fosfolipidler ile reaksiyona girmeleri sonucu ortaya çıkan lipid peroksidasyon ürünlerinden biridir (88). Hücre membranlarının yüksek lipid içeriği göz önüne alındığında özellikle membran hasarını göstermede önemli bir parametredir. Lipid peroksidasyonu nedeniyle membran geçirgenliğinde bir bozulma olması, NA-K ATPase enzim aktivitesinde bozulmaya yol açabilmektedir. Bunun sonucu olarak protein sentezi için hayati öneme sahip olan  $K^+$  ve  $Mg^{2+}$  düzeylerinde değişimler olabilmekte ve protein sentezi inhibe olabilmektedir. Ayrıca artmış lipid peroksidasyonu, proteolitik lizozomal enzimlerin ve mitokondriyal matriks enzimlerinin sitoplazma içine salınmasına sebep olabilmekte ve bu da hücre içi proteinlerin yıkılmasına ve hücre ölümüne yol açabilmektedir (18-20). Bu durumda özellikle hücrelerin sıvı ortamlarında CAT, SOD, glutatyon peroksidaz gibi enzimleri içeren vücudun antioksidan savunma sisteminin önemi ortaya çıkmaktadır. Eğer antioksidan savunma sistemi ROS' ni

yeteri kadar zararsızlaştıramazsa, ROS' nin bahsedilen toksik etkilerine maruz kalınabilir (18). Ayrıca saydığımız direkt toksik etkilerinin haricinde, ROS, indirekt olarak HSH' lerin uyarılmasına, TGF- $\beta$  üretimine ve nükleer faktör-  $\kappa$ B' nin aktivasyonu ile inflamatuvar ve fibrotik süreçlerin uyarılmasına sebep olabilir (61).

Çalışmamızın sonuçlarında model grupta MDA düzeyleri tedavi ve kontrol gruplarına göre belirgin derecede artmış olarak bulundu. Tedavi grubunda ise kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek olmasına rağmen model gruptan anlamlı derecede düşük bulundu. Bu da göstermektedir ki, RZG antioksidan sistemin desteklenmesinde başarılı olmuş ve daha az lipit peroksidasyonu ürünü ortaya çıkmıştır. Bunun neticesi olarak inflamasyon daha az şiddetli olmuş ve ALT düzeyleri de tedavi grubunda model gruptan düşük bulunmuştur.

Nitekim SOD aktivitesi model grupta inflamasyona bağlı olarak diğer gruplardan yüksek bulunmuştur. Tedavi grubunda model gruptan daha düşük bulunmuştur ancak kontrol grubuna yaklaştıramamıştır. Tedavi ile açığa çıkan ROS'un önemli bir kısmının bloke olduğu, bu yolla SOD için substrat niteliğinde olan süperoksit radikallerinin daha az oluşarak SOD enziminin artışının bu yolla engellenmiş olabileceği ihtimal dahilindedir. Biraz daha açacak olursak, kullandığımız ajan antioksidan sistemin önemli bir elemanı olan SOD aktivitesini direkt olarak azaltarak antioksidan sistemi zayıflatmamakta, tersine enzimin substratı üzerinden enzim aktivitesinin daha az ölçülmesine neden olmaktadır. SOD enziminin hücrelerde bulunabilen 3 tipi bulunmaktadır (Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, ekstrasellüler SOD). Bunlardan sadece mangan SOD enzimi indüklenebilir niteliktedir. Biz çalışmamızda alt izozimleri çalışmadığımızdan gruplardaki artma ve azalmaların hangi formu

