



T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**TIKANMA İKTERİ YAPILAN RATLARDA  
ETANERCEPT'İN KARACIĞER  
HÜCRELERINE VE APOPTOZA ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. ERKAN KARACAN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Pars TUNÇYÜREK

**AYDIN-2018**

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**TIKANMA İKTERİ YAPILAN RATLARDA  
ETANERCEPT'İN KARACIĞER  
HÜCRELERİNE VE APOPTOZA ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ  
DR. ERKAN KARACAN

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Pars TUNÇYÜREK

**AYDIN-2018**

## TEŞEKKÜR

Adnan Menderes Üniversitesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet Ender DEMİRKİRAN başta olmak üzere,

Tezimin planlanması ve sürdürülmesinde tecrübelerinden ve bilgilerinden faydalandığım Değerli Hocam ve Tez Danışmanım, Sayın Prof.Dr. Pars TUNÇYÜREK' e, cerrahi eğitimim sürecinde her konuda yardım aldığım ve bana bu mesleği öğreten Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalının değerli öğretim üyelerine birlikte çalıştığım ve yardımlarını esirgemeyen tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma, histopatolojik incelemeleri ve değerlendirmeleri yapan Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Dr. Öğretim Üyesi Nesibe ÇETİN' e, biyokimyasal çalışmaları yürüten Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Çiğdem YENİSEY ve araştırma görevlisi Dr. Burçin İrem ABAS' a,

Destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili eşim Nagehan' a ve aileme, bu mesleği seçmemde etkili olan, üzerimde emeği bulunan tüm hocalarıma, birlikte çalıştığım hemşire hanımlara, görevli arkadaşlara ve tüm dostlarıma teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Dr. Erkan KARACAN

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	i
GRAFİKLER DİZİNİ .....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	iv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Karaciğer Anatomisi.....	4
2.2. Safra Fizyolojisi.....	5
2.3. Bilirubin Oluşumu .....	6
2.4. Kolestazis .....	7
2.5. Transaminazlar .....	9
2.6. TNF- $\alpha$ .....	10
2.7. Etanercept .....	11
2.8. Apoptoz ve Caspase-3 .....	13
2.9. High Mobility Group Box-1 (HMGB-1).....	14
2.10. Toll-Like Receptor 4 (TLR4) .....	16
3. MATERYAL VE METHOD .....	18
4. BULGULAR .....	20
5. TARTIŞMA.....	29
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	33
ÖZET .....	34
SUMMARY .....	35
KAYNAKLAR.....	38

## GRAFİKLER DİZİNİ

<b>Grafik 1:</b> Serum AST düzeyleri .....	20
<b>Grafik 2:</b> Serum ALT düzeyleri .....	21
<b>Grafik 3:</b> Serum ALP düzeyleri .....	21
<b>Grafik 4:</b> Serum total bilirubin düzeyleri .....	22
<b>Grafik 5:</b> Serum caspase- 3 düzeyleri .....	22
<b>Grafik 6:</b> Serum HMGB 1 düzeyleri .....	23
<b>Grafik 7:</b> Serum TLR-4 düzeyleri .....	23
<b>Grafik 8:</b> Serum TNF alfa düzeyleri .....	24
<b>Grafik 9:</b> Doku Caspase- 3 düzeyleri .....	24
<b>Grafik 10:</b> Doku HMGB- 1 düzeyleri .....	25
<b>Grafik 11:</b> Doku TLR- 4 düzeyleri.....	25
<b>Grafik 12:</b> Doku TNF alfa düzeyleri.....	26
<b>Grafik 13:</b> Karaciğerde dejenerasyon düzeyleri.....	26
<b>Grafik 14:</b> Karaciğer doku örneklerinde portal inflamasyon .....	27
<b>Grafik 15:</b> Karaciğerde odakal nekroz.....	27
<b>Grafik 16:</b> Karaciğerde periportal nekroz .....	28
<b>Grafik 17:</b> Karaciğerde fibrozis düzeyleri.....	28

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Ratta karaciğer loblarının ve safra yollarının şematik gösterimi.....	4
Şekil 2: Safra asidi sentezi .....	6
Şekil 3: Bilirubin sentezi.....	7
Şekil 4: Sarılık tipleri .....	8
Şekil 5: Çeşitli TNF- $\alpha$ blokerlerinin zincir yapıları.....	11
Şekil 6: Etanerceptin zincir yapısındaki moleküler kısımlar. ....	12
Şekil 7: Apoptozda intrinsik yolun şematize edilmesi.....	14
Şekil 8: Apoptozda HMGB 1' in rolünün şematize edilmesi .....	16
Şekil 9: Dilate safra kanalı .....	19

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALT: Alanin Aminotransferaz

ALP: Alkalen Fosfataz

AST: Asparatat Aminotransferaz

Bil: Bilirübin

BSP: Bromsülfoftalein

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

DAMP: Damage associated molecular patterns

DILI: Drug-induced Liver İnjury

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

GGT: Gama Glutamil Transferaz

HMG: High Mobility Group

HMGB: High Mobility Group box

LPS: Lipopolisakkarid

MRCP: Manyetik Rezonans Kolanjiyografi

PRR: Pattern Recognition Receptor

RES: Retiküloendotelyal Sistem

RNAi: RNA interferaz

SIRS: Systemic inflamatuvar response syndrome

TACE: TNF- $\alpha$  converting enzyme

T. Bil: Total Bilirübin

Th1: T helper lenfosit 1

Th2: T helper lenfosit 2

TNF- $\alpha$ : Tumor Nekroz Faktörü alfa

TNFR: TNF- $\alpha$  reseptörü

TLR: Tool like reseptör

TS: Tıkanma Sarılığı



# 1. GİRİŞ

Safra yollarının herhangi bir seviyesinde, herhangi hastalığa bağlı olarak gelişen kısmi veya tam tıkanıklık sonucu safra akışının engellenmesi ile tıkanma sarılığı oluşur. Kolestazda gelişen hastalarda morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenleri arasında sepsis gibi infeksiyöz komplikasyonların gelişimidir(1). Barsağa safra akışının olmamasına bağlı olarak safra ile atılan maddelerin kanda birikimine neden olur. Kolestaz sonucu ile retiküloendotelial sistem fonksiyon bozukluğu, intestinal mukozanın yapı ve fonksiyonlarında bozulma, immun sistem supresyonu, barsak duvarında oksidatif hasar, bakteriyemi ve endotoksemi gibi patolojik durumlar ortaya çıkar(2, 3). Bu patolojik değişiklikler ile barsak bariyer sistemi bozularak bakteriyel translokasyon ortaya çıkar(3).

Kolestazda bunlardan başka staza sekonder; karaciğer fonksiyon testlerinde bozulma, hepatositlerde dejenerasyon, hiperbilirubinemiye sekonder mental değişiklikler, kanama diyatezi meydana gelebilir. Safra yollarının tıkanması siroza kadar ilerleyebilen karaciğer hasarına neden olabilir(4). Karaciğer hasarında rol oynayan mediator ve sitokinlerden biri olan, tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), proinflamatuvar bir sitokindir. TNF- $\alpha$  fibroblast, makrofaj, T-lenfosit gibi hücrelerden sentezlenerek apoptoz üzerinde rol oynar(5). Dolayısıyla TNF- $\alpha$  etkinliği azaltılarak uzamış kolestaz durumlarında karaciğer hücre hasarı azaltılabilir. TNF- $\alpha$  etkinliğini azaltmak için geliştirilmiş olan Etanercept tip 2 TNF- $\alpha$  reseptörlerin füzyon proteini. Ayrıca, TNF reseptörlerine bağlanarak TNF- $\alpha$ 'nın etkinliğini nötralize eder(6, 7). Skleroderma, romatoid artrit, psöriatik artrit, ankilozan spondilit tarzı hastalıklarda Etanerceptin tedavide etkinliği gösterilmiştir(7).

TNF- $\alpha$  1975 yılında keşfedilmiş olup, inflamatuvar bir sitokindir. Lenfositler ve makrofajlardan inflamasyona, enfeksiyona ve travmaya yanıt olarak salınmakta ve plazma membranında ekspres edilmektedir. TNF- $\alpha$  molekülünün ya proinflamatuvar ya da antiinflamatuvar olarak davrandığı bunun da, efektör etkisinin(örn; makrofajlarda) veya hedef hücrelerde (örn; endotel hücrelerinde), sırasıyla ligand veya reseptör olarak salgılandığı ve değiştiği rapor edilmiştir. TNF- $\alpha$  reseptörünün (TNFR) aktivasyonunun akut faz reaksiyonlar, ateş, apoptoz ve anti-tümör aktivite ile ilgili olduğu bildirilmiştir. TNF- $\alpha$  genellikle sağlıklı bireylerde dolaşımında saptanamamaktadır, fakat bir çok inflamatuvar ve enfeksiyon durumlarında serum ve doku düzeyleri yükselmekte olup, serum

düzeylerinin ise enfeksiyonun şiddeti ile korele olduğu saptanmıştır. AntiTNF- $\alpha$  tedavisinin genellikle iyi tolere edildiği bildirilmekle birlikte önemli yan etkileri de bildirilmiştir. Bunlar; şiddetli enfeksiyon riski, malignite, hepatit B'nin tekrar aktive olması, Santral sinir sistemi' nin demyelinizasyonu, pansitopeni, kalp yetmezliği ve otoimmün hastalıkların tetiklenmesidir. Daha sonraları ise, antiTNF- $\alpha$  ile tedaviden sonra psoriasis, vaskülit, çeşitli dermatolojik reaksiyonlar, sarkoidoz ve oküler reaksiyonlar gözlemlendiği bildirilmiştir(8).

Kolestatik sarılıkta, enfeksiyöz patojenlere ek olarak hücrel stres ve hasar, alarm molekülleri olarak bilinen endojen moleküllerin salınımını tetikleyebilmektedir. Ya da, ekstrasellüler çevrede hasar ile ilgili moleküler patern (damage associated molecular patterns, DAMP), konakçıda immun sistem yanıtını başlatmakta olup Toll like receptor molekülleri (TLR1,2,4,6,7,9) salınmaktadır. HMGB1 (High mobility group box-1) proteininin ise ilk defa 1999 yılında farelerde endotoksin ile ilgili ölümlerde önemli bir molekül olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle, HMGB1 molekülünün kolestatik karaciğer hastalığının gelişmesinde önemli olabileceği öne sürülmüştür. Huang ve ark., çalışmalarında ratlarda tıkanma sarılığında glukokortikoidlerin HMGB1 ekspresyonunu ve TLR aktivasyonları araştırmışlar. Plazmada HMGB1 düzeylerini ölçmüşler ve yüksek saptamışlar. Ratlara glukokortikoid tedavisi uyguladıklarında ise karaciğerde HMGB1 protein ekspresyonunun ve serum düzeylerinin azaldığını saptamışlar. Yine, TLR2 ve TLR4 ekspresyonlarının HMGB1 sinyali ile ilişkili olduğunu rapor etmişler, bununla birlikte glukokortikoid tedavisinin TLR4 düzeylerine TLR2 düzeylerine kıyasla daha fazla etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgulardan, tıkanma sarılıklarında karaciğer hasarında HMGB1 –TLR4 ekseninin önemli bir rolü olduğunu belirtmişlerdir(9).

