

T.C
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI BİLİM DALI

DENEYSEL KRONİK PANKREATİT MODELİNDE SİROLİMUS
UYGULAMASININ PANKREAS FİBROZU VE PANKREATİK STELLAT
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Kadir ÖZTÜRK
Tbp. Kd. Ütğm

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Askeri Tıp Fakültesi'nin
İç Hastalıkları Tıp Uzmanlığı
için öngördüğü
UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Kenan SAĞLAM
Prof. Tbp. Kd. Alb.

ANKARA
2011

GATA Askeri Tıp Fakóltesi Dekanlığına / GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Müdürlüğüne;

“Deneysel Kronik Pankreatit Modelinde Sirolimus Uygulamasının Pankreas
Fibrozu ve Pankreatik Stellat Hücreleri Üzerine Etkileri” konulu bu çalışma
jürimiz tarafından İç Hastalıkları Anabilim Dalı’nda Uzmanlık Tezi olarak
kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof .Tbp.Kd.Alb. Kenan SAĞLAM

Asil Üye(Başkan) : Prof .Tbp.Kd.Alb. Kenan SAĞLAM

Asil Üye : Doç.Dz.Tbp.Kd.Alb. M. Fatih BULUCU

Asil Üye : Prof.Tbp.Kd.Alb. T. Rıfki EVRENCAYA

Yedek Üye : Prof.Tbp.Kd.Alb. Bayram KOÇ

ONAY:

Tbp.Kd.Ütgm. Kadir ÖZTÜRK’ün 24.06.2011 tarihinde savunduğu bu tez
Akademi Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun
görölmüş ve kabul edilmiştir.

M.Zeki BAYRAKTAR
Prof.Tbp.Tümgeneral
Askeri Tıp Fakóltesi Dekanı
ve Eğitim Hastanesi Baştabibi

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı İç Hastalıkları BD. 26.08.2008 gün ve 3700 -151-08/1601 sayılı kararı gereği İç Hastalıkları Bilim Dalı Başkanlığında yapıldı.

Bu tez çalışmasında, Hepatik fibrozda Hepatik stellat hücreyi baskılayarak fibrozu geriletmediği gösterilmiş olan Sirolimus tedavisinin benzer etkiyi, deneysel kronik pankreatit oluşturulan ratlarda da pankreatik stellat hücreyi baskılayarak etki etmesi amaçlandı. Bu sayede kronik pankreatit tedavisinde önemli bir ilerleme kaydedileceği düşünülmektedir.

Konunun belirlenmesi ve çalışmanın yürütülmesinde yardım ve katkılarını esirgemeyen tez yöneticim Prof. Tbp. Kd. Alb. Kenan SAĞLAM 'a ve Doç. Tbp Yb. İlker TAŞÇI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca iyi bir uzman hekim olarak yetişmem için değerli katkılarından dolayı başta İç Hastalıkları Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Tbp. Kd. Alb. Kenan SAĞLAM olmak üzere, Prof. Tbp.Tuğg. Mustafa KUTLU'ya, Prof.Tbp Tuğg. M. Tahir ÜNAL'a, Prof.Tbp.Kd Alb. Refik MAS'a, Prof.Tbp Kd.Alb. Bayram KOÇ'a, Doç. Dz. Kd. Alb. Fatih BULUCU'ya, Doç. Tbp Yb. İlker TAŞÇI'ya, Doç. Dz Tbp. Yb. Gökhan ERDEM'e, Yrd. Doç.Tbp. Bnb. Nuri KARADURMUŞ 'a, İç Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyeleri asistanları, hemşireleri ve klinik çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamın gerçekleşmesinde büyük destek ve yardımlarından dolayı Doç. Hv.Tbp. Alb. Mehmet YAŞAR' a, Doç. Tbp. Yb. Cemal AKAY'a , istatistiksel incelemeleri yapan Tbp. Bnb. Türker TÜRKER'e, histopatolojik incelemeleri yapan Prof. Dr. Sevil VURAL' a teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca bana her konuda yılmadan destek olan eşim Nihal ve kızım Azra' ya sonsuz teşekkür ederim.

Kadir ÖZTÜRK

Tbp. Kd.Ütğm.

ÖZET

Tbp. Kd. Ütğm. Kadir ÖZTÜRK “Deneysel Kronik Pankreatit Modelinde Sirolimus Uygulamasının Pankreas Fibrozu ve Pankreatik Stellat Hücreleri Üzerine Etkileri” Gülhane Askeri Tıp Akademisi İç Hastalıkları Bilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara, 2011.

Hepatik stellat hücreyi baskılayarak hepatik fibrozu gerileten Sirolimusun benzer etkiyi pankreatik stellat hücreyi baskılayarak deneysel kronik pankreatit modelinde de fibrozu geriletmesi amaçlandı.

Bu amaçla çalışmada, ağırlıkları 200-400 gr arasında olan 55 adet erkek Sprague-Dawley rat dört gruba randomize edildi. Pankreatik kanal içerisine 0,4 ml % 2' lik Trinitrobenzen Sülfonik Asit (TNBS) uygulanarak kronik pankreatit indüksiyonu yapıldı. Grup A (n=15): Kronik pankreatit + Sirolimus grubu; TNBS indüksiyonundan 4 hafta sonra, 2 hafta süre ile 2 mg/kg/gün oral Sirolimus solüsyonu, Grup B (n=15): Kronik pankreatit + placebo grubu; TNBS indüksiyonundan 4 hafta sonra, 2 hafta süre ile 2 ml/kg/gün oral su, Grup C (n=15): Kronik pankreatit grubu, TNBS indüksiyonundan 4 hafta sonra sakrifikasyon, Grup D (n=10): Pankreatik kanulasyon + Sirolimus grubu; Pankreatik kanal içerisine 0,4 ml %0,9 NaCL uygulamasından 4 hafta sonra, 2 hafta süre ile 2 mg/kg/gün oral Sirolimus solüsyonu verildi. A, B ve D gruplarındaki tüm ratlar 9 hafta sonunda sakrifiye edilerek tam kanda ve pankreas dokusunda oksidatif stres belirteçleri ile fibroz ve apoptoz skorları değerlendirildi.

Doku ve kanda malondialdehid (MDA) düzeyleri Sirolimus ile tedavi edilen grupta Placebo grubuna göre anlamlı derecede düşüktü ($p<0,001$). Süperoksit dismutaz (SOD) ve Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktiviteleri ise anlamlı derecede daha yüksekti (sırasıyla $p<0,001$ ve $p<0,001$). Sirolimus grubu ile Pankreatik kanulasyon grubu arasında MDA, SOD ve GSH Px düzeyleri yönünden istatistiksel olarak fark saptanmadı ($p>0,05$). Histopatolojik değerlendirmede Sirolimus grubunda fibroz değerlendirme skoru diğer gruplara göre daha yüksek olduğu tespit edildi. Pankreas ekzokrin bezlerdeki apoptotik aktivite Sirolimus ile tedavi edilen grupta

placebo grubuna göre daha düşüktü fakat bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,005$).

Sirolimus uygulaması kronik pankreatitte oksidatif stresi azaltırken, fibroz ve apopitoz üzerine olumlu etkisi olmadığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Deneysel kronik pankreatit, sirolimus, fibroz, apopitoz

SUMMARY

Tbp. Kd. Ütgm Kadir OZTURK “The effects of sirolimus on pancreatic fibrosis and pancreatic stellat cells in experimental chronic pancreatitis model.” **Gulhane School of Medicine, Department of Internal Medicine, Medical Specialization Thesis, Ankara, 2011.**

Sirolimus reduces hepatic fibrosis by inhibiting hepatic stellat cells. We aimed to show the similar effect by inhibiting the pancreatic stellat cells in experimental chronic pancreatitis.

In our study; 55 male, Sprague-Dawley rats weighing between 200 and 400 grams randomized into four group. Chronic pancreatitis is induced by injection of 0,4 ml, 2% trinitrobenzene sulfanic acid (TNBS) into major pancreatic duct. Group A (n=15): Chronic pancreatitis + Sirolimus; TNBS induction, 4 weeks later 2 mg/kg/day oral Sirolimus, for 2 weeks, Grup B (n=15): Chronic pancreatitis + placebo; TNBS induction, 4 weeks later 2 ml/kg/day oral water, for 2 weeks. Grup C (n=15): Chronic pancreatitis; TNBS induction, 4 weeks later sacrificed. Grup D (n=10): Pancreatic cannulation + sirolimus; 0,4 ml, % 0,9 NaCl injection into pancreatic duct, 4 weeks later 2 mg/kg/day oral sirolimus, for 2 weeks. At the end of the 9th week in group of A, B and D all rats have been sacrificed, and rat pancreatic tissues, oxidative stress markers and progression of fibrosis and apoptosis have been examined.

Tissue and blood Malondialdehyde (MDA) levels has been found significantly lower in Sirolimus group compare to placebo group ($p<0,001$) and Superoxide dismutase (SOD) and Glutation peroxidase (GSH-Px) activities have been significantly higher. (respectively $p<0,001$ and $p<0,001$). Tissue and blood MDA, SOD, GSH Px levels was no different significantly sirolimus group compare to pancreatic cannulation group ($p>0,05$). Histopathological analysis of the tissues revealed that score of sirolimus group was significantly higher at respect to other groups ($p<0,05$). The levels of apoptotic cell of sirolimus group was higher at respect to placebo group but this was not statistically significant.

Administration of sirolimus, decreases oxidative stress in chronic pancreatitis but hasn't beneficial effects on fibrosis and apoptosis.

Key words: Experimental Chronic Pancreatitis, Sirolimus, fibrosis, apoptosis.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
İNGİLİZCE ÖZET.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR.....	x
TABLolar ve ŞEKİLLER.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kronik pankreatit.....	3
2.2. Pankreas Fibrozu.....	11
2.3. Sirolimus.....	11
2.4. Pankreatit stellat hücreler.....	12
2.5. Kronik pankreatit ve Oksidatif stres.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. Yasal süreç, maddi destek ve ortam.....	15
3.2. Deney hayvanları.....	15
3.3. Pankreatik indüksiyon.....	15
3.4. Çalışma grupları.....	16
3.5. Sakrifikasyon.....	18
3.6. Laboratuvar inceleme.....	18
3.7. İstatistiksel değerlendirme.....	20
4. BULGULAR.....	22
4.1. Ratların kilo değişimi.....	22
4.2. Oksidatif stres belirteçleri.....	22
4.3. Histopatolojik bulgular.....	23
5. TARTIŞMA	26
6. SONUÇ.....	31
7. KAYNAKLAR.....	32

KISALTMALAR

GATA	: Gülhane Askeri Tıp Akademisi
PaSH	: Pankreatik Stellat Hücre
mTOR	: mammalian Target Of Rapamycin
GABA	: Gama Amino Biturik Asit
DM	: Diabetes Mellitus
KP	: Kronik Pankreatit
TGF-B	: Transforme edici büyüme faktörü beta
USG	: Ultrasonografi
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
ERCP	: Endoskopik retrograd kolanjiopankreatikografi
EUS	: Endoskopik ultrasonografi
MRCP	: Manyetik rezonans kolanjiopankreatografi
PABA	: P-Aminobenzoik Asidin
NSAİ	: Non Steroid Anti İnfilamatuvar
NF-κB	: Nükleer faktör kappa-B
NO	: Nitrik Oksit
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksid sentetaz
α-SMA	: Alfa Smooth Muscle Actin
PPAR-γ	: Peroksizom proliferatör aktivatör reseptör gama
TNF-α	: Tümör Nekrozis Factor Alfa
IL 2	: İnterlökin 2
FKBP-12	: FK Bağlayıcı protein 12
ESM	: Ekstra Sellüler Matriks
PDGF	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü
CTGF	: Konnektif doku büyüme faktörü
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
MDA	: Malondealdehid
SOD	: Süper Oksit Dismutaz
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
TNBS	:Trinitrobenzen sulfonik asit

FTS	: Fosfat tamponlu salin
SF	: Serum Fizyolojik
HCl	: Hidrojen Klorur
HSH	: Hepatik Stellat Hücre

TABLÖLAR

	Sayfa
Tablo 2.1. TIGAR-O sınıflandırması	5
Tablo 3.1. Çalışma grupları	17
Tablo 3.2. Kronik Pankreatit histopatolojik değerlendirme	20
Tablo 4.1. Ratların vücut ağırlığı değişimleri	22
Tablo 4.2. Doku ve Kan oksidatif stres belirteç düzeyleri	23
Tablo 4.3. Histopatolojik bulgular	24

ŞEKİLLER

Şekil 4.1. Histopatolojik bulgular ve Apoptotik aktivite mikroskopisi	25
---	----

GİRİŞ

Kronik pankreatit ekzokrin ve endokrin glandüler pankreatik parankimde, ilerleyici ve geri dönüşümsüz hasara neden olan ve fibrozla sonuçlanan inflamatuvar bir süreçtir. Panreasta skar oluşumunu tetikleyen ve mikroanatomide bozulmalara yol açan ilk akut pankreatit atağı çoğunlukla daha sonra tekrarlarla seyrederek tüm bezin yapısal ve fonksiyonel olarak bozulmasına neden olur. Her akut pankreatit atağı, asiner hücrelerde ciddi inflamasyon ve sitotoksisite ile seyreder. Anti-inflamatuvar mediatörler ve sitokinlerin sentez ve salınışında artışla birlikte olan tipik yara iyileşmesi kanallar başta olmak üzere kollajen sentezinde artış ve sonuçta hücrelerarası boşlukta matriks birikimi ile fibroza neden olur (1).