üzerinden olduğunu mevcut bilgilerimizle tahmin etmemiz güçtür. CAT aktivitesi ise inflamasyon ortamında enzimin büyük kısmı ROS ile bağlı olduğu için model grupta diğer gruplardan belirgin olarak düşük bulunmuştur. Tedavi grubunda ise enzim aktivitesi korunmuş ve kontrol grubundan yüksek bulunmuştur. CAT enzimi, substrat olarak SOD enziminin ürününü ( $H_2O_2$ -hidrojen peroksit) kullanmaktadır. Fakat hücrelerdeki hidrojen peroksitin tek kaynağı SOD enzimi değildir. Başka kaynaklardan da gelmesi (peroksizomlar, sitokrom P450 sistemleri, prostaglandinlerin sentezi vb.) ihtimal dahilindedir. Aynı şekilde hidrojen peroksitin hücreler tarafından yok edilmesi de birçok farklı kanalla yapılabilmektedir. Bunlardan birisi glutatyon peroksidaz enzimi diğeri ise bazı enzimatik olmayan süreçlerdir. Dolayısıyla Grup II’de görülen CAT aktivite azalmasını diğer sistemleri de göz önüne alarak yorumlamak gerekir. Muhtemelen diğer sistemler CAT enziminde daha etkin bir şekilde detoksifikasyon sürecine katkıda bulunmuş ve finalde CAT aktivitesi düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar, RZG tedavisi ile antioksidan sistemin desteklendiğini göstermektedir ve MDA düzeylerinin tedavi grubunda düşük bulunmasını açıklamaktadır.

Hidroksiprolin kollajenin yapıtaşlarından biridir ve doku kollajen birikiminin belirlenmesinde ‘altın standart’ olarak kabul edilen bir parametredir (93). Hidroksiprolin düzeyleri model grupta, tedavi ve kontrol gruplarından belirgin olarak daha yüksek bulunmuştur. Buna karşılık hidroksiprolin düzeyleri açısından tedavi grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Dolayısı ile RZG ile tedavi edilen grupta kollajen birikimi belirgin olarak önlenmiştir.



Son olarak histopatolojik inceleme sonucunda, bu laboratuvar bulgularının yansması olarak RZG ile tedavi edilen grupta yapısal bozulmaların daha az olduğu görülmüştür. ALT düzeyleri sonuçlarını destekler nitelikte Ishak nekroinflamasyon skoru model grupta, diğer iki gruptan oldukça yüksek bulundu. RZG ile tedavi edilen grupta ise inflamasyonun büyük oranda baskılandığı görüldü ve nekroinflamasyon skoru açısından tedavi ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Karaciğer fibrozisinin, inflamatuvar sürecin kronikleşmesinin bir sonucu olduğu düşünülürse, inflamasyonun baskılanması ile fibrozisinde önlenebileceği beklenebilir. Bizim çalışmamızda model grupta Ishak fibrozis skoru kontrol grubuna göre oldukça yüksek bulundu. Tedavi grubunda ise fibrozis skorunun model gruptan bir miktar düşük olduğu izlendi ancak bu düşmenin istatistiksel anlamlılık seviyesine ulaşmadığı görüldü. RZG tedavisi ile inflamasyonun etkili bir biçimde baskılanmasına rağmen karaciğer fibrozisinin bir miktar daha az oluştuğu ancak önlenemediği tespit edildi.

Sonuç olarak, tüm bu olumlu bulgulara rağmen histopatolojik incelemede, tedavi grubunda model gruba göre bir miktar daha az oluştuğu görülse de, hepatik fibrozisin engellenemediği görülmüştür. Biz bu noktada inflamatuvar sürecin azalmasından etkilenmeyen çeşitli sitokin ve/veya medyatörlerin fibrotik süreci devam ettirdiğini düşünüyoruz. Bununla birlikte RZG' un antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle karaciğerde fibrozisin nedeni olan inflamasyonu baskıladığı tespit edilmiştir. Bu bulguların klinik pratiğe yansması açısından, RZG'un HF gelişimini ortadan kaldırmaya da azaltılabileceği veya süreci yavaşlatarak hastaların prognozunu

iyileştirebileceği sonucunun çıkarılabileceğini düşünmekteyiz. Ancak bu sonuca ulaşabilmek için çalışmamızın daha geniş ve moleküler düzeyde çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

## VI. ÖZET

PPAR- $\gamma$  agonistlerinin antifibrotik etkileri olduğunu gösteren çeşitli yayınlar bulunmaktadır. Biz bu çalışmamızda deneysel hepatik fibrozis modelinde roziglitazonun (RZG) HF gelişimini etkileyip etkilemediğini araştırmayı amaçladık.