Literatür taramalarında, yukarıda sözü edilen biyobelirleyicilerin deneysel bir çalışmada hem doku hem de serum düzeyleri araştırılmamış olup, karaciğer hasarının bir göstergesi olarak öne sürülen bu belirleyiciler üzerinde etanerceptin etkileri incelenmemiştir. Bu bağlamda, cerrahi olarak koledoktu bağlanarak ratlarda oluşturulan geri dönüşümsüz safra stazı oluşturularak meydana gelen karaciğer hasarının etanercept alan deneklerle almayan kontrol grubunun farkının ortaya konulması için ratlarda serumda ve karaciğer dokularında TNF-  $\alpha$ , HMGB1, TLR4, caspase3 düzeyleri saptanacak olup, etanerceptin HMGB1-TLR 4 ekseninde etkileri araştırılacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Sarılık her hangi bir sebepten oluşan kolestaz sonucu, dolaşımdaki bilirubin düzeylerinin artmasına bağlı olarak deride, dokuda, skleralarda gelişen renk değişikliğidir(10).

Tıkanma sarılığı safra yollarının bir kısmında her hangi bir patolojiye bağlı kısmi veya komplet obstrüksiyona bağlı safra akışının yavaşlaması veya durması sonucu ortaya çıkan bir olaydır(11). Sarılıklı hastalarda bilirubin düzeylerinin 2-3 mg/ dl ' nin üzerine çıkması ile sarılık dışarıdan gözlenebilecek düzeylere ulaşır. Hiperbilirubineminin şiddeti ve sarılığın seviyesi pigmentlerin dokulara bağlanması, plazmadan hücreler arası sıvıya difüzyon hızı gibi bir çok faktöre bağlı olarak değişiklik gösterebilir(11).

Safra yolu tıkanıklığı sonrası kanda Aspartat Amino Transferaz(AST), Alanin Amino Transferaz (ALT) düzeylerinde az miktarda, Gama Glutamil Transferaz (GGT), Alkalen Fosfataz (ALP) düzeylerinde belirgin yükselme olur. Safra yolu tıkanıklığının tanısı klinik olarak laboratuvar değerleri ile birlikte abdominal ultrasonografi, MRCP(MR kolanjiyografi), Abdominal tomografi gibi görüntüleme tetkikleri ile desteklenerek tanı konur(12).

Safra salgısı hepatosit hücreleri tarafından oluşturulur. Ph 7.8 olup izosmotiktir. Günlük salgılanma miktarı 600-1200 ml kadardır(13). Safranin elektrolit konsantrasyonu, plazma elektrolit konsantrasyonundan farklılık gösterir. Safra sıvısındaki klor konsantrasyonu plazma klor konsantrasyonundan az olmasına karşın, sodyum potasyum kalsiyum ve bikarbonat konsantrasyonu plazma konsantrasyonlarından fazladır. Safra salgısındaki bikarbonatın fazla plazmadan fazla olması sekretin salgısıyla ilişkidir(14). Safra sekresyonu; safra ile kan arasındaki değişik substratların epiteliyal taşınması ile oluşur. Bu taşınma hepatosit plazma membranındaki yüksek dereceli polarizasyon ile sağlanır. Diğer bir transport epiteliye kanaliküler lümene lokalizedir(15).

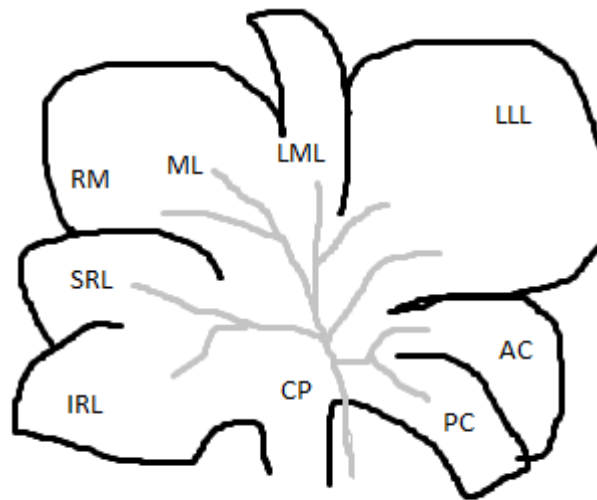
Hepatosit plazma membranı;sinüzoidal yapılardan, lateral membran ve kanaliküler aracılığı ile oluşur. Lateral membran ve sinüzoidal yapılarda sodyum potasyum pompası mevcuttur( $Na^+,K^+-ATPaz$ ) ve kandan hepatositlere protein ürünlerinin uptake'i sağlanır(safra asitleri, bilirubin ve ilaç gibi). Membran hepatositlerden kanaliküler lümene

substrat salınımının transportunda kanaliküler rol oynar. Alkalen fosfataz; kanaliküler membranda yer almaktadır, safranin sekresyon ve transportundaki rolü tam olarak açıklanamamıştır(16).

Kupffer hücresi Von Kupffer tarafından, 1876 yılında, özel altın klorid boya tekniği kullanılarak, karaciğer perisünizoidal bağ dokusu içerisinde gösterilmiş ve yıldız benzediği için “Sternzellen” adı ile (stern; yıldız) histoloji literatüründe yer almaya başlamıştır. Aynı araştırmacı daha sonra aynı hücrelerin mürekkep boyasını hücre içine aldığını keşfetmiş ve bir çeşit endotelial hücre olduğu sonucuna ulaşmıştır. Aschoff, 1924 yılında “Retiküloendotelial sistem” (RES) kavramını geliştirmiş ve koloidal boyaları hücre içine alan hücrelerin tümünün aynı aileden geldiğini iddaa etmiştir. 1980’li yıllarda Von Kupffer’in tanımladığı hücrelerin karaciğerde A vitamini ve yağ depolanmasından sorumlu olduğunu göstermiştir. Genel olarak fagositozis özelliği ile bilinmekle birlikte günümüzde yapılan çalışmalar sonucunda bazı hücrelerarası etkileşimlerde rol aldıkları keşfedilmiştir(17).

## 2.1. Karaciğer Anatomisi

Günümüzde tıkanma sarılığının deneysel modeli için en sık kullanılan hayvan sıçandır. Sıçanlarda hem geri dönüşümlü, hem de geri dönüşümsüz ekstrahepatik safra tıkanıklığı oluşturulabilmektedir.



**Şekil 1:** Ratta karaciğer loblarının ve safra yollarının şematik gösterimi

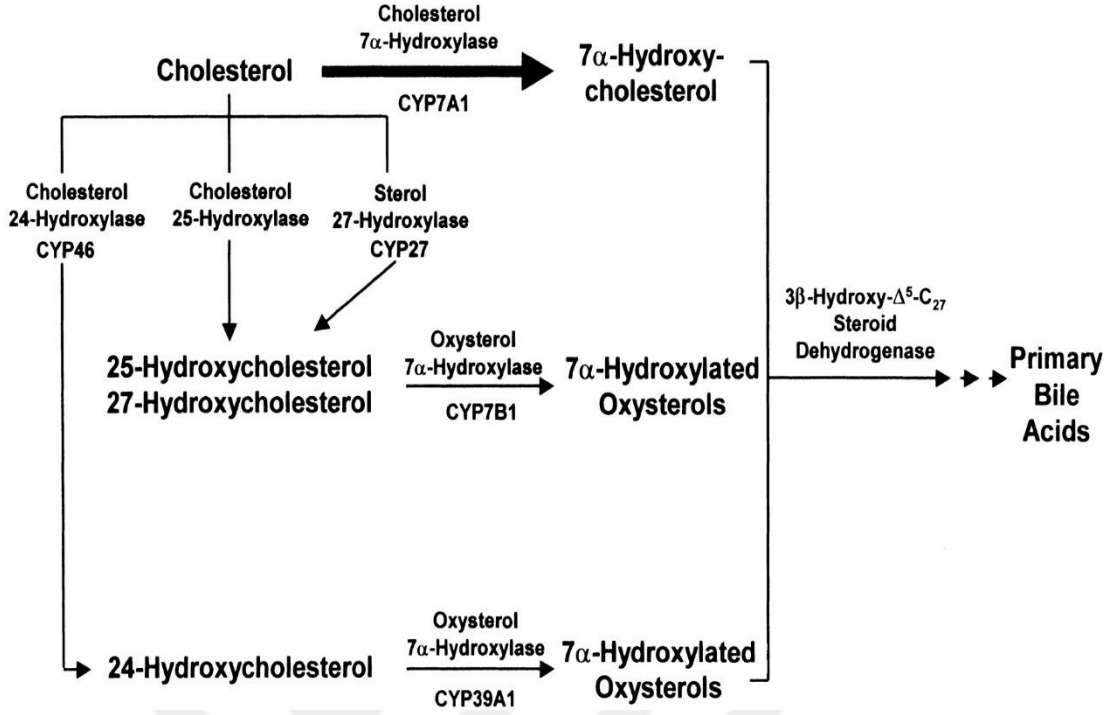
Ratlarda safra kesesi yoktur, karaciğer dört ana lobdan oluşur; median lob, sağ lateral lob, sol lob ve kaudat lob. Her lobdan safra kanalları direk gelir ve common bilier kanalda birleşir. Ratlarda safra kesesi olmadığı için safra içeriği direk olarak, pilorik sfinkterin 25 mm distalinden duodenuma dökülür(18).

## 2.2. Safra Fizyolojisi

Karaciğerden safra yollarına oradanda barsaklara salınan safra miktarı yaklaşık olarak 600-1200 ml' dir(19). Safra sindirimde rol oynayan salgılar içermesinin yanı sıra metabolik son ürünlerinde atıldığı bir salgıdır(20). Safra salgısı içerisinde safra pigmentleri (bilirubin, biliverdin), safra tuzları, fosfolipid (lesitin), kolesterol ve plazma elektrolitleri mevcuttur(21). Hepatositler tarafından sentezlenen safra küçük safra kanaliküllerine salınır. Küçük safra kanaliküllerinden interlobüler septumda terminal safra kanallarına dökülür. Sonrasında daha büyük safra kanallarına dökülerek en sonunda ana hepatic kanala dökülür. Safra kanalları boyunca epitelden salınan bikarbonat ve sodyum iyonları içeren salgı safraya katılır. Bu salgı sekretin ile uyarılarak safra miktarını %100'e kadar artırabilir. Bu sıvı mideden gelen asidi nötralize etmede rol oynar(22).