Karaciğer fibrozu sürecinde hepatik stellat hücrelerin rolü iyi bilinmektedir. Kronik pankreatit gelişim sürecinde de, stellat hücre sisteminin yeni üyelerinden olan pankreatik stellat hücrelerin (PaSH) aktivasyonu ve takip eden olayların sonucunda fibroz geliştiği gösterilmiştir (1,2). Bu nedenle, akut veya kronik durumda da durağan PaSH'lerin aktivasyon ve/veya çoğalmasının engellenmesi, pankreatik hasar ve sekelin azaltılmasında bir tedavi yaklaşımı olabilir. Aktive olmuş PaSH'lerin pankreastan uzaklaştırılması, karaciğer fibrozunda olduğu gibi, bu hücrelerin apoptozunun uyarılmasıyla gerçekleşebilir. Ayrıca fibrojenik hücrelerin patojenik özelliklerinin kaybolmasının bir başka mekanizması da hücresel senesensistir (3). Hücresel senesens kabaca hücrenin G1 fazında durması, fonksiyonlarını devam ettirirken bölünme yeteneğini kaybetmesi olarak tanımlanmaktadır (4). Apoptozda olduğu gibi zararlı uyarı alan tüm hücrelerin senesens yolakları da aktive olmaktadır. Bunun yanında apoptoz ile hücresel senesens yolakları arasında bir bağlantı olduğu da gösterilmiştir (5). Aktive olmuş hepatik stellat hücrelerdeki fenotipik değişiklik sonucu senesens yolağına girmesiyle karaciğer fibrozunda gerileme meydana geldiği bir süre önce gösterilmiştir (3). Benzer bir mekanizmanın pankreas fibrozu sürecinde işleyip işlemediği ise bilinmemektedir.

Yapılan çalışmalarda rapamisin uygulamasının hepatik stellat hücre proliferasyonunu engellediği ve deneysel karaciğer fibrozunu iyileştirdiği gösterilmiştir (6,7). Rapamisin (sirolimus) mTOR inhibitörleri ailesinin bir üyesidir. Hücrede FKBP-12 proteinine ve bunun aracılığı ile mTOR proteinine bağlanarak hücre siklusunun G1 fazından S fazına geçmesini engellemektedir. Rapamisin diğer immunbaskılayıcılardan farklı bir mekanizma ile antijen ve sitokin uyarılmasına cevap olarak oluşan T-lenfosit aktivasyonunu ve çoğalmasını önler. Ayrıca antikor meydana gelmesini de önler. Özellikle böbrek nakli sonrası reddin engellemesi amacıyla günümüzde kullanılmaktadır (9). Rapamisinin in-vivo anti-fibrotik etkinliğinin mekanizması tam olarak ortaya konmamıştır. Ancak hepatik stellat hücre proliferasyonunu baskıladığı detaylı olarak gösterilmiştir (6,8).

Bu çalışmanın amacı rapamisin uygulamasının deneysel pankreas fibrozunun seyrine , asiner hücrelere ve oksidatif stres belirteçlerine nasıl etki ettiğini göstermektir. Hipotezin oluşmasında karaciğer fibrozunda elde edilmiş olan verilerin mekanizma açısından çok yakın olduğu bilinen pankreas fibrozuna dönüştürülmesinden faydalanılmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Pankreatit

Kronik pankreatit (KP), pankreasa kalıcı, ilerleyen, morfolojik ve fonksiyonel hasar veren inflamasyon durumudur. Pek çok hasta, aralıklarla gelen pankreatit atakları yaşar. Ataklar arasında, organ yapısının ve fonksiyonunun normal görüntü vermesi nedeniyle, pankreasın yapısal ve fonksiyonel tetkikleri yapılmadan, tekrarlayan akut pankreatit ataklarından klinik olarak ayırt etmek bazen güçtür. KP ağrı, sindirim ve emilim bozuklukları, Diabetes Mellitus (DM) ve pankreas kanseri gibi birçok komplikasyonu nedeniyle önemli bir sağlık problemidir. İki yılı aşan KP olgularında pankreas kanseri riski artmış olup tanıdan 20 yıl sonra pankreas kanseri için kümülatif risk % 4'dür (10).

2.1.1. Epidemiyoloji

Otopsi serisinde KP görülme oranı %0.04 ile %5 arasındadır. Bu oran alkoliklerde çok daha yüksektir. Görülme sıklığı 45-54 yaşları arasında en yüksek noktaya ulaşmaktadır. Ölüm oranı ise %30-40 civarındadır. İleri dereceli KP'li hastaların yaşam süreleri yaklaşık 10-20 yıl azalmaktadır (11). KP; kalsifiye KP ve tıkayıcı KP olarak ikiye ayrılır. Düzensiz fibroz dağılımı ve pankreas içinde kalsifikasyon ve bunun yanı sıra birincil ve ikincil kanalların farklı tıkanması, kronik kalsifiye pankreatitin özelliğidir. Bu, en çok rastlanılan pankreatit türü olup; alkolik pankreatit, tropikal pankreatit, kalıtsal pankreatit, hiperkalsemi ve hiperlipidemiye ikincil gelişen pankreatit ve idiyopatik pankreatitli durumlarında görülmektedir. Tıkayıcı pankreatitte safra kanallarında genişleme, yaygın fibroz ve asiner parankimin yaygın atrofisi görülür. Pankreatik tümörler, kanal daralması ve olası pankreas divizum tıkayıcı pankreatit nedenleridir. Tıkanmaya neden olan durum ortadan kaldırıldığında yapısal ve işlevsel durumda düzelme görülebilir (10).

2.1.2. Patogenez

KP'ye yol açan mekanizmanın patofizyolojisi belli değildir. Teoriler arasında taş ve duktal tıkanma , nekroz-fibroz, toksik metabolitler ve oksidatif stres yer alır.

Taş ve duktal tıkanma teorisi tıkanmanın hayvan modellerinde pankreatik proteinlerin bazal sekresyonunda bir artış ve tripsin inhibitöründe azalma gözleminden kaynaklanır. Pankreas salgısındaki proteinler, protein tıkaçlar halinde çökelti yaparak küçük kanalları tıkayarak rastgele bloke eder. Bu da pankreası harekete geçirerek akut pankreatiti oluşturur. Zamanla kalsiyum, protein tıkaçlarla birleşerek pankreas kanallarının ve asiner dokunun daha da bozulmasına ve sonuç olarak ekzokrin dokunun atrofisine ve fibroza yol açar. Kalsiyum karbonat taşı oluşumunu engelleyen lithostathine eksikliği taş oluşumunun ve KP'nin sebebi olduğu düşünülmektedir. Yaygın olarak kabul görse de taş ve duktal tıkanma teorisi tüm KP vakalarında özellikle erken dönemlerinde protein tıkaçlarının neden bulunmadığını açıklayamamaktadır.

Nekroz-Fibroz hipotezinde tekrarlayan akut pankreatit ataklarının hücre nekrozuna yol açtığı ve iyileşmeler sırasında nekrozun yerini fibrozun alması ile kronik değişikliklerin geliştiği öngörülür. Kronik inflamasyon sırasında salınan TGF- β , epidermal büyüme faktörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü gibi hücre dışı dokuda matriks sentezini uyaran ve kollajen sentezini artıran mediatörlerin önemli rolü vardır.

Toksik–Metabolik teorisi alkolün asiner hücrelerde sitoplazmik lipid birikimine neden olarak yağlı dejenerasyon, hücresel nekroz ve sonuçta fibroza yol açtığını ileri sürer. Oksidatif stres teorisi pankreatik hastalığın asıl nedeninin oksidatif hasara yol açan reaktif moleküller üreten karaciğer karma fonksiyonlu oksidazların aşırı aktivasyonu olduğunu ifade eder. Pankreas bu “oksidatif strese” sistemik dolaşım veya safranin pankreatik kanala reflüsü yoluyla maruz kalır ve sonuçta tekrarlayan inflamasyon ve doku hasarı oluşur. KP için bu dört modelin hepsi de bilimsel değere sahiptir fakat KP vakalarının tümünün bir tek teori ile açıklanması mümkün değildir (10).

2.1.3. Etiyoloji

Amerika Birleşik Devletleri'nde KP'nin başlıca nedeni yaklaşık %70'lik bir oranla alkol tüketimidir. KP'li hastaların %55-80'i alkol kullanıcısıdır (12). Bununla birlikte alkol kullanımı KP gelişimi için tek başına yeterli değildir. Çünkü ağır alkol kullanıcılarının yalnızca %10'unda klinik olarak tanımlanan

pankreatik hastalık gelişmektedir (13). Akut pankreatitin aksine safra taşları KP'e neden olmaz. Kötü beslenmeden kaynaklanan pankreatit, gelişmekte olan Asya ve Afrika ülkelerinde en sık rastlanılan KP türüdür. Mikrobelerin ve antioksidanlardan yetersiz beslenme, serbest radikallerin yol açabileceği pankreatik hasara neden olabilir. Bazı nadir vakalarda travma yada hiperkalsemi ve hipertrigliseridemi gibi uzun vadeli metabolik bozukluklarda KP ile sonuçlanabilir. Serum trigliserid değerinin 1000 mg/dl ve üzerinde olması akut pankreatit oluşturan bir faktördür. Tekrarlayan akut pankreatit atakları sonrasında bazı olgularda KP gelişimi bildirilmiştir.

Tablo 2.1. TIGAR-O sınıflandırması

Alkol (% 70-80)	Tıkalı
Tropikal	Benign pankreas kanal tıkanması
Tropikal kalsifik pankreatit	Travmatik striktür
Fibrokalküloz pankreatik diabet	Akut pankreatit sonrası striktür,
Genetik (%2)	Oddi sfinkter disfonksiyonu
Otozomal dominant	Duodenal duvar kisti
Hereditör pankreatit	Pankreas divisum
Otozomal resesif	Malign pankreatik dukt striktürleri
CFTR mutasyonları	Ampuller veya duodenal karsinom
SPINK1 mutasyonları	Pankreatik adenokarsinom
Metabolik	Intraduktal neoplazi
Hiperkalsemi	Otoimmün (%5)
Hiperlipidemi:	Otoimmün pankreatit
Hipertrigliseridemi	Otoimmün hastalıklarla ilişkili
Lipoprotein lipaz eksikliği	Sjögren send, PBS,
Apolipoprotein C-II eksikliği	Primer sklerozan kolanjit
Postnekrotik KP	Belirtisiz pankreatik fibroz
İdiyopatik KP (%15-20)	Kronik alkolizm
Erken-başlangıçlı	Yaşlanma
Geç-başlangıçlı	Kronik böbrek yetmezliği, DM
	Radyoterapi

Chari ST, Singer MV. The problem of classification and staging of chronic pancreatitis: proposal based on current knowledge and its natural history. Scand J Gastroenterol 1994;29:949– 960.