Yirmibir adet Wistar cinsi erkek rat 7'şerli 3 gruba ayrıldı. 8 hafta süreyle, 1. gruba CCl<sub>4</sub> için çözücü olarak kullanılan zeytinyağı, 2. gruba yalnızca CCl<sub>4</sub>, 3. gruba CCl<sub>4</sub>+RZG verildi. Serum ALT düzeyleri, karaciğer dokularında süperoksitdismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri ile malondialdehid (MDA) ve hidroksiprolin (HYP) düzeyleri bakıldı. Karaciğer histopatolojisi 'Ishak skorlaması' kullanılarak değerlendirildi. Bulunan sonuçların istatistiksel analizi SPSS bilgisayar programı ile yapıldı.

Deney sonunda CCl<sub>4</sub> grubundaki ratlar zayıf, az hareketli durumdaydı. RZG ile tedavi edilen gruptaki ratlar ise kontroller gibi sağlıklı görünümdeydi. ALT düzeyleri CCl<sub>4</sub> grubunda diğer gruplardan yüksek bulundu. Tedavi grubunda model gruptan düşük ancak kontrol grubundan yüksek bulundu. MDA düzeyleri CCl<sub>4</sub> grubunda diğer gruplardan yüksek bulundu. CCl<sub>4</sub>+RZG tedavi grubunda ise kontrol grubundan yüksek bulundu. SOD tedavi grubunda, CCl<sub>4</sub> grubundan düşük ancak kontrol grubundan yüksek bulundu. CCl<sub>4</sub> grubunda CAT aktivitesi diğer gruplardan anlamlı derecede düşük bulundu. Tedavi grubunda ise kontrol grubundan yüksek saptandı. HYP düzeyleri CCl<sub>4</sub> grubunda diğer gruplardan yüksek bulunurken tedavi ve kontrol

grupları arasında fark saptanmadı. Ishak skorlaması sonucunda CCl4 grubundaki nekroinflamatuvar aktivite diğer gruplardan yüksek bulundu. Diğer gruplar arasında fark bulunamadı. Bununla birlikte Ishak fibrozis skoru hem model hem de tedavi grubunda kontrol grubundan yüksek hesaplandı. Tedavi grubunda model gruptan düşük bulunmasına rağmen aradaki fark anlamlı olarak bulunmadı.

Sonuç olarak, RZG' un inflamasyonun ve oksidatif stres parametrelerinin baskılanmasında etkili olduğu görülmüştür. Buna ilaveten karaciğer fibrozisinin sınırlı olarak önlenebildiği tespit edilmiştir.

## VII. ABSTRACT

Peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) agonists have been shown to prevent hepatic fibrosis in rodents. In this study, we evaluated therapeutic antifibrotic potential of PPAR- $\gamma$  agonist rosiglitazone (RZG) and its antioxidant properties.

Twentyone male Wistar albino rats were randomised into three groups. Group1 control, Group2 received carbontetrachloride (CCl<sub>4</sub>), and Goup3 received CCl<sub>4</sub>+RZG. At the end of 8 weeks, serum alanineaminotransferase (ALT), tissue malondialdehyde (MDA), hydroxyproline (HYP) levels, activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase enzymes measured. Liver histopatology was assesed by Ishak's scoring system.