Sekretin jejunum, duodenum mukozasından kana salınarak safradaki sodyumbikarbonat ve su miktarını artırır. Kolesistokinin glukagon ve gastrinde sekretin ile benzer etkilere sahiptir. Sürrenal hormonların bir kısmı, prostaglandinler, diğer steroid hormonlar, bakır ve çinko gibi metaller, yağda eriyen vitaminler, penisilin, glukuronid ve glutatyon bileşikleri gibi ilaçlar ve toksinler de safra ile atılır(22). Bromsülfobalein (BSP) boyası karaciğer hücreleri tarafından safra salgısı ile atılır. Bu boyanın bu özelliğinden faydalanarak hepatic kan akımı ölçümü ve karaciğer fonksiyon testlerine bakılır(23).

Safra asitleri hepatositlerde sentezlenmeye başlar. Kolesterolün yapısına karbon eklenerek, kolesterolün beta halkasında çift bağ redükte edilir. Hidrokarbon zincirine oksidasyon ile karboksil grubu eklenerek zincir üç karbon kısılır. Böylelikle ortaya primer safra asitleri çıkar. Kolik ve kenodeoksikolik asit primer safra asitleridir. Safra asidi sentezinde hız kısıtlayıcı basamak steroid halkasının 7. Karbonuna, 7 alfa hidroksilaz enzimi yardımı ile hidroksil eklendiği basamaktır. Kolik asit tarafından enziminin inhibisyonu bu basamakta negatif kontrol sağlanır(24).



**Şekil 2:** Safra asidi sentezi

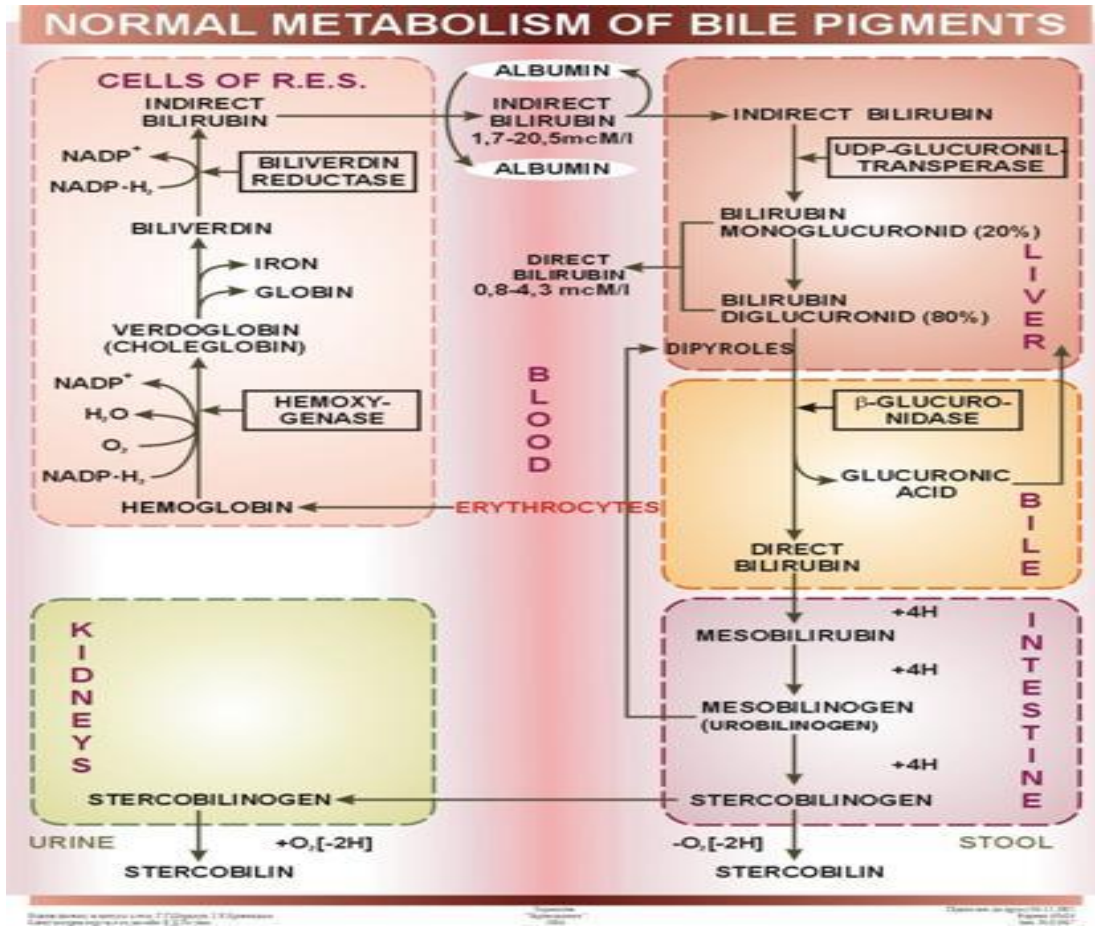
Kolik ve kenodeoksikolik asit safra asitlerinin yaklaşık % 90'ını oluşturur. Fizyolojik pH'ta çözünürlükleri çok düşüktür. Safra asitleri karaciğerden salınmadan önce glisin veya taurinile konjuge edilirler. Konjugasyon sonucu oluşan yapılar safra tuzları olarak adlandırılırlar. Glikolik ve glikokenodeoksikolik asit ile taurokolik ve taurokenodeoksikolik asit safra tuzlarının bazılarıdır. Konjugasyon ile molekülde pKa' sı daha düşük bir karboksil veya sülfat grubunun varlığına neden olur. Bu işlem ile safra asitlerinin fizyolojik sıvılardaki çözünürlüğü artmış olur(24).

### 2.3. Bilirubin Oluşumu

Bilirubin eritrositlerin karaciğer ve dalakta yıkılması sonucu oluşarak dolaşımdan uzaklaştırılması safra yolu ile olmaktadır. Eritrosit membranının yırtılması sonucu ortaya çıkan hemoglobin doku makrofajları tarafından fagosite edilerek ortaya hem ve globin çıkar. Hem halkası açılarak demir ve dört pirol çekirdeği ortaya çıkar. Dört pirol çekirdeği düz bir zincir yaparak safra pigmentlerini oluşturur. Safra pigmentlerinden ilki biliverdindir. Biliverdin indirgenerek bilirubini oluşturur. Bilirubin albumine bağlanarak karaciğere taşınır. Karaciğerde bilirubin % 80' i glukuronik asitle birleşerek bilirubin glukuronat, %10' u sülfatla birleşerek bilirubin sülfat olur.

Ankonjuge bilirubin yağda çözülebilen bir yapıya sahiptir. Albumine bağlanarak yüksek kan düzeylerinde dahi idrarla atılamayarak dokularda birikebilir. İnsan beyinde toksik hasara neden olur.

Konjuge bilirubin suda eriyip albumine bağlanarak taşınarak yüksek kan düzeylerinde(tıkanma sarılıklarında) idrarla atılır. Bilirubinler konjuge ve ankonjuge formlarında aktif transportla safra kanalcıklarına çıkarılır(12).



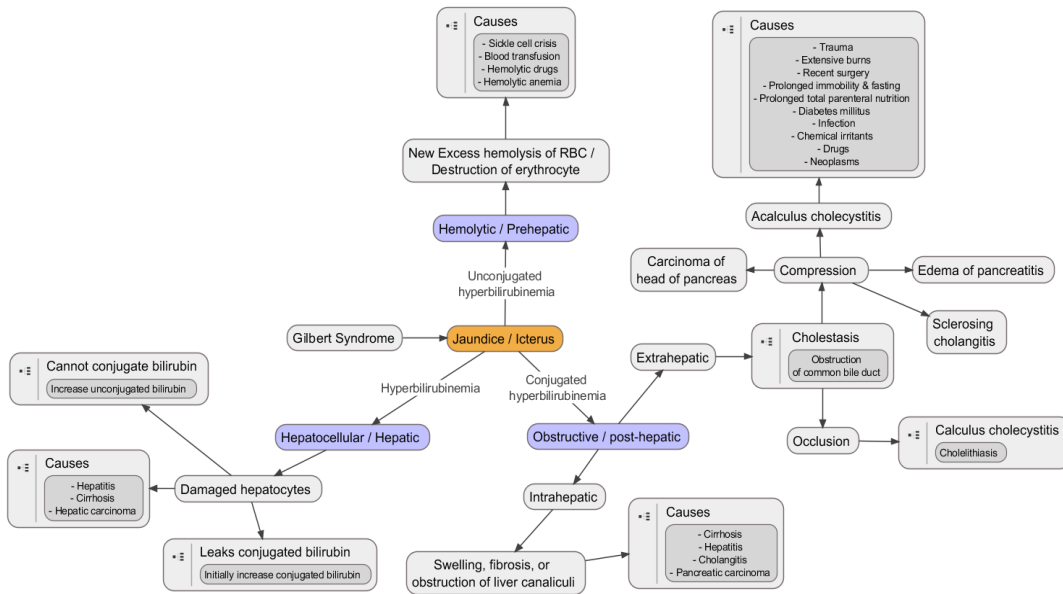
Şekil 3: Bilirubin sentezi

## 2.4. Kolestazis

Kolestazis safra akışının kesintiye uğraması sonucu çıkan klinik tablodur. Ekstrahepatik ve intrahepatik olarak ikiye ayrılır. Ekstrahepatik kolestazis dış safra yollarının herhangi bir kısmındaki tıkanıklığa(tümör,taş,parazit gibi) bağlı olarak ortaya çıkar. İntrahepatik kolestazis intrahepatik safra kanallarının tıkanması(primer biliyer siroz), primer veya sekonder karaciğer tümörleri, granulomlar, lenfoma ile infiltrasyon ve diğer

yer kaplayan lezyonlar, ikincisi ise kanaliküler içinde ki safra akımında bozulma hepatit ve genetik hastalıklara bağlı kolestazis bağı olarak ortaya çıkar(16).

Hiperbilirubinemi, indirekt(non konjuge), direkt(konjuge) olarak ikiye ayrılır. Non konjue hiperbilirubinemi aşırı bilirubin yapımı, bilirubinün hepatositler tarafından alınımının azalması, bilirubin konjugasyonunda bozulmaya sekonder olarak ortaya çıkar. Aşırı bilirubin yapımı nedenleri arasında inefektif eritropoez, internal hemorajilerin resorbsiyonu, hemolitik anemiler sayılabilir. Hepatositler tarafından alımın azalmasına neden olarak ilaçlar(rifampin, kontrast maddeler), gilbert sendromunun bazı vakaları sayılabilir. Bilirubin konjugasyonunda bozulma nedenleri arasında diffüz hepatoselüler hastalık(siroz, hepatit), crigler najar sendromu tip I-II, gilbert sendromu, yenidoğanın fizyolojik sarılığı sayılabilir. Konjuge hiperbilirubinemi karaciğerden bilirubin atılımında azalma, ekstrahepatik safra yollarında tıkanmaya sekonder gelişir. Karaciğerden bilirubin atılımında azalma sepsis, viral hepatitler, dubin johnson sendromu, rotor sendromu, ilaçlar(oral kontraseptif), sklerozan kolanjit, primer bilier siroza bağı olarak gerçekleşir. Ekstrahepatik safra yollarında tıkanıklık safra yollarında darlık(sklerozan kolanjit, iatrojenik), pankreas başı tümörleri, safra yolları tümörleri, ekstrahepatik biliyer atrezi, paraziter enfeksiyonlar(fasciola hepatica, echinococcus granulosus), safra taşlarına bağı ortaya çıkar(25).