KP'li hastaların %4-6'sında otoimmün pankreatit bulunur (10). Herediter pankreatit KP'li vakaların küçük bir kısmından sorumludur. Otozomal dominant olarak geçiş gösterir (14). Vakaların %20'sinin idiyopatik karakterde olduğuna inanılmaktadır.

Akut ve kronik pankreatit arasındaki ilişki önemli bir tartışma konusudur. Nekroz-Fibroz hipotezi KP'nin tekrarlayan akut pankreatit atakları sonucu oluştuğunu öne sürmektedir. Öncü bir olay olarak akut pankreatit atağının monositleri etkilemesi ve PaSH'in farklılaşmasına ve/veya çoğalmasına neden olabilmesi için yeteri kadar şiddetli olması gereklidir (12). KP'ye neden olan başlıca etiyolojik faktörler TIGAR-O sınıflandırması ile özetlenmiştir (Tablo 2.1).

2.1.4. Klinik belirtiler

Hastaların yaklaşık yarısı kronik hasar gelişmiş organdaki yeni akut pankreatit atağı ile kliniğe başvurur. Üçte birinin ise sadece karın ağrısı vardır. Diğer belirti ve bulgular sarılık, kilo kaybı, malabsorbsiyon, yağlı ishal, DM ve üst gastrointestinal kanamadır. KP'nin başlıca bulgusu olan karın ağrısına hastaların %80'inde rastlanır. Ağrı aralıklı veya kroniktir, devam edebilir, azalabilir, hatta zamanla tamamen yok olabilir. Pankreatitin şiddetlenmesi ile ağrı da artar. Hastaların %15 kadarında KP nispeten ağrısızdır. Ağrının olası kaynakları arasında, pankreasın inflamasyonu ve içinde basınç artması, sinir dokusunun inflamasyonu ve ortak safra kanallarının ve duodenumun daralması gibi pankreas dışı sebepler de sayılabilir. Kilo kaybı hastaların %50'sinden fazlasında görülür. Başlangıçta karın ağrısının endişesi ile kalorinin düşürülmesi kilo kaybının başlıca sebebi iken ilerlemiş pankreatitte kilo kaybının esas sebebi emilim bozukluğu ve diyabetle seyreden pankreas yetmezliğidir.

Pankreatik lipazın normal seviyesinin %10'unun altına düşmesiyle ki bu büyük yapısal hasar demektir, yağların hazmedilmesi zorlaşır ve beraberinde emilim bozukluğu nedeniyle meydana çıkan ishal ve yağlı ishal getirir. Amilaz yetmezliği karbonhidrat emilimini bozduğu için ozmotik ishale yol açar. Protein emilimindeki bozukluk proteaz enziminin yetersizliğinden kaynaklanır. Sindirim bozukluğu tüm besinler için geçerli olmakla beraber,

klirik açıdan en fazla sindirim problemi yağ ve yağa bağlı bazı vitaminlerde kendini gösterir.

KP'nin erken döneminde glukoz intoleransı yaygın olmasına rağmen klinik diyabet hastalığı oldukça geç dönemde kendini gösterir. Bu tip diyabette ketoasidoz ve diyabetik nöropati oldukça nadir görülür. Pankreatik diyabetle baş etmek oldukça güçtür, çünkü insülin ve glukagon kaybı zor bir diyabet tipini ortaya çıkartır. İnsülin reseptörleri algılama yeteneklerini henüz kaybetmedikleri ve insülin antikorları henüz vücutta bulunmadığı için genetik diyabetli hastalara oranla bu hastalarda insülin gereksinimleri genellikle düşüktür (10).

2.1.5. Tanı

Hastalığın sinsi seyri birçok olguda erken tanıyı geciktirir. Hastalar genelde bez yapısında belirgin hasar olduktan sonra hekime başvurur. Hastalığın tanısında henüz özgün bir yöntem yoktur. Hastanın tekrarlayan ve tipik yerleşim yayımlı karın ağrısı ile yağlı ishal ve/veya DM işaretleri gibi klinik verileri ile birlikte pankreasın yapısal ve fonksiyonel incelenmesinden yararlanılır (16).

Eğer KP şüphesi varsa ultrasonografi (USG) ve Bilgisayarlı Tomografi (BT) gibi görüntüleme yöntemleri ile vakaların %70 ile 90'ında tanısal veriye ulaşılabilir. Endoskopik retrograd kolanjiopankreatikografi (ERCP), eğer bu testlerde belirsizlik varsa yada negatif sonuç çıkarsa, diğer görüntüleme teknikleri ile görülemeyen pankreatik kanal anormalliklerini ortaya koymakta kullanılabilir. ERCP yerine daha az girişimsel olan Endoskopik ultrasonografi (EUS) kullanılabilir. Eğer USG, BT, ERCP veya EUS normal çıkarsa bazı seçilmiş vakalarda özellikle küçük kanal hastalığı olan hafif kronik pankreatit kanıtını ortaya çıkartabilecek olan sekretin/kolesistokinin uyarı testi kullanılabilir.

Düz karın grafisinde pankreasda yaygın kalsifiye alanların görülmesi KP tanısını koymak için yeterlidir ama bu bulgunun duyarlılığı sadece %30-40 arasındadır. Öte yandan USG'nin duyarlılığı yaklaşık %70 oranındadır, özgünlüğü ise %90 civarındadır ayrıca USG ile konulan KP tanısında daha ileri bir tetkik gerektirmez. Hafif KP ile ilişkilendirilmiş bulgular arasında bez

evresindeki düzensiz kontur, ekojenitede azalma ya da parankima da ekojenik odaklar ve safra kanalının hafif genişlemesi sayılabilir. Ana safra kanalının kalsifikasyonu ve dilatasyonu daha ağır bir KP düşündürür.

Benzer zgnlk oranlarına sahip olsalarda BT, USG'ye göre daha hassastır. BT de görülen KP'ye ait en yaygın tanısal bulgular kanal genişlemesi, kalsifikasyon ve kistik lezyonlardır. Diğerk bulgular ise pankreasta atrofi ve genişleme ile parankimin heterojenik dansitesidir.

ERCP, genelde en duyarlı (yaklaşık %90) ve en özgün (yaklaşık %100) tanı yöntemi olarak düşünülmektedir. Hafif KP'de ince kanalların dallarında genişleme ve düzensizlik görülür. Orta şiddette pankreatitte ise ek olarak ana safra kanallarında genişleme, tortiosite ve darlık görülür. İleri pankreatit ise ana kanalın belirgin genişlemesi, giderek incelme, normal görünümün tümüyle kaybolması ile karakterizedir. İkindil kanallar da benzer şekilde genişlemiş ve körelmiştir. ERCP, diğerk görüntüleme teknikleri ile tanı konulamayan hastalarda ve belirgin bir nedene dayanmadan tekrarlayan akut pankreatiti olan hastalarda düşünülmalıdır.

ERCP kontraendike olduğunda veya teknik güçlükler nedeniyle yapılamadığında sekretin uyarılmasıyla veya olmadan yapılan Manyetik rezonans kolanjiopankreatikografi (MRCP), ERCP'ye iyi bir alternatiftir. Bu görüntüleme tekniği pankreatik duktal anatomiye, peripankreatik sıvı toplanmasını ve pankreatik parankimin değerlendirilmesini mümkün kılar. Merkezler arasında MRCP'nin kalitesi, duyarlılığı ve özgünlüğü değişkenlik gösterse de teknik kısıtlamaların üstesinden gelindiğinde MRCP, ERCP'nin yerini alabilir. EUS, pankreatiti tetikleme riski olmaksızın ERCP'ye denk özgünlüğe sahiptir. EUS kılavuzluğunda yapılan ince iğne aspirasyonu ile KP maligniteden ayırt edilebilir. ERCP'de olduğu gibi EUS da diğerk daha az girişimsel işlemlerle KP teşhisini koymada yetersiz kaldığında kullanılmalıdır.

Pankreatik ekzokrin fonksiyonunu değerlendirmenin en basit yolu 72 saatlik kantitatif dışkı yağ ölçümüdür. Eğer ekzokrin sekresyon %90'dan daha fazla bir oranda azalmış ise, dışkıda artmış yağ miktarı (>7 gr/gün) gözlemlenir, ama bu test ne özgün ne de duyarlıdır. Pankreatik fonksiyon testlerinin arasında, distal duodenuma yerleştirilmiş bir katater yoluyla

pankreatik sekresyonların simultane toplanması ile yapılan sekretin ya da kolesistokinin uyarı testi en duyarlı olanıdır (duyarlılık oranı yaklaşık %90-95 arasındadır). Toplanan sıvı bikarbonat (sekretin salınımı) açısından veya lipaz ve tripsin açısından tahlil edilir. Ama bu test oldukça zaman alıcıdır (2 saat) ve çok yaygın kullanılmaz (10). Bentiromide testinin ise duyarlılığı %37-90 arasındadır (17).

2.1.6. Tedavi

Tıbbi tedavi tam olarak ağrı kontrolü ve yeterli enzim desteği ile birlikte malabsorpsiyonu ortadan kaldırmayı hedefler. Otoimmün KP'li olan hastaların çoğu steroid tedavisine dramatik yanıt verir ve klinik semptomlar ve görüntüleme değişiklikleri 4 hafta içinde geriler.

Ağrı kontrolü alkolden kaçınma, ağrı kesici kullanımı ve çöliak plexus blokajını kapsar. Başlangıçta Asetaminofen ve NSAİ ilaçlar tercih edilebilir, fakat bazı durumlarda narkotik analjeziklere gereksinim duyulabilir. Somatostatin analogu oktreotit, pankreatik salgıyı baskılar ve visseral analjezik etkilere sahiptir. Endoskopik tedavi, proksimal pankreatik kanalda belirgin daralma olan bazı hastalardaki ağrıyı kontrol edebilir. Çoğu vakada, daralan alana stent yerleştirilmesinin ardından genişleme görülür. Eğer tüm önlemler ağrıyı gidermede başarısız olursa, endoskopik drenajdan daha üstün olan cerrahi müdahale düşünülmelidir.

Yağlı ishal pankreatik enzim replasmanı ile tedavi edilir. En azından öğün başına 25000-30000 ünite lipaz yeterli lipoliz sağlamak için gereklidir. Besinlerden alınan yağ oranının düşürülmesi de semptomları azaltır. Bu tür manevralarla yeterli rahatlama elde edilemeyen hastalarda H₂ reseptör antagonisti yada proton pompa inhibitörü kullanılması uygun olur (10).

Pankreatik yetmezliğe ikincil DM insülin ve diyet ile tedavi edilir. Bu tip DM oral antidiabetiklere çok az cevap verir veya hiç vermez (18).

Deneyisel Tedavi Yöntemleri

Antioksidanlar

Deneyisel KP rat modelinde vitamin E ile tedavi miyofibroblast sayısında azalma ve fibroz skorunda düzelme sağlamıştır. Ayrıca TGF- β , pankreatik hidroksiprolin ve plazma hyaluronik asid seviyelerinde de azalma

gözlenmiştir (19). Bir başka çalışmada ise vitamin A tedavisinin PaSH'lerin aktivasyonunu baskıladığı görülmüştür (20). Yeni bir antioksidan ve antiinflamatuvar fitokimyasal olan DA-9601, bir KP fare modelinde nükleer faktör kappa B (NF-κB) bağlayıcı aktivitesini azaltarak indüklenabilir nitrik oksid sentetaz (iNOS) ve miyeloperoksidaz seviyelerini azaltmıştır. PaSH kültüründe alfa Smooth Muscle Actin (α-SMA) ve kollajen tip 1 üretimi azalmış ve pankretik fibrozda da belirgin gerileme gözlenmiştir (21).

PPAR-γ Ligandları

Peroksisom proliferatör aktivatör reseptör gama (PPAR-γ) ligandlarının inflamatuvar cevabı baskıladığı ve hepatik stellat hücrelerden, aortik düz kasdan ve böbrekten TGF-β üretimini azalttığı yönünde izlenimler elde edilmiştir. Yakın zamanda yapılan bir rat çalışmasında tioglitazonun gerçekten TGF-β seviyesini ve PaSH'lerin sayısını azalttığı; bu yolla inflamasyon, fibroz ve pankreatik hasarı baskıladığı gözlenmiştir (22).