ALT and MDA levels were higher in group2 than in both other groups, but also higher in group3 than controls. SOD activity was higher in group2 than other groups, and higher in group3 than controls. The CAT activity was lower in group2 than others, but also higher in group3 than controls. HYP levels were higher in group2 than other groups, however, there is no significant difference between others. The Ishak necroinflammation score was higher in group2 than other groups, however, there is no significant difference between other groups. The Ishak fibrosis score was higher in group2 and group3 than controls. It was lower in goup3 than group2 but there is no significant difference between these groups.

In conclusion, RZG treatment was effective on suppression of inflammation as well as oxidative stress parameters in the liver. Also, liver fibrosis was limited prevented by RZG treatment. This study showed that, RZG may be an useful therapeutic agent in liver fibrosis and antioxidant properties of RZG contributes of its antifibrotic effects.

## VIII. KAYNAKLAR

1. Friedman SL. Hepatic Fibrosis Jn: Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC editors. Schiff's Diseases of the Liver, 10th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007:395-418
2. Friedman SL. Liver fibrosis — from bench to bedside. *J Hepatol* 2003;38(Suppl. 1): S38–53.
3. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115: 209–31.
4. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007;117: 539–48.
5. Bortolotti F, Guido M. Reversal of liver cirrhosis: a desirable clinical outcome and its pathogenic background. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;44(4):401-6.
6. Galli A, Crabb D, Price D, Ceni E, Salzano R, Surrenti C, Casini A. Peroxisome proliferator-activated gamma transcriptional regulation is involved in platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;119:466-78.
7. Marra F, Efsen E, Romanelli RG, Caligiuri A, Pastacaldi S, Batignani G, Bonacchi A, Caporale R, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulate profibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;119(2):466-78.
8. Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee HF Jr, Motomura K, Anania FA, Willson TM, Tsukamoto H. Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* 2000;275(46):35715-22.

9. Galli A, Crabb DW, Ceni E, Salzano R, Mello T, Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Trozzi L, Surrenti C, Casini A. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro. *Gastroenterology* 2002;122(7):1924-40.
10. Kawaguchi K, Sakaida I, Tsuchiya M, Omori K, Takami T, Okita K. Pioglitazone prevents hepatic steatosis, fibrosis, and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315(1):187-95.
11. Kon K, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Enomoto N, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Pioglitazone prevents early-phase hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291(1):55-61.
12. Leclercq IA, Sempoux C, Stärkel P, Horsmans Y. Limited therapeutic efficacy of pioglitazone on progression of hepatic fibrosis in rats. *Gut* 2006;55(7):1020-9.
13. Prosser CC, Yen RD, Wu J. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: where are we? *World J Gastroenterol* 2006;12(4):509-15.
14. Kamijo Y, Hora K, Nakajima T, Kono K, Takahashi K, Ito Y, Higuchi M, Kiyosawa K, Shigematsu H, Gonzalez FJ, Aoyama T. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against glomerulonephritis induced by long-term exposure to the plasticizer di-(2-ethylhexyl)phthalate. *J Am Soc Nephrol* 2007;18(1):176-88.
15. Majithiya JB, Paramar AN, Balaraman R. Pioglitazone, a PPARgamma agonist, restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc Res* 2005;66(1):150-61.
16. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Basic Histology*. 7<sup>th</sup> Ed. İstanbul. Appleton & Lange, 1993: 380-94.
17. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Basic Pathology*. 6<sup>th</sup> Ed. W.B. Philadelphia. Saunders Company, 2000: 516-9.



18. Sinclair AJ, Barnet AH, Lunec J. Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *Br J Hosp Med* 1990;43: 334-44.
19. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ 2nd. Formation of unique biologically active prostaglandins in vivo by a non-cyclooxygenase free radical and catalyzed mechanism. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1991;21A:125-8.
20. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995;35(182): 21-39.
21. Boll M, Weber LWD, Becker E, Stampfl A. Mechanism of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity. Hepatocellular Damage by Reactive Carbon Tetrachloride Metabolites. *Z Naturforsch* 2001;56c: 649-59.
22. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol* 2007;46(5):955-75.
23. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:311–35.
24. Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Arenson DM, Bissell DM. Maintenance of differentiated phenotype of cultured rat hepatic lipocytes by basement membrane matrix. *J Biol Chem* 1989;264:10756–62.
25. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003;112:1776–84.
26. Jarnagin WR, Rockey DC, Kotliansky VE, Wang SS, Bissell DM. Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol* 1994;127:2037–48.
27. Olaso E, Salado C, Egilegor E, Gutierrez V, Santisteban A, Sancho-Bru P, Friedman SL, Vidal-Vanaclocha F. Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis. *Hepatology* 2003;37:674–85.

28. LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 2003;299:890–3.
29. Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d1899-914.
30. Somerville RP, Oblander SA, Apte SS. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol* 2003;4(6):216. Epub 2003 May 29.
31. Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29(1):43-54.
32. Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1. *J Hepatol* 1999;30(1):48-60.
33. Watanabe T, Niioka M, Hozawa S, Kameyama K, Hayashi T, Arai M, Ishikawa A, Maruyama K, Okazaki I. Gene expression of interstitial collagenase in both progressive and recovery phase of rat liver fibrosis induced by carbon tetrachloride. *J Hepatol* 2000;33(2):224-35.
34. Han YP, Zhou L, Wang J, Xiong S, Garner WL, French SW, Tsukamoto H. Essential role of matrix metalloproteinases in interleukin-1-induced myofibroblastic activation of hepatic stellate cell in collagen. *J Biol Chem* 2004;279(6):4820-8. Epub 2003 Nov 14.
35. Yata Y, Takahara T, Furui K, Zhang LP, Watanabe A. Expression of matrix metalloproteinase-13 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in acute liver injury. *J Hepatol* 1999;30(3):419-24.
36. Yan S, Chen GM, Yu CH, Zhu GF, Li YM, Zheng SS. Expression pattern of matrix metalloproteinases-13 in a rat model of alcoholic liver fibrosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005;4(4):569-72.

37. Zhou X, Hovell CJ, Pawley S, Hutchings MI, Arthur MJ, Iredale JP, Benyon RC. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -14 persists during early resolution of experimental liver fibrosis and might contribute to fibrolysis. *Liver Int* 2004;24(5):492-501.
38. Takahara T, Furui K, Funaki J, Nakayama Y, Itoh H, Miyabayashi C, Sato H, Seiki M, Ooshima A, Watanabe A. Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology* 1995;21(3):787-95.
39. Watanabe T, Niioka M, Ishikawa A, Hozawa S, Arai M, Maruyama K, Okada A, Okazaki I. Dynamic change of cells expressing MMP-2 mRNA and MT1-MMP mRNA in the recovery from liver fibrosis in the rat. *J Hepatol* 2001;35(4):465-73.
40. Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 2001;35(2):297-306.
41. Galli A, Svegliati-Baroni G, Ceni E, Milani S, Ridolfi F, Salzano R, Tarocchi M, Grappone C, Pellegrini G, Benedetti A, Surrenti C, Casini A. Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2-mediated mechanism. *Hepatology* 2005;41(5):1074-84.
42. Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* 1990;29(44):10261-70.
43. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000;14(2):163-76.
44. Roeb E, Purucker E, Breuer B, Nguyen H, Heinrich PC, Rose-John S, Matern S. TIMP expression in toxic and cholestatic liver injury in rat. *J Hepatol* 1997;27(3):535-44.
45. Yata Y, Takahara T, Furui K, Zhang LP, Jin B, Watanabe A. Spatial distribution of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNA in chronic liver disease. *J Hepatol* 1999;30(3):425-32.

46. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Yanase K, Namisaki T, Imazu H, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology* 2002;36(4 Pt 1):850-60.
47. Wang Z, Juttermann R, Soloway PD. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem* 2000;275(34):26411-5.
48. Canbay A, Higuchi H, Bronk SF, Taniai M, Sebo TJ, Gores GJ. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology* 2002;123(4):1323-30.
49. Gores GJ, Kaufmann SH. Is TRAIL hepatotoxic? *Hepatology* 2001;34(1):3-6.
50. Zhang H, Cook J, Nickel J, Yu R, Stecker K, Myers K, Dean NM. Reduction of liver Fas expression by an antisense oligonucleotide protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Biotechnol* 2000;18(8):862-7.
51. Pellegrini M, Strasser A. A portrait of the Bcl-2 protein family: life, death, and the whole picture. *J Clin Immunol* 1999;19(6):365-77.
52. Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B, Waltemathe M, Gosling T, Flemming P, Malek NP, Trautwein C, Manns MP, Kuhnel F, Kubicka S. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(13):7797-802.
53. Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 2007;56(2):284-92.
54. Schnur J, Oláh J, Szepesi A, Nagy P, Thorgeirsson SS. Thioacetamide-induced hepatic fibrosis in transforming growth factor beta-1 transgenic mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16(2):127-33.
55. Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, Takeshita A, Ueno H. Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(5):2345-9.

56. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2002;65(2):166-76.
57. Ponnappa BC, Dey I, Tu GC, Zhou F, Aini M, Cao QN, Israel Y. In vivo delivery of antisense oligonucleotides in pH-sensitive liposomes inhibits lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor-alpha in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297(3):1129-36.
58. Ogushi I, Iimuro Y, Seki E, Son G, Hirano T, Hada T, Tsutsui H, Nakanishi K, Morishita R, Kaneda Y, Fujimoto J. Nuclear factor kappa B decoy oligodeoxynucleotides prevent endotoxin-induced fatal liver failure in a murine model. *Hepatology* 2003;38(2):335-44.
59. Pinzani M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci* 2002;7:d1720-6.
60. Beljaars L, Weert B, Geerts A, Meijer DK, Poelstra K. The preferential homing of a platelet derived growth factor receptor-recognizing macromolecule to fibroblast-like cells in fibrotic tissue. *Biochem Pharmacol* 2003;66(7):1307-17.
61. Wu J, Zern MA. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *J Gastroenterol* 2000;35(9):665-72.
62. Zhong Z, Froh M, Wheeler MD, Smutney O, Lehmann TG, Thurman RG. Viral gene delivery of superoxide dismutase attenuates experimental cholestasis-induced liver fibrosis in the rat. *Gene Ther* 2002;9(3):183-91.
63. Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJ, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ, Clark N, Murphy G. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology* 1996;24(1):176-84.
64. Issa R, Williams E, Trim N, Kendall T, Arthur MJ, Reichen J, Benyon RC, Iredale JP. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut* 2001;48(4):548-57.

65. Dufour JF, DeLellis R, Kaplan MM. Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med* 1997;127(11):981-5.
66. Dienstag JL, Goldin RD, Heathcote EJ, Hann HW, Woessner M, Stephenson SL, Gardner S, Gray DF, Schiff ER. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology* 2003;124(1):105-17.
67. Poynard T, McHutchison J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2002;122(5):1303-13.
68. Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis* 2005;10(5):927-39.
69. Dixon JB, Bhathal PS, Hughes NR, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology* 2004;39:1647-54.
70. Moreno MG, Muriel P. Remission of liver fibrosis by interferon-alpha 2b. *Biochem Pharmacol* 1995;50:515-20.
71. Kurikawa N, Suga M, Kuroda S, Yamada K, Ishikawa H. An angiotensin II type 1 receptor antagonist, olmesartan medoxomil, improves experimental liver fibrosis by suppression of proliferation and collagen synthesis in activated hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol* 2003;139:1085-94.
72. Türkay C, Yöner O, Arıcı S, Koyuncu A, Kanbay M. Effect of Angiotensin-converting Enzyme Inhibition on Experimental Hepatic Fibrogenesis. *Dig Dis Sci*. 2007; on-line.
73. Raetsch C, Jia JD, Boigk G, Bauer M, Hahn EG, Riecken EO, Schuppan D. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis. *Gut* 2002;50:241-7.