Şekil 4: Sarılık tipleri

Ratlarda en uygun sarılık modeli ortak safra kanalı bağlanarak sağlanabilir. Ana safra kanalı bağlanması ile mikrovilluslarda kayıp, safra kanaliküllerinde dilatasyon hücreler arası bileşkelerde değişiklikler meydana çıkar. Böylelikle kanaliküler permeabilitede artışa yol olur, sonuç olarak safra lenfatik ve kan dolaşımına karışır(26). Kanaliküllerin tıkanması ile hepatositlerde patolojik değişiklikler ortaya çıkar. Safra asit salınımının olmaması sonucu toksik olan safra asitlerinin ve organik anyonlar hepatositlerde birikir. ALP ve kolesterol artışıyla hepatosit metabolizmasında değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Biliyer obstrüksiyon süresinin uzaması insanlarda ve farelerde duktuler proliferasyon, fibrozis sekonder biliyer siroza neden olabilir(27). Duktuler proliferasyon ve fibrozisin kesin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Sekonder biliyer siroz; portal hipertansiyon ve hiperdinamik dolaşıma sekonder olarak ortaya çıkar(28). Kolestazise bağlı olan karaciğer hasarı safra drenajı tekrar sağlandığında geri dönüşümlü olarak geriler(29). Aynı klinik durum insanlar içinde geçerlidir(30).

Tıkanma sarılığında, safra asidinin intestinal sisteme geçememesinden dolayı ince barsaklarda sağlanan antiendotoksin etkinin kalkması nedeni ile intestinal sistemden portal sisteme geçen endotoksin miktarı artmaktadır. Tıkanma sarılığında işlevleri bozulan kuppfer hücrelerinin endotoksinleri yeterli fagosite edememesi nedeni ile endotoksinler sistemk dolaşıma geçmektedirler. Dolaşımda artan endotoksinlerin enflamatuvar proçesi tetiklemesi sonucu serbest oksijen radikalleri artmakta sonucunda karaciğer fibrozisine, çoklu organ fonksiyon yetmezliğine hatta ölüme neden olabilmektedir(31, 32).

## **2.5. Transaminazlar**

Karaciğer ile ilgili testler denilince akla ilk olarak gelen testler aspartat aminotransferaz(AST), alanin aminotransferaz(ALT), gamaglutamil transferaz(GGT), alkale fosfataz(ALP)' dir. AST ve ALT aminotransferaz grubu içinde karaciğer hasarını gösterir. Karaciğer hücre yıkımı ile artan permeabilite ile bu enzimler hücre dışına çıkarak kandaki miktarı artar. AST, ALT karaciğer sinüzoid hücreleri ve retikuloendotelyal sistem tarafından katabolize edilir. ALT karaciğer hücresinde sitozolde bulunurken, AST sitozol ve mitokondride bulunur. Karaciğer dışı organlar(kas, iskelet, böbrek, beyin, pankreas) da AST içerir. ALT yalnızca karaciğere spesifik olup başka organlarda bulunmaz. Bundan dolayı ALT karaciğer hasarında AST' ye göre daha spesifiktir. Tek başına AST yüksekliği ekstrahepatik bir hasarı düşündürür. AST ve ALT düzeyleri hepatotoksik ajanlara maruz

kalma, ilaçlar, iskemik hepatit, şok karaciğeri, akut viral hepatitlerde 50-100 kat gibi şırı oranda artış gösterir. AST/ALT oranı ayırıcı tanıda yardımcı olabilir. Karaciğer patolojilerinde AST/ ALT oranı 1' e eşit veya daha azdır. Alkolik karaciğer hastalığı, wilson hastalığı, konjestif karaciğer hastalığı, karaciğer metastatik tümörlerinde daha fazladır. Alkolik hepatitte AST/ALT oranı 2' den daha fazla olur ve üzeri değerlerde alkolik hapatit açısından daha anlamlıdır. AST/ALT oranı 4 ve üzeri olduğunda fulminan hepatit, wilson hastalığı olasılığı daha yüksektir. Bu etkenler dışlandığında AST/ALT oranının 1 olması sirozu düşündürür. Aminotransferaz değerleri klinik takiplerde düzelmesi karaciğer hastalığının gerilemesine yönelik yorumlanır. Ancak aminotransferazların ani düşüşü fulminant hepatitlerde gözlenir ve kötü prognoz göstergesidir. Serum ALP kemik, karaciğer, ince barsaklardan köken alır. Gebelikte, çocuklarda büyüme dönemi, hiperparatiroidi tablolarında ALP artışı olabilir. ALP artışının karaciğer kökenli olduğunu anlamak için GGT, lösin aminopeptidaz, 5' nükleotidaz değerlerine bakılmalıdır. Günümüzde GGT, ALP artışının kemik kökenli olup olmadığını anlamak için kullanılır(33).

## 2.6. TNF- $\alpha$

Tümör nekrozis faktör- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), inflamasyon sürecinde önemli bir rol oynar. Bu nedenle son yıllarda TNF- $\alpha$  inhibitörleri ankilozan spondilit, crohn hastalığı, psöriazis, psöriatik artrit, romatoid artrit gibi inflamatuvar hastalıkların tedavisinde önemli bir rol üstlenmiştir(34).TNF- $\alpha$ , proinflamatuvar bir sitokin olup akut faz reaksiyonunu uyarır. Apoptotizisi ve inflamasyonu indükleyerek, viral replikasyon ve tümör gelişimini inhibe eder. T lenfositler ve aktive makrofajlardan transmembran prekürsörü olarak salınır.Metalloproteaz özellikle bir enzim olan “TNF- $\alpha$  converting enzyme(TACE)” prekürsör TNF- $\alpha$ ' nın kuyruğunu parçalayarak TNF' in açığa çıkmasını sağlar(35). Üç TNF monomeri bir araya gelerek trimerik TNF'yi oluşturur. Trimerik TNF iki reseptörden birine, TNFR1 veya TNFR2'ye bağlanarak aktivitegösterir(36).

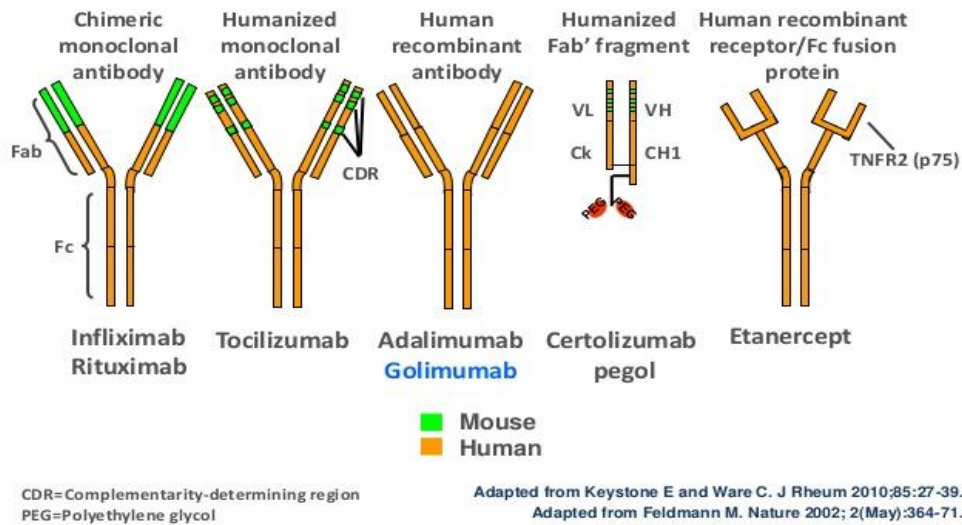
Makrofajlar TNF üretiminde öncelikli rol oynar. TNF ayrıca T ve B lenfositler, mast hücreleri, fibroblastlar, keratinositler, osteoblastlar, düz kas hücreleri, endotel hücreleri, epitel hücreleri ve tümör hücreleri tarafından da sentezlenir. Bakteriler tarafından ortama salınan ürünler (lipopolisakkarid v.b.), sitokinler (Interlökin 1, interferon gama, TNF v.b.), virüsler (HIV, influenza A), parazitler (plasmodium ve entamoeba

v.b.),komplemanlar (C5a), immün kompleksler, forbol ester, kalsiyum iyonofor, ultraviyole ışınlanması TNF sentezini stimüle eder(8). Bakteriye lipopolisakkaritlere yanıt olarak çok miktarda üretilen TNF'in septik şok yanıtında rolü bulunur(37). Siklik AMP (cAMP), sitokinler (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, TGF-β), siklik nükleotid fosfodiesteraz inhibitörleri(pentoksifilin ve rolipram), siklosporin A, deksametazon, virüsler (epstein barr virüsü gibi)TNF üretimini baskılar.

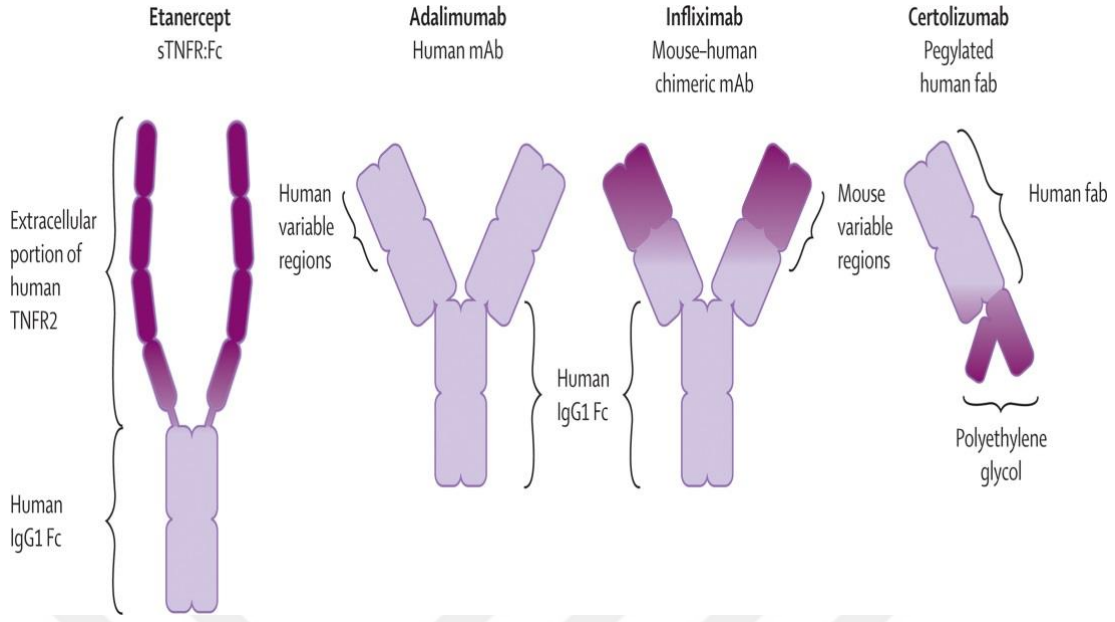
## 2.7. Etanercept

Etanercept (Enbrel\*) bir TNF-α inhibitörü olup, tuzak bir reseptör olarak TNF-α molekülünü bağlamakta ve ticari olarak kullanıma hazır formu bulunmaktadır. Etanercept, bir füzyon proteini olup, rekombinant DNA tarafından üretilen biyolojik bir ilaçtır. Etanercept, TNF-α'nın inflamatuvar etkisini azaltmakta, romatoid artrit, ankilozan spondilit ve psoriasis gibi hastalıklarda kullanılmaktadır. Buna ek olarak son çalışmalarda, sistematik olarak etanerceptin enjeksiyonu sonucunda rat glokom modelinde, retinal ganglion hücre kaybının efektif olarak önleniği gösterilmiş olup, TNF-α ve reseptör düzeylerinin yüksek olarak tespit edildiği saptanmıştır. Aynı şekilde, endotoksin ile indüklenen üvetisde de TNF-α inhibitörü olarak, etanerceptin kullanılmış olup, tedavi de başarı sağlandığı bildirilmiştir(38).