Camostat Mesilate

Ağızdan alınan bir serin proteaz inhibitörü olup, ratlarda pankreatik sekresyonları azalttığı bulunmuştur. Bu etkisini, insan ve hayvanlarda, kolesistokininin tek başına veya sekretin ile birlikte feedback kontrolü ile göstermektedir. Camostat mesilatin pankreatik inflamasyonu, PaSH'in uyarılmasını ve sonuç olarak fibrozu baskıladığı gösterilmiştir (23-24).

Lovastatin

Lovastatin bir HMG-CoA redüktaz inhibitörü olup, yakın zamanda kolesterol düşürücü etkisinin yanısıra antiproliferatif ve proapoptotik etkisi de bulunmuştur. Rat PaSH'nin kullanıldığı in vitro deneysel çalışmalarda lovastatinin fibroblast benzeri hücrelerin proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (25)

Diğerleri

Bunların dışında pentoksifilin, oksipurinol, TGF-β nötralizan antikörler, TNF-α antikoru ve reseptör blokerleri ile tedavi çalışmaları devam etmektedir (26).

2.2. Pankreas Fibrozu

Bilindiği gibi etiyolojisi ne olursa olsun KP fibroz ile karakterize bir durumdur. Organ içinde biriken kollajen, sağlıklı parankimin yerini alır ve organ fizyolojik görevlerini yerine getiremez.

Pankreas fibrozu sürecindeki en erken olay doku kompartmanlarında veya hücre tiplerinde hasar meydana gelmesidir (27-28). Hücre veya doku hasarı sonrası dokuda inflamasyon meydana gelir ve bu bölgeye lökositler, lenfositler ve monositler toplanır. İnflamatuvar hücrelerin hasarlı bölgeye toplanmasıyla asiner hücrelerde inflamasyon meydana gelir. Özellikle makrofajlardan salınan sitokinler ve büyüme faktörleri PaSH aktivasyonuna ve proliferasyonuna neden olur. Makrofajlar hasarlı dokuyu fagosit ederken aktif PaSH'ler, miyofibroblast benzeri bir yapıya dönüşerek Ekstrasellüler Matrix (ESM) üretimine ve depolanmasına neden olur. Eğer inflamasyon KP'de ve pankreas kanserinde olduğu gibi uzun sürerse hasarlı bölgenin yerinde kollajen birikmesi ve fibroz meydana gelir. Ayrıca bu hücreler ESM'yi parçalayabilen metalloproteinaz gibi enzimleri salgılama yeteneğine de sahiptir. İnflamasyon durduğu takdirde ESM metalloproteinazlar ile parçalanır, PaSH apoptoza uğrayarak ortamdaki kaybolur (27-28).

2.3.Sirolimus

Sirolimus organ nakli sonrası reddi engellemek amacıyla kullanılan yeni nesil immünsüpresif bir ajandır. Rapamisin olarak da adlandırılır. Sirolimus ilk kez rapa nui olarak isimlendirilen bir adada (paskalya adası olarak da bilinir) streptomyces hygroscopicus isimli bir bakteriden makrolid olarak keşfedilmiştir. Bu nedenle ilk olarak antifungal bir ajan olarak geliştirildi (29). Fakat immünsüpresif ve antiproliferatif etkisi fark edildikten sonra diğer özelliği üzerine yapılan çalışmalar kayboldu. Sirolimus mTOR inhibitör ailesinin bir üyesi olup diğer immunosupresiflerden farklı bir mekanizma ile antijen ve IL 2 uyarılmasına cevap olarak oluşan T-lenfosit aktivasyonunu ve çoğalmasını önler. Ayrıca antikor üretimini de baskılar. Sirolimus immunosupressif kompleks oluşturmak üzere hücrelerde immunofilin, FK bağlayıcı protein-12 (FKBP-12)'e bağlanır. Sirolimus-FKBP-12 kompleksinin

kalsinörin aktivitesi üzerine hiç bir etkisi yoktur. Bu kompleks memelilerde düzenleyici bir kinaz olan “Target of Rapamisin” (TOR)’a bağlanarak aktif hale gelmesini önler. TOR’un aktif hale gelmesinin önlenmesi ile hücre siklusunun G1 fazından S fazına geçmesi önlenerek sitokine bağlı T-hücre çoğalması baskılanır (15).

Böbrek nakli yapılan hastalarda tekrarlanan dozlardan sonra terminal yarı ömrü 62 ± 16 saattir. Buna karşılık, etkinlik yarı ömrü daha kısa olup, ortalama sabit konsantrasyonları 5 -7 gün sonra oluşur. 36 olan kan/plazma oranı Sirolimusun önemli miktarda oluşmuş kan elementlerine bölündüğünü göstermektedir. Sirolimus insan plazma proteinlerine % 92 oranında bağlanır. Hem sitokrom P450 IIIA4 (CYP3A4), hem de P-glikoprotein substratıdır (15).

Sirolimus diğer kalsinörin inhibitörlerinden farklı olarak böbrek toksisitesi olmadığı için böbrek nakilli hastalarda kullanılmaktadır (9). Sirolimus tek başına veya kalsinörin inhibitörleri, mikofenolat mofetil veya steroid ile birlikte kullanılabilir. Sirolimusun hepatik stellat hücre proliferasyonunu baskıladığı detaylı olarak gösterilmiştir (6). Ayrıca sirolimusun antiproliferatif etkisi nedeniyle balon anjiyoplasti sonrası koroner arterlere yerleştirilen koroner stentin tekrar daralmasını engellemek amacıyla ilaçlı stentlerde kullanılmaktadır (30). Sirolimus tedavisi ile tuberoz skleroz kompleks hastalığında ve bazı kanser türlerinin (kaposi sarkoma, lenfoma...) seyrinde gerileme olduğu görülmüştür (31). Fakat bu durum kesinlik kazanmadığı için bu hastalıkların tedavisinde onay almamıştır.

2.4. Pankreatik Stellat Hücreler

1980’li yıllarda fare, rat ve insan pankreasında retinoid ve yağ damlaları içeren hücreler saptanmış ve bunların pankreas yeniden yapılanması ve fibrozunda potansiyel bir rolü olabileceği öne sürülmüştür. A vitamininden zengin bu hücrelerin aktive şekillerinin fibrozda rol aldığı gösterilmiştir. 1998 yılında Bachem ve arkadaşları, retinoid depolamaları ve morfolojik yönden hepatik stellat hücrelerine benzemeleri nedeniyle bu hücrelere PaSH adını vermiştir (2). Periasiner dağılım gösteren PaSH’ler tüm pankreatik hücrelerin %4’ünü oluşturur ve kollajen tip I-III, fibronektin

ve laminin üretirler. Asini tabanını saran uzun sitoplazmik çıkıntıları olan PaSH'ler damar çevresinde ve periduktal alanlarda da bulunurlar (32).

PaSH normal şartlar altında aktif değildirler. İnaktif PaSH'lar triangüler, lipid içeren ve başlıca damar çevresinde yerleşmiş hücrelerdir. Desmin ve glial fibriler asidik protein ile pozitif boyanıp A vitamini depolarlar. Sessiz PaSH'ler non-proliferatiftir ve bu evrede kollajen üretimi tip 4, tip 3 ve tip 1 şeklinde sıralanır. Pankreasta fibroza katılan PaSH'ler ise aktiftir. Sessiz yağ depolayan hücreden hızlı çoğalan miyofibroblast-benzeri hücreye dönüşüm hücre sel retinol içeriğinde azalma, granüllü endoplazmik retikulum artışı ve ESM üretiminde artmayla ilişkilidir. Aktive olan PaSH'ler periasiner bölgeye göç edip lipid damlalarını kaybeder, fibroblast benzeri şekil alır ve α -SMA ile pozitif boyanırlar. En çok kollajen tip 1 olmak üzere tip 3, laminin ve fibronektin üretirler. PaSH'lerin aktivasyonu sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, oksidatif stres ürünleri ve ESM içeriği gibi çeşitli maddelerce düzenlenir (33).

2.5. Kronik Pankreatit ve Oksidatif Stres

Normal metabolizmanın yada patolojik olayların sonucunda ortaya çıkan serbest radikallerin etkileri "oksidatif stres" olarak tanımlanmaktadır (34,35). Serbest radikaller, biyolojik moleküller ile oldukça reaktif olduklarından, "reaktif oksijen ürünleri" veya "serbest oksijen radikalleri" (SOR) olarak adlandırılmaktadırlar. Fizyolojik koşullarda SOR'nin organizmaya zararlı olan etkileri antioksidan sistemler tarafından nötralize edilmektedir. Patolojik koşullarda ise SOR aşırı miktarda ortaya çıkmaktadır. Antioksidan sistemlerin dengeleme kapasiteleri aşıldığında ise oksidasyon dengesi değişmekte ve oksidatif stres oluşmaktadır. Yeni oluşan bu durum ise ciddi hücre sel hasarlara neden olabilmektedir (34,35).

KP patogenezinde oksidatif stresin rol oynayabileceği hipotezi ilk kez Rose ve arkadaşları tarafından 1986 yılında ortaya atılmıştır (36). Bunu takip eden çalışmalarda ise KP hastalarında antioksidan kapasitenin oksidatif stresle başa çıkmakta yetersiz kaldığı gösterilmiştir. Akut ve kronik pankreatitte erken dönemde pankreas dokusunda nötrofil, lenfosit ve monosit infiltrasyonu gerçekleşir. Pankreatit sürecinde görülen SOR üretimindeki

artıştan asiner hücrelerin yanı sıra göç etmiş olan lökositler de sorumludur (37,38). Bu hücreler tarafından üretilen SOR, tek başlarına pankreatit oluşturmaya yeterli değildir. Ancak pankreatit patogenezi ve gelişiminin önemli düzenleyicileridirler. 2002 yılında Yaşar ve ark. tarafından gerçekleştirilen deneysel akut nekrotizan pankreatit modelinde; doku MDA düzeyi artışı ve SOD enzim aktivitesi azalması yönündeki bulgular da, patogeneizde oksidatif stresin rolünü destekler niteliktedir (39). KP etiyolojisinde en önemli etmen olan alkol üzerine Norton ve ark. tarafından yapılan deneysel çalışmada, oksidatif stres artışıının histolojik bulgulardan önce oluştuğunu ortaya koymuşlardır (35). Oksidatif stres artışıının inflamatuvar yanıtın bir parçası olmaktan çok, başlatıcı olay olduğu yaklaşımı yapılmıştır. Benzer sonuçlar başka çalışmalarda da elde edilmiştir (40,41).

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Yasal süreç, maddi destek ve ortam

Araştırma GATA Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanlığı'nca onaylandı. Haziran 2010' da GATA Araştırma Bilimsel Kurul Başkanlığı'na maddi destek için başvuru yapıldı ve Haziran 2010'da araştırmanın maddi yönden desteklenmesine karar verildi. İhtiyaç duyulan gereçler ve sarf malzemeleri Mart 2011'de eksiksiz olarak tedarik edildi. İkinci bir kurum veya kuruluştan maddi destek alınmadı.

Çalışmanın hayvan deneyleri kısmı Mart-Haziran 2011 tarihleri arasında, GATA Araştırma ve Geliştirme Merkezi Başkanlığı'nda gerçekleştirildi. Doku ve kan oksidatif stres parametreleri GATA Eczacılık Bilimleri Merkezi'nde tayin edildi. Doku mikroskopisi (ışık mikroskopisi ve immünohistokimya) incelemeleri Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı.

3.2. Deney Hayvanları

Araştırmada 200-400 gr ağırlığında 55 adet erkek cins Sprague-Dawley türü rat kullanıldı. Ratların ameliyat öncesi ve sonrasında bakımları, steril ameliyathane şartları GATA Araştırma ve Geliştirme Merkezi Başkanlığı tarafından sağlandı. Gerçekleştirilen cerrahi operasyonlarda GATA Araştırma ve Geliştirme Merkezi Başkanlığı'nda görevli cerrahi uzmanı veteriner hekimler, anestezi teknisyeni ve teknik personel eşlik etti. Kullanılan 55 rat aşağıda açıklandığı şekilde dört gruba randomize edildi.