74. Degott C, Zafrani ES, Callard P, Balkau B, Poupon RE, Poupon R. Histopathological study of primary biliary cirrhosis and the effect of ursodeoxycholic acid treatment on histology progression. *Hepatology* 1999;29:1007–12.
75. Pietrangelo A, Borella F, Casalgrandi G, Montosi G, Ceccarelli D, Gallesi D, Giovannini F, Gasparetto A, Masini A. Antioxidant activity of silybin in vivo during long-term iron overload in rats. *Gastroenterology* 1995;109:1941–9.
76. Sakaida I, Hironaka K, Kimura T, Terai S, Yamasaki T, Okita K. Herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) increases expression Matrix Metalloproteinases (MMPs) with reduced expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMPs) in rat stellate cell. *Life Sci* 2004;74:2251–63.
77. Rockey DC, Chung JJ. Interferon gamma inhibits lipocyte activation and extracellular matrix mRNA expression during experimental liver injury: implications for treatment of hepatic fibrosis. *J Investig Med* 1994;42:660–70.
78. Ding X, Saxena NK, Lin S, Xu A, Srinivasan S, Anania FA. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology. *Am J Pathol* 2005;166:1655–69.
79. Yoshiji H, Noguchi R, Kuriyama S, Ikenaka Y, Yoshii J, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Masaki T, Fukui H. Imatinib mesylate (STI-571) attenuates liver fibrosis development in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G907–13.
80. Dooley D, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003;125:178–91.
81. Gnainsky Y, Spira G, Paizi M, Bruck R, Nagler A, Abu-Amara SN, Geiger B, Genina O, Monsonego-Ornan E, Pines M. Halofuginone, an inhibitor of collagen synthesis by rat stellate cells, stimulates insulin-like growth factor binding protein-1 synthesis by hepatocytes. *J Hepatol* 2004;40:269–77.

82. Rokey DC, Chung JJ. Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing. *J Clin Invest* 1996;98:1381-8.
83. Dekel R, Zvibel I, Brill S, Brazovsky E, Halpern Z, Oren R. Gliotoxin ameliorates development of fibrosis and cirrhosis in a thioacetamide rat model. *Dig Dis Sci* 2003;48:1642-7.
84. Tack CJ, Smits P. Thiazolidinedione derivatives in type 2 diabetes mellitus. *Neth J Med* 2006;64(6):166-74.
85. Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(2):463-78.
86. Natali A, Ferrannini E. Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetologia* 2006;49(3):434-41.
87. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951;193:265-75
88. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990;186:421-31.
89. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500.
90. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
91. Woessner JB. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 1961;93:440-7.



92. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22(6):696-9.
93. Marra F. Thiazolidinediones and hepatic fibrosis: don't wait too long. *Gut* 2006;55(7):917-9.
94. Bailey ST, Ghosh S. 'PPAR'ting ways with inflammation. *Nat Immunol* 2005;6(10):966-7.
95. Marra F, DeFranco R, Robino G, Novo E, Efsen E, Pastacaldi S, Zamara E, Vercelli A, Lottini B, Spirli C, Strazzabosco M, Pinzani M, Parola M. Thiazolidinedione treatment inhibits bile duct proliferation and fibrosis in a rat model of chronic cholestasis. *World J Gastroenterol* 2005;11(32):4931-8.
96. Lv P, Luo HS, Zhou XP, Chireyath Paul S, Xiao YJ, Si XM, Liu SQ. Thalidomide prevents rat liver cirrhosis via inhibition of oxidative stress *Pathol Res Pract*. 2006;202(11):777-88.
97. Toyama T, Nakamura H, Harano Y, Yamauchi N, Morita A, Kirishima T, Minami M, Itoh Y, Okanoue T. PPARalpha ligands activate antioxidant enzymes and suppress hepatic fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324(2):697-704.