## TNF Blockers: Antibodies and Fusion Proteins



Şekil 5: Çeşitli TNF-α blokerlerinin zincir yapıları.



**Şekil 6:** Etanerceptin zincir yapısındaki moleküler kısımlar.

TNF- $\alpha$  antagonistleri, romatoid artrit (RA), inflamatuvar barsak hastalıkları (IBD) ve psoriasis gibi çeşitli inflamatuvar durumlarda tedavide bir yenilik yaratmışlardır. Her ne kadar, infliximab, adalimumab ve etanercept gibi antagonistlerin nispeten az yan etkileri olsa da, idiosyncratic (kendine özgü) karaciğer hasarı ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Veriler ilaç ile indüklenen karaciğer hasarına (drug-induced liver injury, DILI) neden olduklarını gösterse de, bu verilerin sadece vaka takdimi (case-report) olarak yayınlanmasından dolayı tarafsız olarak kabul edilmemektedir(4).

Karaciğerde hücre ile tedavide transplante edilen hücrelerin aşılınması çok kritiktir, nötrofillerin veya Kupffer hücrelerinin aktivasyonundan sonra, transplante edilen hücrelerin çoğu karaciğer sinüzoidleri tarafından proinflamatuvar sitokinler/kemokinler/reseptörler tarafından hızlı bir şekilde karaciğerden temizlenmektedir. Wiswanathan ve ark., çalışmalarında hücre-transplantasyonu ile indüklenen hepatik inflamasyonda, TNF- $\alpha$  antagonisti olan etanerceptin ratlarda hepatosit transplantasyonunda etkisini araştırmışlar. Hücre transplantasyonundan sonra, bir çok sitokin/kemokin/reseptörlerin miktarlarında artış olduğunu, halbuki hücre transplantasyonundan önce etanercept kullanımının bu yanıtı normalize ettiğini bildirmişlerdir. Bundan başka, etanerceptin hücre transplantasyonu ile indüklenen intrahepatik sekretuar sitokinlerin [High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1)

gibi salınımını önemli ölçüde azalttığını rapor etmişlerdir. Etanerceptin bu etkisinin hücre transplantasyonu ile ilgili nötrofillerin aktivasyonunu azalttığı, fakat Kupffer hücrelerine etkisi olmadığını bildirmişlerdir. Etanerceptinin yüksek dozları ile muamele edilen hayvanlarda transplante edilen hücrelerin reddedilmesinin azaldığı bildirilmiştir(7).

Garcia Aparicio AM ve ark., vaka raporunda infliximab ile anti-TNF- $\alpha$  tedavisi olan spondiloartropati hastasında, tedavi sırasında şiddetli karaciğer fonksiyon bozukluğu saptamışlar ve ikinci infüzyondan sonra ise serum transaminazlarda yavaşça bir yükselme olduğunu, infliximabın beşinci infüzyonundan önce ise şiddetli karaciğer hasarı geliştiğini (AST 327 mU/ml, ALT 656 mU/ml, GGT 140 mU/ml, ALP 227 mU/ml) bu nedenle tedaviyi durduklarını bildirmişlerdir. İnfliximabın kesilmesinden 10 gün sonra ise serumda karaciğer testlerinin normal seviyelere düştüğünü fakat ankilozan spondilit semptomlarının tekrarladığını bildirmişlerdir. Böylece, hastayı etanercept ile tedavi ettiklerini ve bu değerlerin 5 ay boyunca hiç değişmediğini bildirmişlerdir(6).

## 2.8. Apoptoz ve Caspase-3

Apoptoz mekanizmasında üç temel grup rol alır. Bunlar: Ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve proteolitik enzimlerdir (kaspazlar). Ölüm reseptörleri; TNF reseptör gen ailesine aittir. Bu reseptör polipeptidlerin sitoplazmik bölümleri, ölüm alanı adı verilen bir aminoasit dizisini içerir ve adaptör proteinlere bağlanırlar. Memeli hücrelerinde sistein proteaz ailesinden olan kaspazların aktif merkezinde sistein yer alır ve sitoplazmada inaktif prokürsörler olarak bulunur. Sitokrom c'nin sitoplazma içine salınması ile apoptozun son basamaklarından sorumlu enzim sistemi olan kaspazlar aktive olur. Proteolitik parçalanmadan sonra kaspazlar aktif hale geçerler ve böylece kaspaz aktivasyon zinciri başlar. Başlangıçta, kaspazlar mitokondride membran hasarı oluşturur ve bu olayların sonucunda; zar değişimleri, hücre iskeleti ve çekirdek değişimine yol açan hasarlar ortaya çıkar(39, 40).

Şimdiye kadar sitozolde bulunan 14 kaspaz tanımlanmıştır. Kaspazlar bir seri olaylar dizisinde diğer prokaspazları aktive ederler. Ölüm sinyali veren başlatıcı kaspazlar, adaptöre bağlanırlar ve ölüme yönlendirirler ama infazı gerçekleştirmezler bunu yapacak olanları aktifleştirirler. İnfazı gerçekleştiren uygulayıcı kaspazlardır. Uygulayıcı kaspazlar, başlatıcı kaspazların akışını aktive ederler. Apoptotik programın merkezi bileşeni

kaspazlardır. Kaspaz aktivasyonu hücreye özgüdür ve kaspaz inhibitörlerinin efektör kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiştir(41).

Çeşitli araştırmalarda karaciğer hasarında apoptotik hücre ölümünün anahtar bir rolü olduğu öne sürülmüş olup, deneysel modellerde anti-apoptotik stratejilerin tedavideki potansiyel etkileri araştırmaya yönelmiştir. Karaciğerde hücre kaybının moleküler mekanizmasının anlaşılması ve karaciğerde hücre kaybının regülasyonu düzenlenmesi tedavi de önemli bir rol oynayacaktır. Kaspaz3 molekülü intrinsik apoptotik mekanizmada anahtar rolü oynayan en önemli moleküllerden biridir(42)

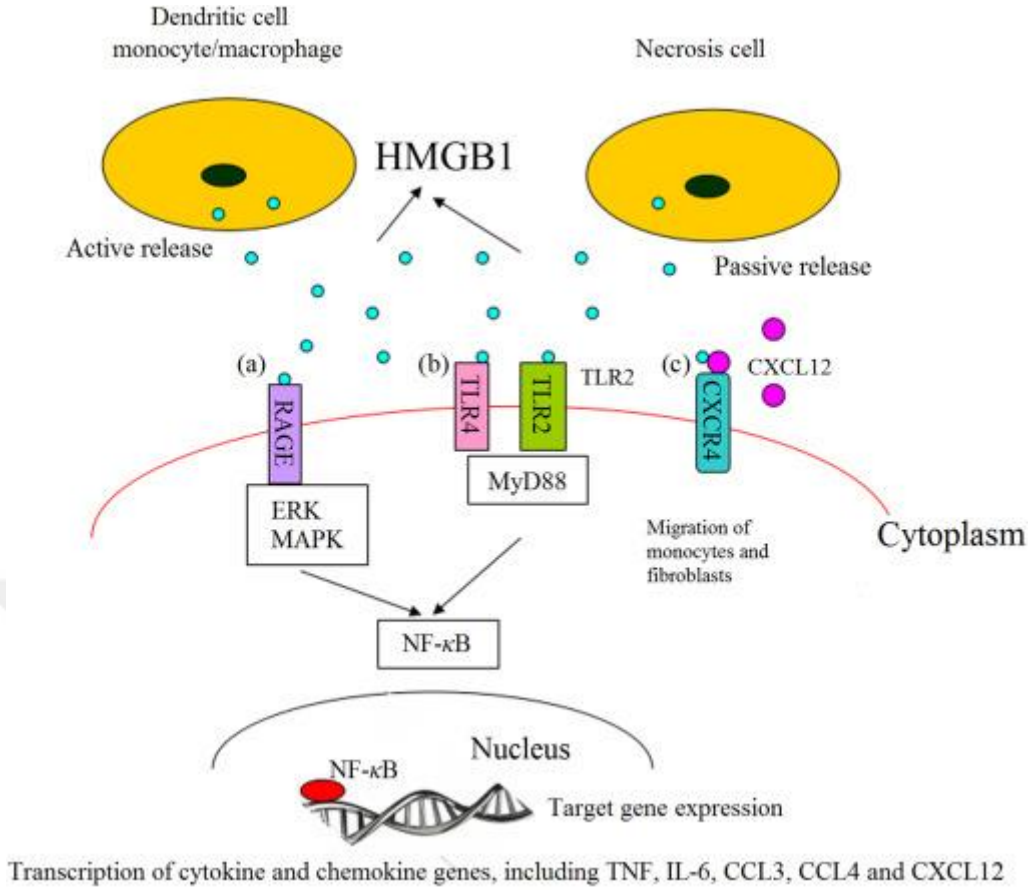


Şekil 7: Apoptozda intrinsik yolun şematize edilmesi

## 2.9. High Mobility Group Box-1 (HMGB-1)

Kompleks genetik ve fizyolojik değişkenler aynı zamanda çevresel değişkenler kromozomlarda dayanıksızlık, zamanı gelmeden hücre ölümleri, yanlış farklılaşmanın gelişmesine neden olmakta ve değişen metabolizma insanlarda hastalığın patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Bu moleküler olayların aydınlatılması tanıda yeni belirleyicilerin geliştirilmesi ve yeni tedavi yöntemlerini ortaya çıkaracaktır. 1973'de bir grup histon içinde