3.3. Pankreatit İndüksiyonu

Pankreatik fibroz indüksiyonu Puig-Divi ve arkadaşlarının tanımladığı modelde kısmi modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi (42). Ekibin bu konuda optimum düzeyde deneyimi vardı.

Ratlar steril ameliyathane şartlarında ve hipotermiye neden olmayacak oda ısısında, anestezi indüksiyonunu takiben opere edildi. Anterior yaklaşımla ksifoid altı yaklaşık 1 cm'lik cilt-cilt altı kesi ile karın açıldı.

Duodenum nazikçe karın dışına alındı ve 0.2 cm'lik yumuşak polietilen kateter ile duodenumun antimezenterik duvarından girilerek pankreatik kanal kanüle edildi. Uygulanan maddenin safra yollarına kaçmasının önlenmesi amacıyla pankreatikobiliyer kanal, damar mikroklemi ile kapatıldı. Pankreatik fibroz indüksiyonu, bu kateterden yavaş infüzyon ile, kanal içi basınç artışına yol açmamak amacıyla yaklaşık 60 sn'de verilen, 0.4 ml %10 etanol içinde çözülmüş %2'lik TNBS-FTS (pH:8) infüzyonu ile sağlandı. TNBS, hapten gibi davranıp lizin residüleri ile reaksiyona girerek dokuya karşı immünolojik yanıt oluşturmaktadır. Bunun yanında, süperoksit ve hidrojen peroksit radikalleri yoluyla direkt toksik etki de göstermektedir. TNBS ile oluşan akut inflamasyonun en önemli özelliği kronik inflamasyon sürecine dönüşmesidir (42).

Cerrahi süresince yapılan palpasyonlara bağlı nekroz gelişmesine engel olmak için dikkat gösterildi. Cerrahi sonrasında dehidratasyonun önlenmesi amacıyla her bir rata 3-5 ml kadar periton içi SF verildi. İndüksiyon sonrasında, önce pankreatik kanal kateteri daha sonra da damar mikroklemi çekilerek son kontroller yapıldı ve batin 3.0 ipek sütür materyali ile kapatıldı. Ameliyat sonrası enfeksiyon önlenmesi amacıyla 20.000 U kristalize penisilin kas içerisine uygulandı ve ratlar anesteziden doğal ayılma sürecine bırakıldı. Ratlara ameliyat sonrası 24 saat boyunca besin ve içecek verilmedi. Daha sonra kafeslere yerleştirilen hayvanlar serbest beslenme ve sıvı alımına geçti. Pankreatik kanal içerisine TNBS verilerek KP fibrozunun oluşması için gereken ortalama süre yaklaşık dört haftadır. Dört hafta bitimini takiben sirolimus tedavisi başlandı (2 mg/kg/gün, oral, orogastrik lavaj ile, su içinde). Kontrol gruba ise orogastrik lavaj yardımıyla 2 ml/kg/gün su verildi. Bu süre içerisinde tüm ratlarda kilo takibi yapıldı.

3.4. Çalışma Grupları

A Grubu (Kronik pankreatit + Sirolimus tedavi grubu, n=14)

Başlangıçta 15 rat vardı. İndüksiyondan 1 hafta sonra operasyon komplikasyonu nedeniyle 1 rat öldü. İndüksiyondan 4 hafta sonra, 2 hafta

süre ile oral Sirolimus solüsyonu uygulandı. Tedavi bitiminden 3 hafta sonra ratlar (n=14) sakrifiye edildi

B Grubu (Kronik pankreatit + plasebo grubu, n=13)

15 hayvanla çalışmaya başlandı ancak indüksiyonun 3. ve 4. günlerinde operasyon komplikasyonu nedeniyle 2 rat öldü. İndüksiyondan 4 hafta sonra 2 hafta süreyle gastrik lavaj yardımıyla oral yoldan 2 ml/kg/gün su uygulandı. Tedavi bitiminden 3 hafta sonra ratlar (n=13) sakrifiye edildi.

C Grubu (Kronik pankreatit grubuna, n=14)

15 hayvanla çalışmaya başlandı. İndüksiyondan 2 gün sonra operasyon komplikasyonu nedeniyle 1 rat öldü. İndüksiyondan 4 hafta sonra herhangi bir tedavi uygulanmadan ratlar sakrifiye edildi.

D Grubu (Pankreatik kanülasyon + Sirolimus tedavi, n=10)

Pankreatik kanal kanüle edildi ancak TNBS yerine 0.4 ml salin infüze edildi. İndüksiyondan 4 hafta sonra 2 hafta süre ile Sirolimus uygulandı. Tedavi bitiminden 3 hafta sonra ratlar (n=10) sakrifiye edildi (Tablo 3.1). Bu grupta ölen hayvan olmadı.

Tablo 3.1. Çalışma grupları

Grup	Model	Bekleme süresi (hafta)	Uygulanan tedavi (2 hafta)	Sakrifikasyon zamanı
A grubu (n=14)	Kronik pankreatit (TNBS)	4	Sirolimus	3 hafta sonra
B grubu (n=13)	Kronik pankreatit (TNBS)	4	Su	3 hafta sonra
C grubu (n=14)	Kronik pankreatit (TNBS)	4	Yok	Hemen (4. hafta)
D grubu (n=10)	Salin	4	Sirolimus	3 hafta sonra

TNBS: Trinitro Benzen Sulfonik Asit

3.5. Sakrifikasyon

A, B, D grubundaki tüm ratlar indüksiyon işleminden dokuz hafta sonra, C grubundaki ratlar ise 4 hafta sonra sakrifiye edildi. Sakrifikasyon hazırlığında, ratlara gaz anestezisi için; %3'lük Seroflurane, %1.5'lik O₂ ve %0.6'lık N₂O, katı anestezisi için ise; Xylazine HCl 10 mg/kg ve Ketamine HCl 90 mg/kg dozunda intramusküler olarak uygulandı. Anestezisi sağlanan ratlara daha sonra öldürücü dozlarda anestezi verilerek sakrifikasyon sağlandı. Biyokimyasal inceleme için tam kan tüpüne kalp içi yoldan kan alındı. Rat karnı, tekrar ön kesi ile açılarak her bir rat pankreas dokusundan; oksidatif stres parametre çalışmaları için kuru tüpe ve bir adet de histopatolojik inceleme için %10 formaldehit içeren tüpe örnekler alındı. Örnekler tümü bir kerede çalışılmak üzere -80°C'de saklandı.

3.6. Laboratuvar incelemeleri

3.6.1. Oksidatif stres belirteçleri

Pankreas dokusu ve kanda oksidatif stres durumunu belirlemek amacıyla, indirekt oksidatif stres belirteçleri olarak kabul edilen; MDA düzeyi ile, GSH-Px ve SOD enzim aktiviteleri ölçümü yapıldı. Tam kanda SOD tayini için ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle süperoksit radikalleri üretilmekte ve oluşan süperoksit radikali, Iodonitrotetrazolium ile reaksiyon vererek viyole renkli formazon boyası oluşturmakta ve bu renk şiddeti 505 nm dalga boyutunda ölçülmektedir. Ortamdaki CuZn-SOD aktivitesine bağlı olarak bu reaksiyon önlenmekte ve % inhibisyon hesaplanmaktadır (43). Elde edilen % inhibisyon bir formül yardımıyla U/ml olarak konsantrasyonlar elde edilmektedir. Sonra dilisyon faktörü olan 400 ile çarpılarak tam kandaki aktivite hesaplanmaktadır.

Tam kanda Se-GPx aktivitesi tayin yönteminin esası, H₂O₂ varlığında indirgenmiş glutatyonun (GSH) Se-GPx tarafından okside glutatyona (GSSG) oksitlenmesi ve oksitlenen GSSG'nin glutatyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a dönüştürülmesi esnasında ortamda bulunan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın(NADPH) kullanılması ve kullanılan bu

NADPH miktarındaki, dolayısıyla absorbandsdaki azalmanın 340 nm dalga boyunda izlenmesi esasına dayanmaktadır (44,45).

Tam kanda lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA tayini, tiyobarbütirik asit ile MDA reaksiyon vererek 532 nm dalga boyutunda ölçülebilen renkli bir bileşik vermesi esasına dayanmaktadır. Bu ölçümle tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddeler ölçülmüş olup, literatürlerde TBARS olarak yer almaktadır (46).

Doku örnekleri tartılıp %1,15 ml'lik KCl çözeltisi ile cam homojenizatörü içersinde iyice ezilip homojenize edildi. Hazırlanan bu doku homojenizatları santrifüje edilerek süpernatant kısım, ölçümler amacıyla ayırarak CuZn-SOD ve Se-GPx enzim aktiviteleri ve MDA düzeyleri tam kan yönteminde olduğu gibi aynı işlem uygulanarak ölçümler yapıldı.

3.6.2. Histopatolojik inceleme

Üç farklı deneme grubu ile kontrol grubundan alınan pankreas örnekleri %10'luk tamponlu formalinde tespit edilerek parafinde bloklandı. Her parafin bloğundan 4-6 mikron kalınlığında alınan kesitler (aynı blokta 4 kesit) histopatolojik (hematoksilen-eosin [HE] ve Masson'un üçlü boyaması) ve TUNEL metodu ile kontroller için kullanıldı. Tüm kesitler ışık mikroskopunda (Leica DM400B) değerlendirildi ve resmedildi (Leica DFC280). Histomorfolojik değerlendirme Nathan ve ark'nın uyguladıkları değerlendirmenin modifiye edilmesiyle beş ana ve üç alt katogeriye ayırma yoluyla gerçekleştirildi (Tablo 3.2) .

Pankreasta apoptotik hücreler TUNEL yöntemi ile (In Situ Cell Death Detection Kit, ROCHE) saptandı. Bu amaçla; yukarıdaki şekilde ayrılan doku kesitleri ksilollerde deparafinize edildi ve 100, 96, 80 ve 70'lik alkol serilerinden geçirilip dehidrate edildi. Sonra cytonin solüsyonuna konularak 37°C'lik etüvde 30 dakika bekletildi. Oda sıcaklığında % 3'lük hidrojen peroksitte 5 dakika tutuldu. Nemli kamaraya alınarak üzerlerine birer damla TUNEL mixture (TdT ve label solution) damlatılarak 37°C'lik etüvde 60 dakika bekletildi. Bunu izleyen aşamada kesitlere converter POD damlatıldı; yine 37°C'lik etüvde 30'ar dakika tutuldu. Nihayet kesitler, 5 ml deionize su, 2 damla konsantre buffer ve 2 damla konsantre 3-amino-

9-etilkarbazol (AEC) karışımından oluşan kromojende kontrollü olarak 5 dakika bekletildi.

Tablo 3.2. Kronik Pankreatit histopatolojik değerlendirme

Histopatolojik Bulgular	Derecelendirme
1. Yangısal hücre infiltrasyonu	
2. Atrofi	
3. Fibroz	
<i>Intralobüler</i>	Hafif: (+)
<i>Perilobüler</i>	Orta: (++)
<i>İnterlobüler</i>	Şiddetli: (+++)
4. Dejeneratif değişiklikler	
5. Psödotübül oluşumu	

Nathan JD, Romic J, Peng RY, Peyton M, Rockey DC, Liddle RA. Protection Against Chronic Pancreatitis and Pancreatic Fibrosis in Mice Over-Expressing Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor *Pancreas*. 2010; 39:e24–e30.

*Derecelendirmede, aynı objektif büyütmesinde (x100), farklı 10 saha değerlendirildi.

*İmmünohistokimyasal derecelendirmede, aynı objektif büyütmesinde, farklı 10 saha değerlendirildi ve negatif (-), <%25 hafif (+), %25-50 orta (++) , >% 50 şiddetli (+++) şeklinde derecelendirildi.