olmayan çekirdek proteinlerinin yüksek elektroforetik mobilitesi olduğu saptanmış olup, bunlara High Mobility Group (HMG) proteinleri adı verilmiştir(43). HMG proteinleri içinde HMGB1 proteinleri en fazla bulunan ve en iyi tanımlanmış moleküllerdir. Bunlar hücrel stres yanıtına hassas ve koordine eden moleküller olup, hücre içinde sadece DNA şaperonları olarak kritik bir rol oynamazlar, aynı zamanda kromozomların koruyucuları, otofajinin gerçekleşmesini desteklemesi, apoptotik hücre ölümünden korumasında önemli bir rol oynarlar. Bununla birlikte, hücre dışında damage-associated molecular pattern molecule (DAMP) olarak rol oynarlar. Bütün bu karakteristik özellikler HMGB1 molekülünü, enfeksiyöz hastalıklar, iskemi, immun hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, metabolik hastalıklar ve kanserde kritik bir moleküler hedef yapmaktadır. Gerçekten de bu gibi durumlarda *in vivo* ve *in vitro* HMGB1 ekspresyonunu, salınımını ve aktivasyonunu inhibe etme stratejisine gidilmiştir(9).HMGB1 reseptörü ve sinyal yolağı için kullanılan inhibitörler ise, antikorlar, peptid inhibitörleri, RNAi (RNA interferaz veya RNA girişimi canlı hücreler içinde yer alan ve hangi genlerin aktif olacağını ve nasıl aktif olacaklarını belirleyen ve kontrol eden bir sistemin ismi), anti-koagülantlar, endojen hormonlar, çeşitli kimyasal bileşiklerdir. Biobelirteçler normal biyolojik yanıtlarda, patojenik proselerde ve farmakolojik yanıtın ölçülmesinde objektif olarak durumun değerlendirilmesine yaramaktadırlar. Bir çok çalışmada HMGB1 molekülünün serum, plazma, BOS, sputum, idrar, fekal ve dokuda ölçümleri hastalığın teşhisinde, tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde ve prognozun belirlenmesinde biobelirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ve Western Blot teknikleri ile saptanabilmektedir. Dokuda ise immunohistokimya ile yeri saptanabilmektedir. Bu molekülün kolestatik karaciğer hasarının gelişiminde önemli katkıları olabileceği bildirilmektedir(44).



Şekil 8: Apoptozda HMGB1' in rolünün şematize edilmesi

## 2.10. Toll-Like Receptor 4 (TLR4)

Toll-like reseptör(TLR) ailesi memelilerde enfeksiyon sırasında konakçıya sinyal gönderen reseptörleri tanıyan ve en iyi karakterize edilmiş yapılar olup immun sistem yanıtını başlatmakta, kronik veya akut inflamatuvar hastalıklarda bakterial endotoksinler yoluyla aktivasyonu gelişmiş ülkelerde sıklıkla rastlanmaya başlamıştır. Bu patolojilerin düzeltilmesinde TLR4 yolunun modülasyonu potansiyel bir tedavi stratejisi olarak düşünülmektedir. Bu hastalıklar arasında sepsis hayatı tehdit eden ve henüz spesifik farmakolojik bir tedavisi olmayan, ciddi bir akut sistem inflamasyonu olup TLR4 anormal bir şekilde aktive olmaktadır(45).

Toll-like reseptör ailesi pattern recognition receptor(PRR) ailesi içinde en çok çalışılan olup bunların içinde TLR4 ise farklı patojenlerle konakçının enfeksiyonunda en çok çalışılan moleküldür. TLR4 spesifik olarak bakterial lipopolisakkaridi tanımakta ve aktivasyonu sonucunda pro-inflamatuvar sitokinler ve kemokinler sentezlenmektedir. Son

yıllarda, sentetik TLR antagonistlerinin kullanılması yardımcı Th1 veya Th2 hücrelerini stimüle etmekte ve gerçekçi terapötik bir hedef olmaktadır. TLR'ler ilk olarak 1990'larda tanımlanmaya başlamakla birlikte TLR4 geni 1994 yılında farelerde LPS kromozom bölgesinde saptanmıştır. LPS'leri tanımakla birlikte, dış membranın majör komponenti olan gram-negatif bakterileri de tanımaktadır(46).

TLR sinyali sonucunda tip-1 interferon ile birlikte stimüle olan moleküller veya inflamatuvar proteinler üretilmektedir. İnflamatuvar proteinler ise sitokinler, kemokinler ve insanlarda kolestatik sirotik karaciğer ve ratlarda bağlanmış safra kanallarında bulunan hepsidin molekülü gibi antimikrobiyal peptidleri içermektedir. Enfeksiyöz patojenlere ek olarak, hücrel stres ve tıkanma sarılığı ile ilgili bir hasar topluca endojen moleküllerin salınımı tetiklenmekte ve ekstrasellüler bölgede DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) ortaya çıkmaktadır. Bunun sonucunda konakçıda var olan immun sistem ve TLR'ler aktive olmaktadır(47).

### 3. MATERYAL VE METHOD

Çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alındıktan sonra (13.06.2017 tarih, 64583101/2017/056 sayılı onay belgesi) A.Ü.T.F. Deneysel Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Deney hayvanı olarak ağırlıkları 200-280 gram arasında değişen, Wistar Albino türü 30 adet dişi sıçan üzerinde çalışıldı.

Her grupta 10 adet hayvan içeren deney, kontrol ve sham grubu olmak üzere toplam 3 grup oluşturuldu. Sham grubu anestezi maddelerinin ve olası risklerin diğer gruplarla karşılaştırılması, çalışmanın standardize edilmesi amacıyla oluşturuldu.

Grup I (n=10): Sham Grubu Laparotomi sonrası ana safra kanalı ortaya konup batın kapatıldı ve takiben hayvanlara 7 gün süre ile standart yem ve su verildi.

Grup II (n=10): Kontrol Grubu Laparotomi sonrası ana safra kanalı ortaya konup 4/0 ipek ile bağlanan hayvanlara 7 gün süre ile standart yem ve su verildi.

Grup III (n=10): Deney Grubu Laparotomi sonrasında ana safra kanalı ortaya konup 4/0 ipek ile bağlanan hayvanlara 7 gün süre ile standart yem ve su verildi. Bu gruptaki hayvanlara, safra kanalı bağlandıkları günden itibaren 7 gün boyunca 2 mg/kg dozunda intraperitoneal etanercept verildi.

Tüm hayvanlara 50 mg/kg ketamin sodyum ve 50 mg/kg ksilazin ile (intraperitoneal) genel anestezi sağlandıktan sonra batın ön duvarı tüyleri kesilerek povidon iyot ile saha temizliği yapıldı. Sağ subkostal kesi ile batına girildi. Sham grubunda ana safra kanalı bulundu ve bırakıldı. Kontrol ve deney grubu hayvanlarda ana safra kanalı bulundu. Dissektör ile ana safra kanalı döndü ve no:4/0 ipek ile ligate edildi. Takiben katlar anatomisine uygun olarak no:3/0 ipeklerle kapatıldı. Sütür hattı povidon iyot ile temizlendi. Hayvanlar anesteziden çıkmak üzere sıcak ortama alındı. Operasyon sonrası 6'ncı saatte oral beslenmeye başlandı.

Deney grubundaki hayvanlarda postop 2 gün içinde ikter gelişti ve koledok ligate edildiği günden itibaren günlük intraperitoneal 2 mg/kg dozunda etanercept verildi. 7 gün boyunca hayvanların hepsi standart yem ve su ile beslendi. Postop 7'inci günde tüm

hayvanlara 50 mg/kg ketamin sodyum ve 50 mg/kg ksilazin ile(intraperitoneal) genel anestezi sağlandıktan sonra eski insizyonlarından batına girildi. Safra kanalı bağlanan hayvanların safra kanalını dilate olduğu görüldü.Tüm hayvanlardan biyokimyasal parametreler için kan örneği alındı. Histopatolojikinceleme için karaciğerden örnekler alındı. Örnekler alındıktan sonra ratlar servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi.

Alınan karaciğer örnekleri patolojik inceleme için %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonu içine konuldu. Dokular solüsyon içinde fikse edildikten sonra karaciğerlerden örnekler alınarak kasetlendi. Daha sonra otomatik doku takip cihazında 14 saat süre ile takip işlemi yapıldı. Takip işlemi ardından dokular parafinde tesbitlendi, sonra elde edilen parafin bloklardan mikrotom (Thermo Shandon) ile 3-4 mikron kalınlıkta kesitler hazırlandı. Kesitlerden hazırlanan lamalar rutin histopatolojik inceleme ve fibrozis değerlendirilmesi için hematoksilin–eozin ve Trichrom ile boyandı. Preparatlar Olympus BX52 ışık mikroskopunda 20X ve 40X büyütme ile değerlendirildi. Mikroskoba bağlı olan Olympus marka fotoğraf makinası ile fotoğraflandı. Karaciğer dokuları odaksal nekroz, fibrozis, dejenerasyon, portal inflamasyon, steatoz, periportal nekroz açısından değerlendirildi

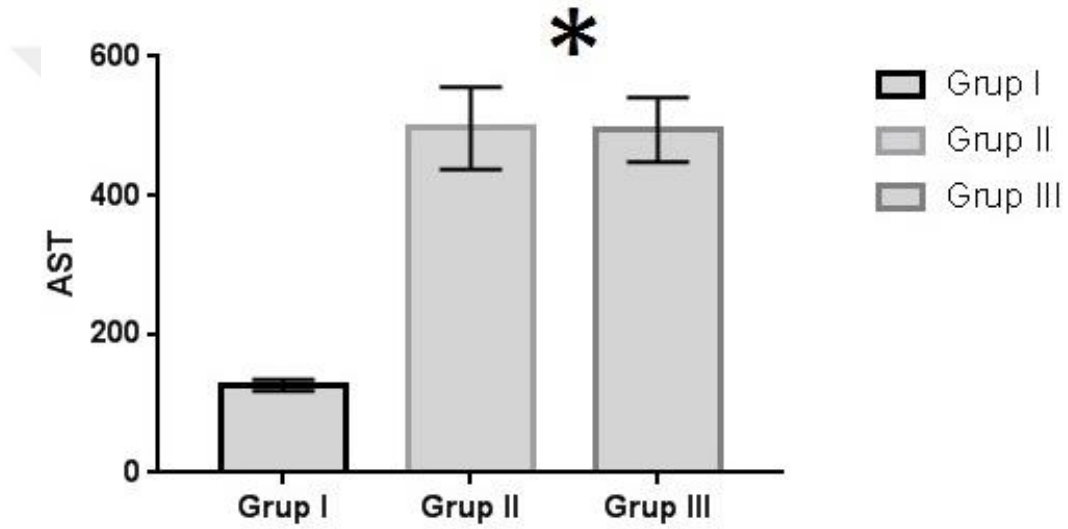


**Şekil 9:** Dilate safra kanalı

## 4. BULGULAR

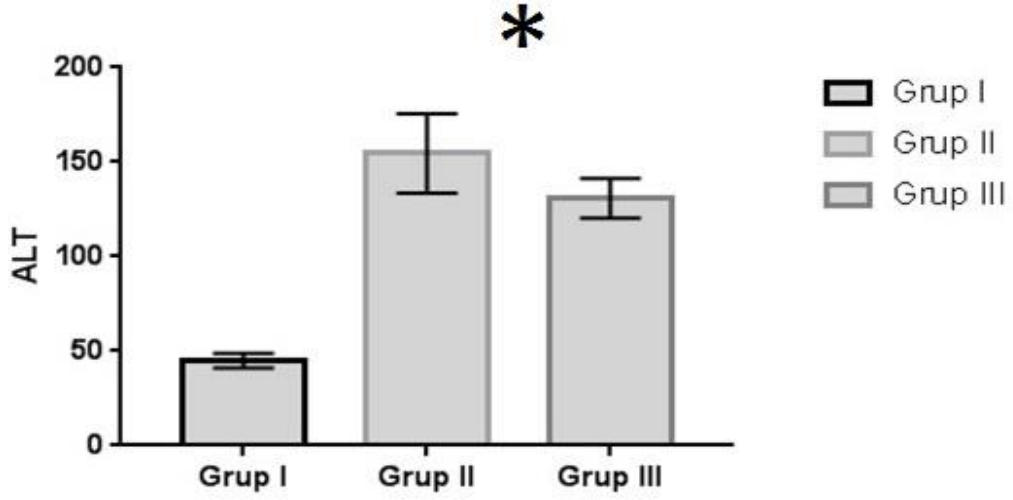
Çalışma için alınan örnekler Adnan Menderes Üniversitesi biyokimya ve patoloji laboratuvarlarında incelenmiştir.

Ratların serum AST düzeyleri kontrol grubunda(grup 1) , diğer iki gruba kıyasla daha düşük düzeyde olduğu görülüp( $p<0,0001$ ); istatistiksel olarak diğer gruplara göre anlamlı fark bulundu; ancak etanercept almayan(grup 2) ve etanercept alan(grup 3) arasında anlamlı fark bulunmadı( $p<0,99$ ).



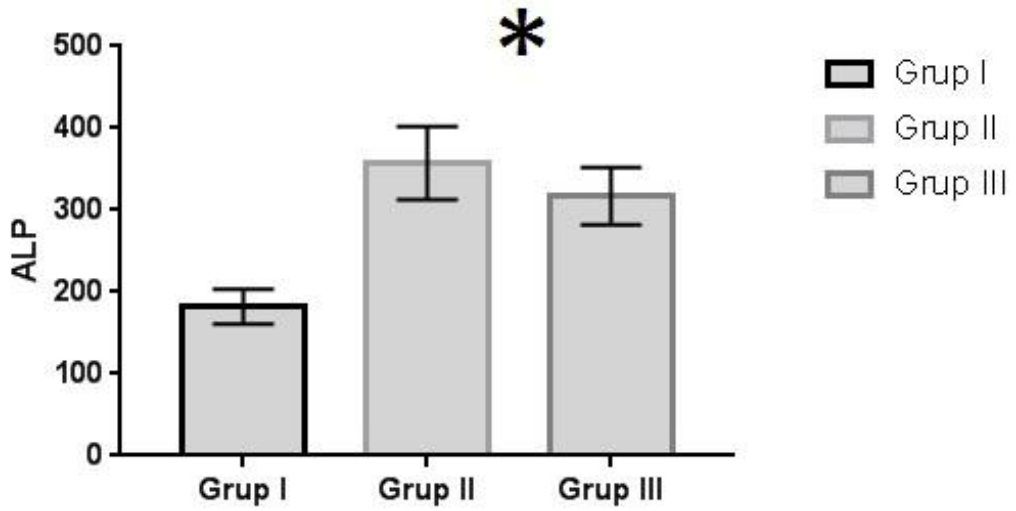
**Grafik 1:** Serum AST düzeyleri

Serum ALT düzeyleri grup 1 de grup 2 ve grup 3' e kıyasla daha düşük bulunarak( $p<0,0001$ ), aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Ancak grup 2 ve grup 3 arasında ki ALT düzeyleri kıyaslandığında iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı( $p<0,42$ ).



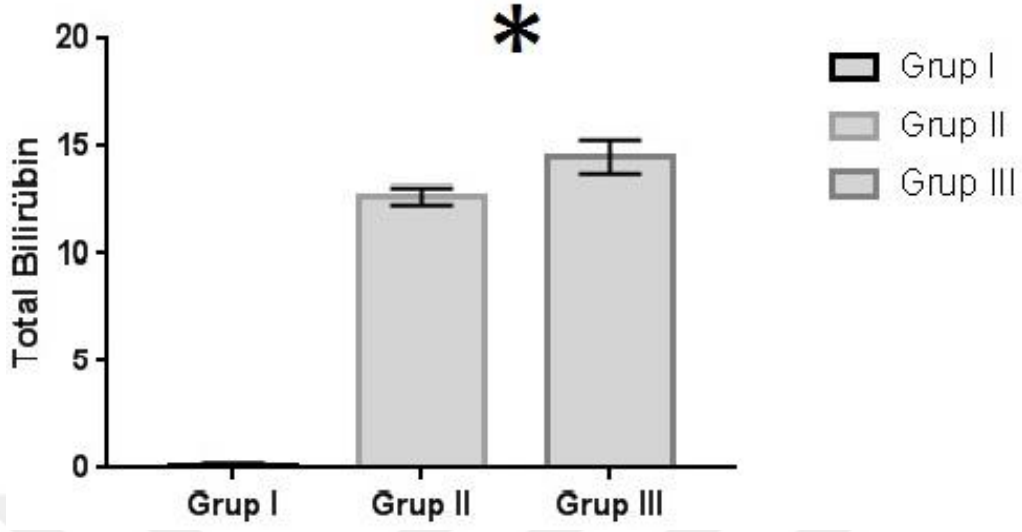
**Grafik 2:** Serum ALT düzeyleri

Kan örneklerindeki ALP düzeyleri grup 1 de diğer iki gruba kıyasla daha düşük bulundu( $p=0,005$ ). Grup 2 ve grup 3 kıyaslandığında ALP düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmadı( $p=0,69$ ).



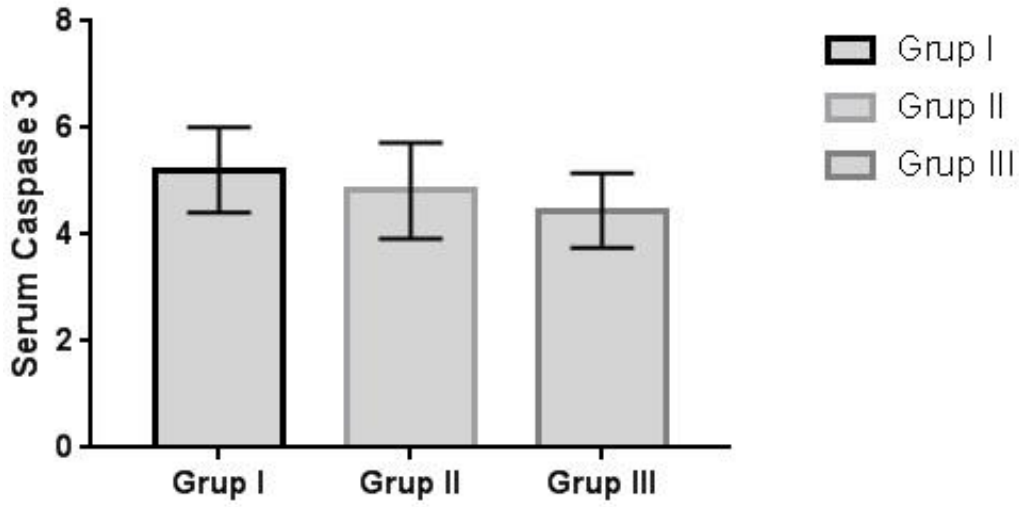
**Grafik 3:** Serum ALP düzeyleri

Total bilirubin düzeyleri grup 1 de diğer iki gruba kıyasla daha düşük bulundu( $p<0,0001$ ). Ancak grup 2 ile grup 3 arasında total bilirubin düzeyleri arasında fark bulunmadı( $p=0,117$ ).



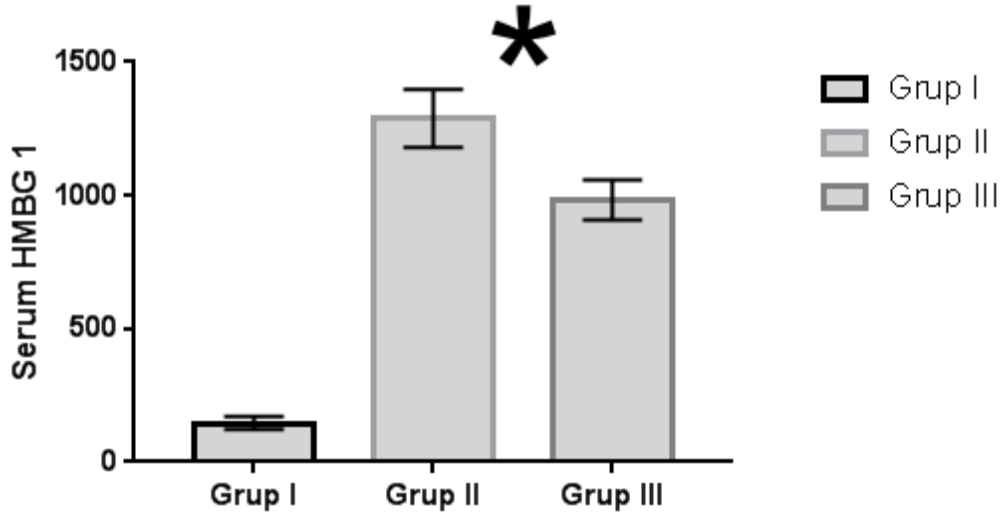
**Grafik 4:** Serum total bilirubin düzeyleri

Serum caspase-3 düzeyleri arasında 3 grup birbiri ile kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ( $p=0,82$ ).