Kesitler Mayer's hematoksilen boyamasına gelinceye kadar fosfatlı tamponla (pH 7.4) yıkandı. Bu boya ile 1 dakika karşıt boyamaya tabi tutulan kesitler, çeşme suyu altında yıkanıp ve jelatinli yapıştırıcı damlatılarak lamelle kapatıldı. Hazırlanan kontrol preparatları da aynı prosedüre göre boyandı. Ancak TUNEL mixture yerine DNase ile muamele edildi.

3.7. İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel hesaplamaların tamamı mikro işlemci yardımı ile ticari istatistik paket programı (SPSS PC, Ver. 11,5; SPSS Inc. USA) kullanılarak yapıldı. Oransal değerler yüzde (%), sayısal değerler ortalama $\pm$ ortalamanın standart deviasyonu (SD) olarak ifade edildi. Bütün istatistiksel hesaplamalarda alfa serbestlik derecesi 0,05 olarak kabul edildi. Hesaplanan p değerlerinin 0,05' ten küçük bulunduğu durumlar anlamlı kabul edildi.

Gruplar arası farkların karşılaştırmalarında Mann-Whitney U, ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testleri kullanıldı.

BULGULAR

Tüm ratlar dokuz hafta süre ile bir kafes içerisinde en fazla beş rat olacak şekilde sıvı ve besin alımı serbest olarak izlendi. Çalışma süresince ilk haftada KP + sirolimus grubunda 1, KP + plasebo grubunda 2 ve sadece KP grubunda 1 olmak üzere toplam 4 rat perioperatif dönemde öldü. Daha sonraki dönemlerde kayıp olmadı.

4.1. Deneklerde vücut ağırlığı değişimi

Ratların vücut ağırlığı takibi 0., 4. ve 9. haftalarda yapıldı (Tablo 4.1). Bütün gruplarda zaman içerisinde kilo alımı olduğu görüldü. A, B ve D gruplarında 0. hafta ile 9. hafta arasındaki vücut ağırlığı farkı istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p=0,003$, $p=0,003$, $p=0,036$). Tüm gruplarda 0. hafta ile 4. hafta arasındaki vücut ağırlığı artışı da istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p=0,003$, $p=0,003$, $p=0,009$, $p=0,033$). 4. hafta ile 9. hafta arasındaki vücut ağırlığı artışı A grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p=0,027$), B ve D grubunda anlamlı değildi (sırasıyla $p=0,09$, $p=0,072$).

Tablo 4.1. Ratlarda vücut ağırlığı değişimleri (gram)

Hafta	A Grubu (KP + Sirolimus)	B Grubu (KP + Plasebo)	C Grubu (KP)	D Grubu (Salin + Sirolimus)
0	286±50.8	328.7±44.8	278.6±50.3	227.7±30.1
4	311.4±40.7	349.2±47	300.8±61	233.8±32.1
9	321.3±32.7	363.7±39.2		237.9±34

B ve D grubu 4-9. hafta için $p>0,05$, diğer tüm sonuçlar için $p<0,05$, KP: kronik pankreatit

4.2 Oksidatif stres belirteçleri

Oksidatif stres belirteçleri olarak pankreas dokusunda ve kanda MDA düzeyleri, SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri kullanıldı. Doku MDA düzeyi nmol/gr yaş doku ağırlığı, kan MDA düzeyi nmol/ml cinsinden hesaplandı. Doku SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri ise U/gr yaş doku ağırlığı, kan SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri ise U/ml olarak hesaplandı. Buna göre, A

Grubunda (kronik pankreatit + sirolimus tedavisi) doku ve kan MDA düzeyleri B grubuna (kronik pankreatit + plasebo uygulaması) göre anlamlı derecede daha düşüktü ($p<0.001$) (Tablo 4.2). Doku ve kandaki SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri A grubunda B grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti. (her ikisi için $p<0.001$). Doku ve kandaki MDA düzeyi D grubunda (pankreatik kanulasyon + sirolimus) A grubuna göre daha düşük bulundu ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (doku için $p=0,482$, kan için $p=0,682$). Pankreas dokusu SOD, GSH-Px enzim aktiviteleri de D grubunda A grubuna göre daha yüksekti fakat burada da aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla $p=0,265$, $p=0,519$). Kan SOD, GSH-Px düzeyleri de D grubunda A grubuna göre daha yüksekti fakat aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla $p=0,256$, $p=0,186$) (Tablo- 4.2).

Tablo 4.2. Doku ve Kan oksidatif stres belirteç düzeyleri

Parametre	A Grubu (KP + Sirolimus)	B Grubu (KP + Plasebo)	C Grubu (KP)	D Grubu (Salin + Sirolimus)
Doku				
MDA (nmol/gr)	0.89±0.22	1.59±0.33	2.43±0.3	0.8±0.29
SOD (U/gr)	41.9±5.39	31.08±5.76	19.72±2.93	44.94±4.49
GSH-Px (U/gr)	28.5±3.94	20.22±3.5	13.18±1.96	30.01±3
Kan				
MDA (nmol/ml)	2.86±0.71	5.07±1.06	7.78±0.97	2.65±0.97
SOD (U/ml)	712.21±91.74	515.3±90.61	335.36±49.84	764.89±80.83
GSH-Px (U/ml)	1.76±0.23	1.27±0.22	0.83±0.13	1.89±0.19

Grup A ve D arasındaki tüm sonuçlar için $P>0,05$, diğer tüm sonuçlar için $p<0,001$, KP: kronik pankreatit

4.3 Histopatolojik bulgular

Pankreas dokusunda ışık mikroskopuyla; hematoxilen-eozin (HE), Masson's trikrom (MT) ve TUNEL teknikleri kullanılarak inceleme ve değerlendirmeler yapıldı.

A Grubunda (kronik pankreatit ve sirolimus tedavisi) B Grubuna (kronik pankreatit + plasebo uygulaması) benzer seviyede atrofi ve hücre

infiltrasyonu tespit edildi. Dejeneratif değişiklikler A grubunda daha belirgin olmak üzere her iki grupta orta şiddette mevcuttu. Her iki grupta da interlobuler ve intralobuler yerleşim gösteren hafif ve orta şiddette fibroz tespit edildi (Resim 1 ve Resim 2). C Grubunda (sadece kronik pankreatit) bulgular daha hafif olmakla birlikte bu grupta da fibroz interlobuler ve intralobuler yerleşimli olup hafif ve orta şiddetteydi (Resim 3). D Grubunda (pankreatik kanulasyon + sirolimus) ise bulgular neredeyse tamamen normaldi ve sadece bir hayvanda hücre infiltrasyonu görüldü.

Hayvanların histopatolojik bulguları Nathan ve ark. modifiye edilmiş histopatolojik skorumaya sistemine göre değerlendirildi. Buna göre A grubundaki fibroz diğer gruplara göre istatistiksel olarak daha fazlaydı ($p<0,05$) (Tablo 4.3). B ve C grupları fibroz yönünden karşılaştırıldığında C grubunda daha fazla gibi görölse de aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,348$). D grubunda fibroz diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak daha azdı ($p<0,05$) (Tablo 4.3).

Pankreas dokusunda apoptoz, A grubunda lobüllerde ekzokrin bezlerin çekirdeklerinde dağınık halde hafif ve orta şiddette saptandı. B grubunda da ekzokrin bezlerin çekirdeklerinde apoptoz saptandı ve bu gruptaki hayvanlarda apoptotik aktivite A grubuna göre daha şiddetliydi (Resim 4 ve Resim 5). Fakat aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 4.3). C grubundaki apoptotik hücre sayısı da A grubuna benzer şekilde ekzokrin bezlerin çekirdeklerinde, dağınık halde ve hafif-orta şiddette saptandı (Resim 6). D grubundaki apoptoz nadir alanlarda tespit edildi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Histopatolojik bulgular

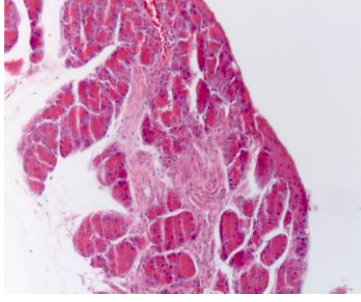
Parametre	A Grubu (KP + Sirolimus)	B Grubu (KP + Plasebo)	C Grubu (KP)	D Grubu (Salin + Sirolimus)
Fibroz	8.00±3.26	4.23±3.11	3.14±2.54	0.20±0.63
Apoptoz	4.43±4.24	5.69±6.82	1.36±2.13	0

Fibroz ; B ve C Grupları için $p>0,05$, diğer tüm sonuçlar için $p<0,05$

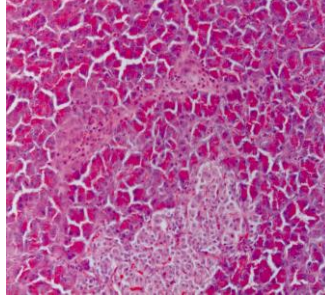
Apoptoz ; A ve D Grupları, B ve D Grupları için $p<0,05$, diğer tüm sonuçlar için $p>0,05$

KP: kronik pankreatit

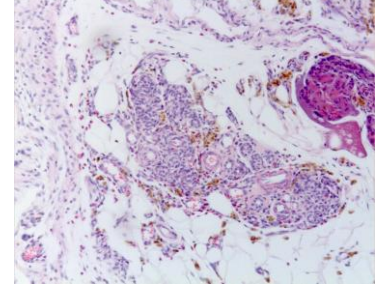
Şekil 4.1. Histopatolojik bulgular ve Apopitotik aktivite mikroskopisi



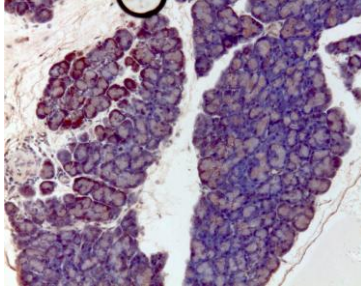
Resim 1



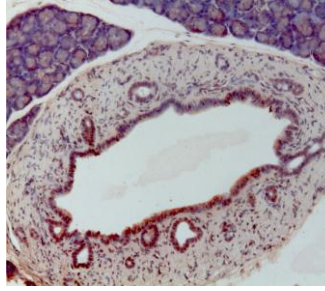
Resim 2



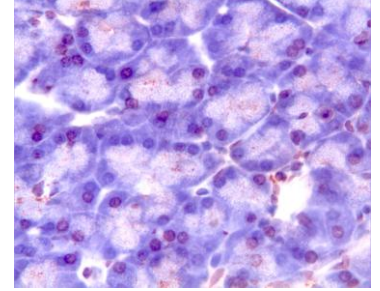
Resim 3



Resim 4



Resim 5



Resim 6

Resim 1; Intralobuler fibrosis, grup A, HE, x100.

Resim 2; Ekzokrin bezlerde dejeneratif değişiklikler, intralobuler bantsal fibrosis, grup B, HE, x100.

Resim 3; Atrofi, pseudolob oluşumu ve fibrosis, grup C, HE, x100.

Resim 4; Ekzokrin bez epitel hücrelerinde apopitotik değişiklikler, grup A, TUNEL, x100.

Resim 5; Interlobar kanal epitelyum hücrelerinde apopitotik değişiklikler, grup B, TUNEL, x100.

Resim 6; Ekzokrin bez epitel hücrelerinde apopitotik değişiklikler, grup C, TUNEL, x400.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, deneysel kronik pankreatit oluşturulan ratlarda sirolimus uygulamasıyla hem doku hem de kanda oksidatif stres belirteçlerinde belirgin gerileme gözlenmiştir. Bununla beraber, bu tedavinin histopatolojik incelemede fibroz ve asiner hücre apoptozunda anlamlı etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Deneysel hepatik fibrozda iyileştirici etkisi gösterilmiş olan sirolimusun (6-8), mekanizma olarak birçok benzer özelliklere sahip pankreas fibrozunda konnektif doku birikimi üzerine belirgin etki göstermemiş olması önemli bir bilimsel veridir. Diğer yandan, fibroz üzerinde belirgin etki gözlenmemiş olsa da oksidatif stres belirteçlerinde meydana gelen olumlu değişiklikler sirolimus uygulamasının pankreas dokusu üzerine olumlu tesirlerinin olduğunu düşündürmektedir.

Oksidatif stresin akut pankreatit patogenezinde rol oynadığı iyi bilinmektedir (34). Bununla beraber, kronik pankreatit sürecindeki rolü tam olarak ortaya konamamıştır. Kronik pankreatit patogenezinde hepatik ortak fonksiyonlu oksidazların aşırı aktivitesi sonucu safra yolundan pankreasa reflü geliştiği, bunun yanında kronik süreçte pankreasta antioksidan kapasitesinin eksikliği öne sürülmüştür (36,48). Antioksidan kapasite bakımından diğer organlara göre daha düşük potansiyele sahip olan pankreasta hem akut hem de kronik hasar sürecinde hayvan modellerinde antioksidan tedavilerin faydalı olduğu görülmüştür (49). Mevcut araştırma projesinin yapıldığı GATA İç Hastalıkları B.D. Kliniğinde yapılan bir çalışmada Mas ve arkadaşları TNBS ile oluşturulan deneysel kronik pankreatit modelinde güçlü bir antioksidan olan taurin kullanmışlar ve oksidatif stres belirteçlerinde anlamlı düzeyde gerileme, fibroz ve atrofide anlamlı düzelme bulmuşlardır (50). Serülein ile oluşturulan kronik pankreatit modelinde de NF-kB aktivitesinin, myeloperoksidaz seviyesinin ve iNOS mRNA sentezinin arttığı, antioksidan uygulamasının ise bu durumu düzelttiği gösterilmiştir (21). Yakın zamanda yapılmış bir çalışmada ise serbest oksijen radikallerinin asiner ve pankreatik stellat hücrelerde inflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyonunu düzenlediği, stellat hücre çoğalmasını ve kollajen sentezini

artırdığı, bu durumun da ksantin oksidaz inhibitörü kullanımıyla düzeldiği gösterilmiştir (47).

Sirolimus uygulamasının oksidatif stres üzerine etkisi başka organ sistemlerinde daha önce incelenmiştir. Rat hepatositlerinde sirolimus ve FK506 gibi immünsüpresif ilaçların nitrik oksit (NO) üretimi, indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) mRNA düzeyi ve NF-kB aktivitesinde azalmaya neden olarak hücre içi serbest oksijen radikal üretiminde azalma olduğu gösterilmiştir (51). Bizim çalışmamızda da, hücresel düzeyde olmasa da, pankreas dokusunda ve kanda sirolimus uygulaması sonrasında oksidatif stres belirteçlerinin plasebo grubuna kıyasla belirgin olarak düzeldiği gözlenmiştir. Hatta bu oksidatif stres belirteçlerindeki düzelme kronik pankreatit oluşturulmayan kanülasyon kontrol grubuna benzer düzeyde yani normal veya normale yakın pankreas dokusu düzeyinde gerçekleşmiştir. Diğer yandan, oksidatif stres belirteçlerinde meydana gelen iyileşmeye fibroz düzeyinde de eşdeğer bir azalma meydana gelmemiş olması ilginçtir. Bu durum oksidatif stresin kronik pankreatit'in patogeneğinde inflamasyonu başlatarak etkisini gösterdiği ve fibroz sürecinde etkisinin devam etmediği şeklinde yorumlanabilir. Bu düşüncüyü destekler nitelikte, Rheinheckel ve arkadaşları serülein kaynaklı kronik pankreatitte dokuda oksidatif stresin erken dönemde etkisinin daha fazla olduğunu ve tedavinin erken dönemde verilmesinin daha faydalı olacağını bildirmişlerdir (40).

NO'nun kronik pankreatit'deki rolü ile ilgili tartışmalar halen devam etmekle birlikte hastalık sürecinde oluşan reaktif oksijen ürünlerinin nitrik oksitle reaksiyona girerek potent bir oksidan olan peroksinitrit oluşturduğu gösterilmiştir (52,53). NO güçlü bir vazodilatör olup özellikle akut hasar sonrası pankreas ve tüm vücutta perfüzyonun sağlanması için üretilen önemli bir mediatördür. Bu nedenle, her ne kadar fazlalığının da dokuda zararlı olabildiği bilinse de (54), NO doku düzeyinin azalması istenmeyen bir durumdur. Dobosz ve arkadaşları akut pankreatit rat modelinde NO sentaz inhibitörleri kullanımının pankreatik mikrosirkülasyonu bozduğunu göstermişlerdir (55). Bu nedenle NO metabolitleri bir yandan pankreasta oksidatif hasara neden olurken diğer yandan da vasküler tonusu

düzenleyerek hasarın ilerlemesini engellemektedir. Kronik pankreatit çalışmalarında ise kapiller yapının ve kan akımının azaldığı görülmüştür (56). Bununla beraber, NO metabolitlerinin kullanımının kronik pankreatit fibrozu üzerine olumlu etkisine yönelik kanıt yoktur. Bizim çalışmamızda, dolaylı olarak, sirolimus kullanımı ile NO üretiminde azalma meydana geldiği ve böylece oksidatif strese iyileşme olduğu düşünülebilirken, kapiller dolaşımın bozulmuş olmasından dolayı fibroz düzeyinde belirgin değişiklik olmadığı düşünülebilir.

PaSH'in 1998 yılında bulunmasından sonra fibrozla ilişkili olarak ilgi bu hücreler üzerinde yoğunlaşmıştır. Çünkü karaciğer fibrozunda hepatik stellat hücreler üzerine elde edilen veriler pankreatik stellat hücrelerin de kronik pankreatit patogenezi de çok önemli bir role sahip olduğunu düşündürmüştür. Çünkü bu iki hücre tipi fizyolojik şartlarda büyük oranda benzer özelliklere sahiptir. PaSH' ler, periasiner yerleşimli uzun sitoplazmik uzantıları ile asini tabanını saran hücrelerdir (57). Hepatik stellat hücreler gibi vitamin A içeren sitoplazmik yağ damlacıkları vardır ve hücresel iskelet proteinleri olan desmin ve glial asidik protein ekspresyon ederler. Hasar sonrası otokrin ve parakrin yollarla hücre hasarının ilerlemesine yol açan sitokin, kemokin ve inflamatuvar moleküllerin yanında kollajen matriks üretiminin de en önemli kaynağıdır. Patolojik sürecin devam etmesi için PaSH'ler öncelikle "aktive" olarak miyofibroblast benzeri bir fenotip kazanırlar (58). Bu olay temel olarak tipik lipid damlacıklarının kaybı, proliferasyon oranında artma, kontraktilite özelliğinin kazanılması, α -SMA pozitifliği ile büyüme ve fibrojenik uyarılara cevaplılık artışı ile karakterizedir (2). PaSH'ler ayrıca, matriks metalloproteinaz olarak bilinen ekstrasellüler matriksi yıkabilme özelliğine sahip enzimleri ve bunların inhibitörlerini de sentez etme yeteneğine sahiptirler. Sonuçta, aktive olmuş PaSH'lerin ortamdan uzaklaştırılması veya bu hücrelerin aktivasyonun önlenmesi, potansiyel bir antifibrotik tedavi seçeneği olarak düşünülebilir.

Sirolimusun in-vivo anti-fibrotik etkinliğinin mekanizması tam olarak ortaya konmamıştır. Ancak bu ajanın hepatik stellat hücre proliferasyonunu inhibe ederek hepatik fibrozu geriletmediği detaylı olarak gösterilmiştir (6,8).

PI3K-Akt-p70^{S6K} sinyal yolağı hepatik stellat hücrede profibrotik büyüme faktörlerinin aktive olmasından dolayı karaciğer fibrozunda merkezi role sahiptir (59). P70^{S6K} in önemli bir düzenleyicisi olan FRAP/RAFT ise memelilerde sirolimusun direk hedefidir (60). Bu nedenle sirolimusun bu sinyal yolağını inhibe ederek hepatik stellat hücre proliferasyonunu ve kollajen birikimini engellediği düşünülmektedir. Pankreas duktal adenokarsinom ve kronik pankreatitte bu yolağın aktive olduğu gösterilmiştir (61).

Tüm bu verilere göre çalışmamızda sirolimus tedavisinin kronik pankreatitte PaSH'lerin aktivasyonu ve çoğalmasını engelleyerek fibrozu geriletebileceği öngörüldü ancak ulaşılan noktada böyle bir sonuç gerçekleşmedi. Bu durum, sirolimusun daha önce gösterilmiş olan antifibrotik etkinliğini şüpheye götüren bir durum da değildir çünkü araştırmamızda PaSH proliferasyonu ve fenotip değişikliğini inceleme üzere bir tasarım düzeni yapılmamıştır. Ayrıca, çalışmamızda oluşturulan kronik pankreatit modelinin sirolimus tedavisine primer bir direnci olabilir ki bu durum karaciğer fibrozu için daha önce gösterilmiştir. Neef ve arkadaşları sirolimus tedavisinin biliyer ligasyon ile oluşturulan karaciğer fibrozunda tioasetamid ile oluşturulan karaciğer fibrozuna göre daha etkili olduğunu göstermiştir (8). Biliyer ligasyon sonrası oluşan sirozda daha çok biliyer duktal hücreler etkilenirken, tioasetamid ile oluşan sirozda hepatositler etkilendiği bilinmektedir. Bizim çalışmamızda kullandığımız TNBS daha çok asiner hücrelerde inflamasyon sonucu kronik pankreatite neden olmaktadır. TNBS yerine obstrüksiyona bağlı kronik pankreatit geliştirilmiş ve duktal hücre hasarı hakim olsaydı sirolimus tedavisi nasıl etki edeceği bilinmemektedir.

Bir diğer husus aslında PaSH'lerin kronik pankreatit sürecinde karaciğerdeki benzerlerin karaciğer fibrozunda gösterdiğinden farklı davranmasıyla ilişkili olabilir. Örneğin retinoid uygulaması pankreatik stellat hücrelerin inhibe edilmesine neden olurken (62), hepatik stellat hücrelerin fibrojenitesini artırmaktadır (63). Erkan ve arkadaşları karaciğer sirozu, kronik pankreatit, pankreatik duktal adenokarsinom ve karaciğer metastazlı pankreas kanserli hastalarda PaSH için çok özgün olan kollajen tip11a1

sentezinin arttığını ancak bu durumun hepatik stellat hücrelerde hemen hiç görülmediğini bildirmiştir (64). Son olarak TNBS ile oluşturulan kronik pankreatit beklenenden daha şiddetli oluşmuş olabilir ki yapısal olarak aşırı hasarlanmış ve anatomisi bozulmuş pankreastan fazlalık kollajenin uzaklaştırılması olanaksız hale gelmiş olabilir. Bu durum sirotik karaciğerden kollajenin uzaklaştırılmasının olanaksız olmasıyla özdeşleştirilebilir.

Apopitoz, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Apopitotik indeksin kronik pankreatitte özellikle asiner hücrelerde arttığı gösterilmiş olup inflamasyon adacık hücrelerini etkilemediği takdirde bu bölgedeki apopitotik aktivitenin daha düşük olduğu görülmüştür (65). Bizim çalışmamızda TNBS indüksiyonundan 4 hafta sonra sakrifiye edilen (herhangi bir tedavi almayan) kronik pankreatit grubunda asiner hücrelerde apopitotik aktivite artarken adacık hücrelerde apopitoz görülmemiştir. Kontrol grubunda ise inflamasyon süresi arttığı için asiner hücrelerde apopitotik aktivitede daha fazla bir artış ve adacık hücrelerinde de hafif de olsa etkilenme olduğu görülmüştür. Sirolimus tedavi grubunda asiner hücrelerde orta şiddette bir apopitoz gözlenmiştir. Bununla beraber, asiner hücre apopitozu açısından kontrol grubuyla anlamlı fark tespit edilmemiştir. Sirolimus tedavisinin bir başka modelde epitelyal tür hücrelerde apopitozu arttırdığı ve proliferasyonu azalttığı bildirilmiştir (66). Bu etkisini apopitozu azaltan ve proliferasyonu uyaran NF- κ B'yi (67,68) inhibe ederek göstermektedir. Bizim çalışmamızdaki önemli bir sınırlılık pankreatik stellat hücrelerin apopitozuna yönelik kanıt aranmamış olmasıdır. Çünkü asiner hücre apopitozunun azalması pankreas parankimi için koruyucu olabilirken, aktive olmuş ve kontrolsüz kollajen üreten pankreatik stellat hücrelerin apopitozunun artması hasarın yavaşlaması ve sınırlandırılması açısından önemli olabilir.

SONUÇ

Güçlü bir immün düzenleyici olan sirolimus kronik pankreatit modelinde oksidatif stresi geriletmektedir. Bununla beraber bu çalışmada pankreatik fibroz üzerine bu ajanın etkisi olmadığı gözlenmiştir. Oksidatif stres üzerine olan anlamlı etkinlik ise sirolimus uygulamasının kronik pankreatit sürecinde potansiyel etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, pankreatik stellat hücrelere etkinliğin de detaylarıyla değerlendirildiği ve farklı modelleri kapsayan çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Apte MV, Haber PS, Darby SJ, ve ark. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut*. 1999;44:534-541.
2. Bachem MG, Schneider E, Gross H, ve ark. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology*. 1998;115:421-432.
3. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, ve ark. Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell*. 2008;134:657-67.
4. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence:when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:729-40.
5. Seluanov A, Gorbunova V, Falcovitz A, ve ark. Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. *Mol Cell Biol*. 2001;21:1552-64.
6. Zhu J, Wu J, Frizell E, ve ark. Rapamycin inhibits hepatic stellate cell proliferation in vitro and limits fibrogenesis in an in vivo model of liver fibrosis. *Gastroenterology* 1999;117:1198-1204.
7. Biecker E, De Gottardi A, Neef M, ve ark. Long-term treatment of bile duct-ligated rats with rapamycin (sirolimus) significantly attenuates liver fibrosis: analysis of the underlying mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313:952-961.
8. Neef M, Ledermann M, Saegesser H, ve ark. Low-dose oral rapamycin treatment reduces fibrogenesis, improves liver function, and prolongs survival in rats with established liver cirrhosis. *J Hepatol* 2006;45:786-796.
9. McAlister VC, Mahalati K, Peltekian KM, ve ark. A clinical pharmacokinetic study of tacrolimus and sirolimus combination immunosuppression comparing simultaneous to separated administration. *Ther Drug Monit*. 2002;24: 346–50.
10. Goldman L, Ausiello D. *Cecil Medicine* 2011;23:1075-1078.

11. Bornman PC, Beckingham IJ. Chronic pancreatitis. *B.M.J.* 2001;322:660-663.
12. Mergener K, Baillie J. Chronic pancreatitis. *Lancet* 1997;340: 1379–1385.
13. Bisceglie AM, Segal I. Cirrhosis and chronic pancreatitis in alcoholics (ed). *J Clin Gastroenterol* 1984;6:199–200.
14. Sossenheimer MJ, Aston CE, Preston RA, ve ark. Clinical characteristics of hereditary pancreatitis in a large family, based on high risk haplotype. *Am J Gastroenterol* 1997; 92:1113-1116.
15. Sehgal SN and Bansback CC. Rapamycin: in vitro profile of a new immunosuppressive macrolide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1993;685:58-67.
16. Özen Y. Kronik pankreatit. Memik F (ed). *Klinik Gastroenteroloji.* İstanbul, Nobel & Güneş, 2004;219-225.
17. Forsmark CE. Diagnosis of chronic pancreatitis. Forsmark CE (ed). *Pancreatitis and its complications.* Totowa, New jersey, Humana Press, 2005:187-208.
18. Vinik AI. Insulin secretion in chronic pancreatitis. Tiengo A, Alberti KGMM, Del Prato S, Vranic M (eds). *Diabetes secondary to pancreopathy.* Amsterdam: Excerpta Medica, 1988:35-50.
19. Gomez JA, Molero X, Vaquero E, ve ark. Vitamin E attenuates biochemical and morphological feature associated with development of chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:162–169.
20. McCarroll JA, Phillips PA, Santucci N, ve ark. Vitamin A inhibits pancreatic stellate cell activation: implications for treatment of pancreatic fibrosis. *Gut* 2006;55:79-89.
21. Yoo BM, Oh TY, Kim YB, ve ark. Novel antioxidant ameliorates the fibrosis and inflammation of cerulein-induced chronic pancreatitis in a mouse model. *Pancreatology* 2005;5:1765–1769.
22. Van Westerloo DJ, Florquin S, de Boer AM, ve ark. Therapeutic effects of tioglitazone in experimental chronic pancreatitis in mice. *Am J Pathol* 2005;166:721–728.

23. Su SB, Motoo Y, Iovanna JL, ve ark. Effect of camostat mesilate on the expression of pancreatitis-associated protein (PAP), p8, and cytokines in rat spontaneous chronic pancreatitis. *Pancreas* 2001;23:134–140.
24. Emori Y, Mizushima T, Matsumura N, ve ark. Camostat, an oral trypsin inhibitor, reduces pancreatic fibrosis induced by repeated administration of a superoxide dismutase inhibitor in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:895–899.
25. Jaster R, Brock P, Sparmann G, ve ark. Inhibition of pancreatic stellate cell activation by the hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor lovastatin. *Biochem Pharmacol* 2003;65:1295–1303.
26. Hughes CB, Gaber LW, Mohey el-Din AB, ve ark. Inhibition of TNF alpha improves survival in an experimental model of acute pancreatitis. *Am Surg* 1996;62:8–13.
27. Suda K. Pathogenesis and progression of human pancreatic fibrosis. *Med electron Microsc* 2000;33:200-206.
28. Klöppel G, Detlefsen S, Feyerabend B. Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern. *Virchows Arch* 2004;445:1-8.
29. Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. *J. Antibiot.* 1975;28:721–6.
30. Shuchman M. Trading restenosis for thrombosis? New questions about drug-eluting stents. *N Engl J Med* 2006;355:1949–52.
31. Chan S. Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer. *Br J Cancer* 2004;91:1420–4.
32. Omary MB, Lugea A, Lowe AW, ve ark. The pancreatis stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin. Invest* 2007;117:50-59.
33. Haber PS, Keogh GW, Apte MV, ve ark. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *Am J Pathol* 1999;155:1087-1095.

34. Braganza JM, Scott P, Bilton D. Evidence for early oxidative stress in acute pancreatitis, *Int. J. Pancreatol.* 1995;17: 69-81.
35. Norton ID, Apte MV, Lux O. Chronic ethanol administration causes oxidative stress in the rat pancreas, *J. Lab. Clin. Med.* 1998;131: 442-481.
36. Rose P, Fraine E, Hunt LP, ve ark. Dietary antioxidants and chronic pancreatitis. *Hum Nutr Clin Nutr* 1986; 40:151-64.
37. Mathew P, Wyllie R, VanLente F. Antioxidants In Hereditary Pancreatitis. *Am. J. Gastroenterol* 1996; 91: 1558-1562.
38. Jaakkola M. Pancreatitis in Finland between 1970 and 1989. *Gut.* 1993;62:1255-1260.
39. Yasar M, Mas MR, Cömert B, ve ark. Has the oxidative stress a role in late phase of experimental acute necrotizing pancreatitis? *Hepatogastroenterol.* 2002;49: 1692-1695.
40. Reinheckel T, Prause J, Nedeliev B. Oxidative stress affects pancreatic proteins during the early pathogenesis of rat cerulein pancreatitis. *Digestion.* 1999;60: 56-62.
41. Urunuela A, Sevillano S, De la Mano, ve ark. Time-course of oxygen free radical production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1588; 159-164.
42. Puig-Divi V, Molero X, Slas A. Induction of chronic pancreatic disease by trinitrobenzene sulfonic acid infusion into rat pancreatic ducts. *Pancreas.* 1996;13: 417-424.
43. Fitzgerald SP, Compell JJ, Lamont JV. The establishment of reference ranges for selenium. The selenoenzyme glutathione peroxidase and the metalloenzyme superoxide dismutase in blood fractions. In: the 5th international symposium on selenium in biology and medicine, Tennessee, USA 1993;20-23.
44. Pleban PA, Munyani A, Beachum J. Determination of selenium concentration and glutathione peroxidase activity in plasma and erythrocytes. *Clin. Chem.* 1982;28: 311-316.

45. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, J. Lab. Clin. Med. 1967;1:158-169.
46. Jain SK. Hyperglycemia can cause membran lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. The journal of biological chemistry, 1989;264: 21340-21345.
47. Tanioka H, Mizushima T, Shirahige A, ve ark. Xanthine oxidase-derived free radicals directly activate rat pancreatic stellate cells. J Gastroenterol Hepatol. 2006;21:537-544.
48. Braganza JM. Pancreatic disease: A casualty of hepatic "detoxification"? Lancet, 1983;2:1000-1002.
49. Guyan PM, Uden S, Braganza JM. Heightened free radical activity in pancreatitis. Free Radic Biol Med. 1990;8:347-354.
50. Mas R, Isik AT, Yamanel L, ve ark. Antioxidant treatment with taurine ameliorates chronic pancreatitis in an experimental rat model. Pancreas. 2006;33:77-81.
51. Tunon MJ, sanchez-campos S, Gutierrez B, ve ark. Effects of FK506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in rat hepatocytes . Biochemical pharmacology, 2003-66; 439-445.
52. Berman RS, Martin W. Arterial endothelial barrier dysfunction: actions of homocysteine and the hypoxanthine-xanthine oxidase free radical generating system. Br J Pharmacol. 1993;108:920-926.
53. Szabo C, Salzman AL, Ischiropoulos H. Endotoxin triggers the expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in the rat aorta in vivo. FEBS Lett. 1995;363:235-238.
54. Schoenberg MH, Birk D, Beger HG. Oxidative stress in acute and chronic pancreatitis. Am J Clin Nutr. 1995;62:1306S-1314.
55. Dobosz M, Hac S, Wajda Z. Does nitric oxide protect from microcirculatory disturbances in experimental acute pancreatitis in rats? Int J Microcirc Clin Exp. 1996;16:221-226.

56. Glawe C, Emmrich J, Sparmann G, ve ark. In vivo characterization of developing chronic pancreatitis in rats. *Lab Invest.* 2005;85:193-204.
57. Apte MV, Haber PS, Applegate TL, ve ark. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut.* 1998;43: 128-133.
58. Gressner AM. The cell biology of liver fibrogenesis: an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell Tissue Res.* 1998;292:447-452.
59. Le Pabic H, L'Helgoualc'h A, Coutant A, ve ark. Involvement of the serine/threonine p70S6 kinase in TGF-beta1-induced ADAM12 expression in cultured human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2005;43:1038–1044.
60. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, ve ark. *Nature.* 1994;30: 756-8.
61. Bellizzi AM, Bloomston M, Zhou XP, ve ark. The mTOR pathway is frequently activated in pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2010;18:442-7.
62. Jaster R, Hilgendorf I, Fitzner B, ve ark. Regulation of pancreatic stellate cell function in vitro: biological and molecular effects of all-trans retinoic acid. *Biochem Pharmacol.* 2003;66:633–641.
63. Pinzani M. Pancreatic stellate cells: new kids become mature. *Gut.* 2006;55:12–14.
64. Erkan M, Weis N, Pan Z, ve ark. Organ, inflammation and cancer specific transcriptional fingerprints of pancreatic and hepatic stellate cells.. *Mol Cancer.* 2010;23:9-88.
65. Bateman AC, Turner SM, Thomas KS, ve ark. Apoptosis and proliferation of acinar and islet cells in chronic pancreatitis: evidence for differential cell loss mediating preservation of islet function. *Gut.* 2002 ;50:542-8.
66. Roque M, Cordon-Cardo C, Fuster V, ve ark. Modulation of apoptosis, proliferation, and p27 expression in a porcine coronary angioplasty model. *Atherosclerosis* 2000;153: 315–322.

67. Baeuerle PA. Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF- κ B puzzle? *Curr Biol*, 1998;8,19-22.
68. Mehrhof FB, Schmidt-Ullrich R, Dietz R, et al. Regulation of vascular smooth muscle cell proliferation: role of NF- κ B revisited. *Circ Res*, 2005;96: 958–964.