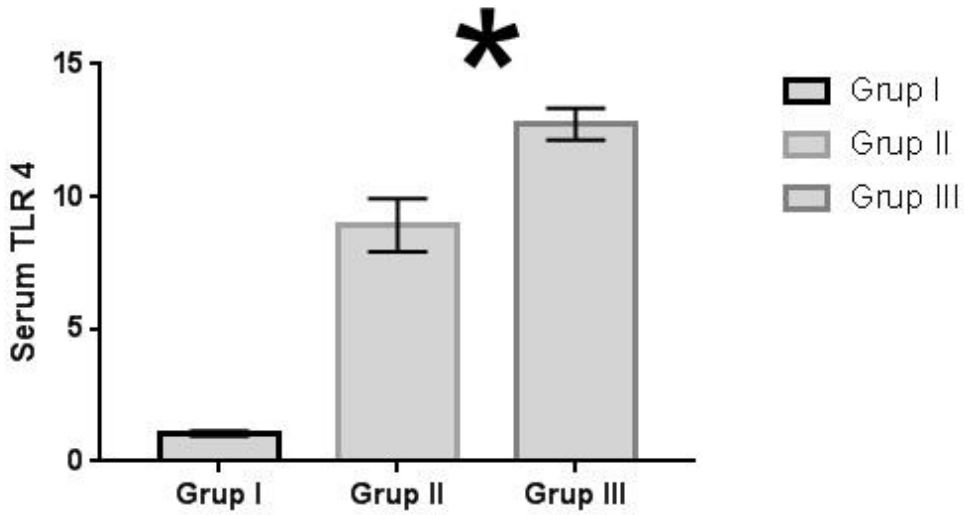
**Grafik 5:** Serum caspase- 3 düzeyleri

Serum HMGB1 düzeylerine bakıldığında birinci gruptaki değerlerin diğer gruplara kıyasla daha düşük olduğu görüldü ( $p<0,0001$ ). Grup 2 ve grup 3 kıyaslandığında grup 3 teki HMGB1 düzeyinin grup 2' ye kıyasla daha düşük olduğu gözlemlendi ( $p=0,024$ ).



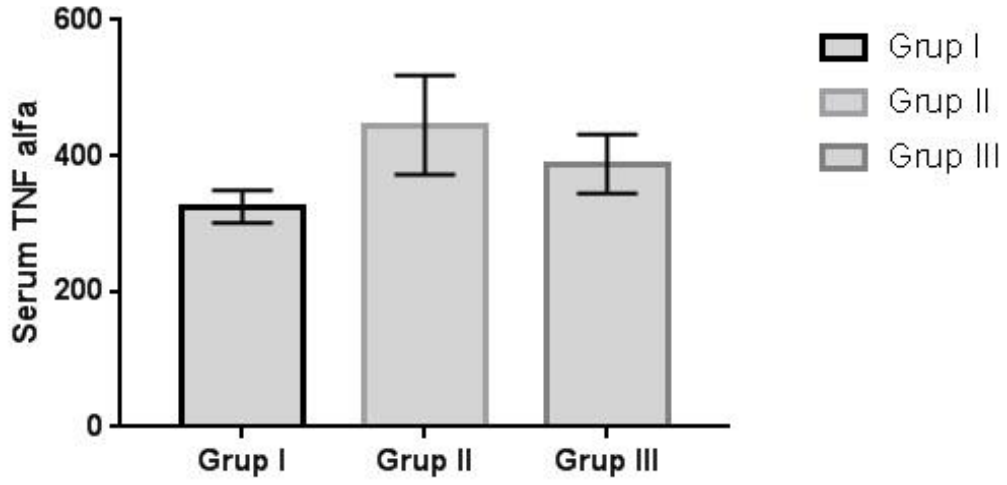
**Grafik 6:** Serum HMGB1 düzeyleri

Alınan kanlardan Serum TLR4 düzeylerine bakıldığında grup 1 deki değerlerin diğer gruplara kıyasla daha düşük olduğu gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında grup 3 deki değerlerin grup 2 ye kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlendi ( $p = 0,002$ ).



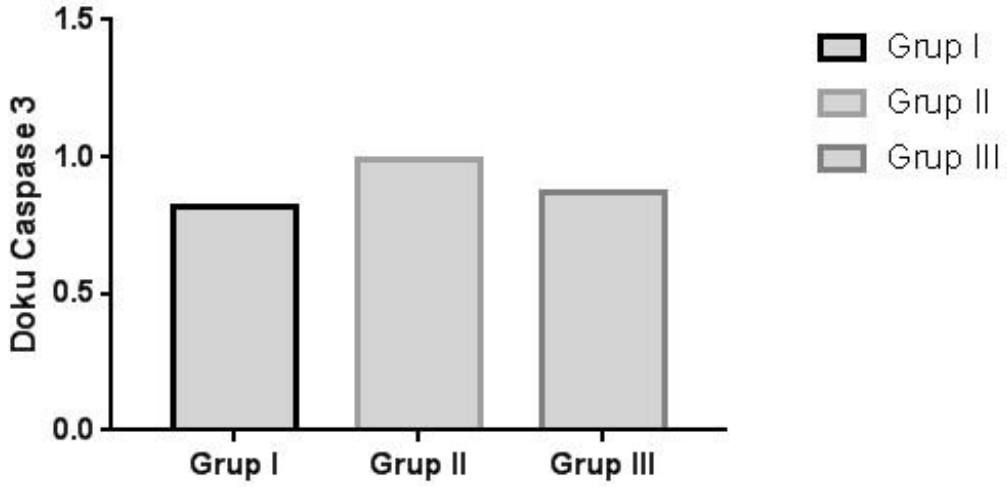
**Grafik 7:** Serum TLR4 düzeyleri

Serum TNF  $\alpha$  düzeylerine bakıldığında her 3 grup arasında anlamlı fark bulunmadı ( $p = 0,27$ ).



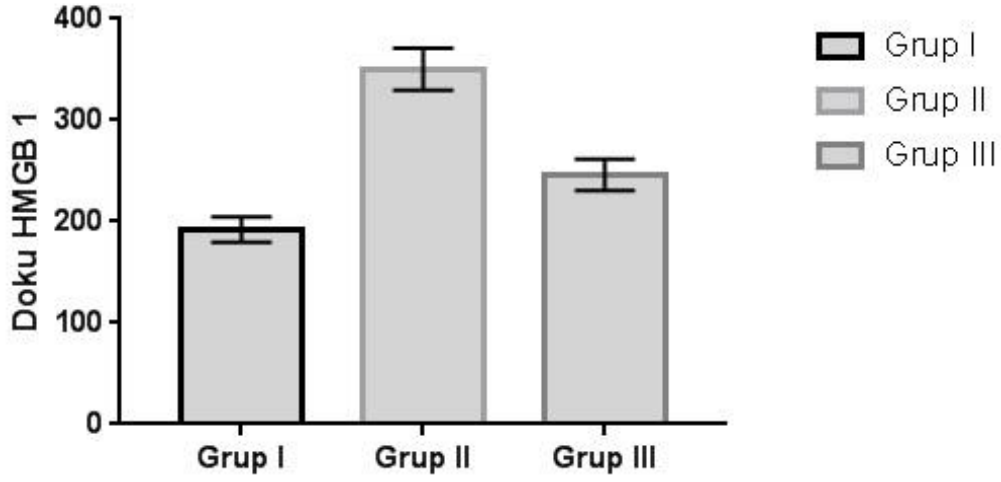
**Grafik 8:** Serum TNF alfa düzeyleri

Doku caspase-3 düzeylerine bakıldığında grup1, grup 2, grup 3 arasında anlamlı farklılık bulunmadı( $p=0,15$ ).



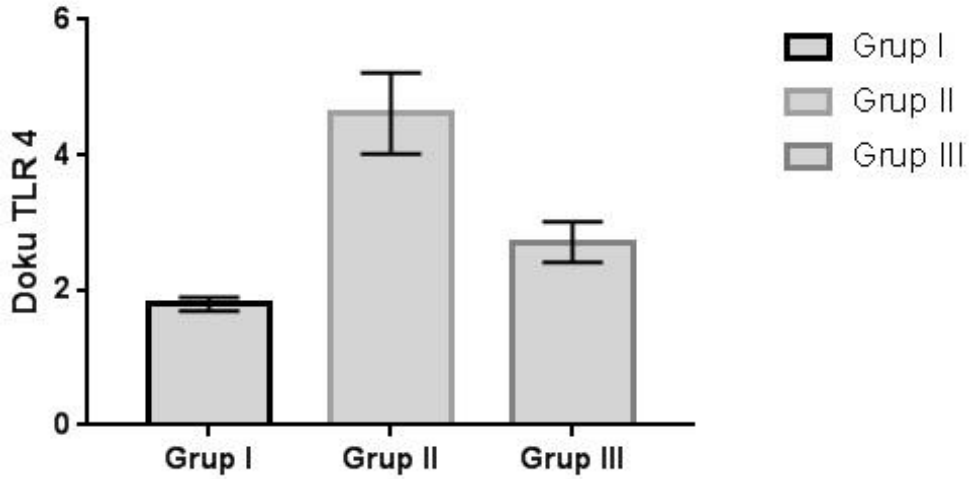
**Grafik 9:** Doku Caspase- 3 düzeyleri

Rat karaciğer doku örneklerinde HMGB-1 düzeylerine bakıldığında grup 1 ile grup 3 deki değerler arasında anlamlı farklılık bulunmazken( $p=0,68$ ), grup 1 ve grup 3 teki değerlerin ikinci gruptaki değerlere göre daha düşük olduğu gözlemlendi( $p<0,0001$ ).



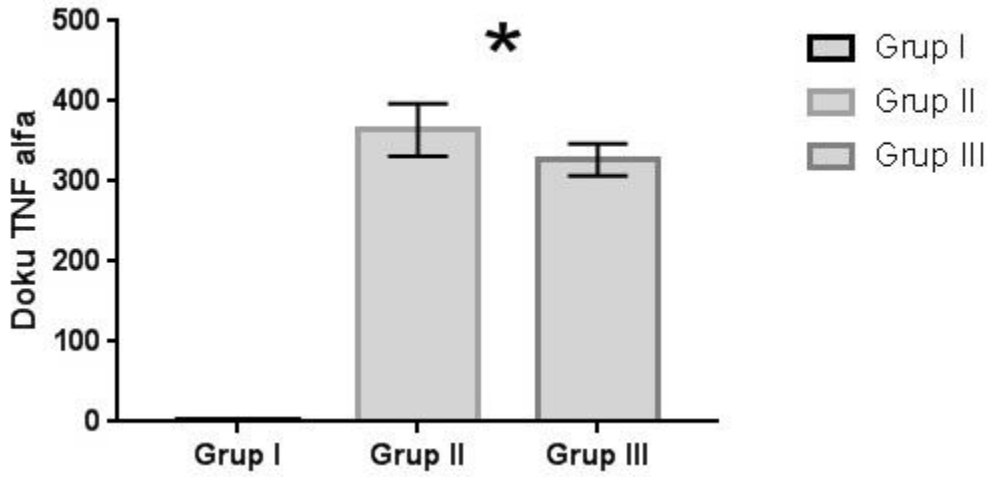
**Grafik 10:** Doku HMGB1 düzeyleri

Karaciğer dokusunda TLR4 düzeylerine bakıldığında grup 1 deki değerlerin grup 2 ye kıyasla daha düşük olduğu( $p=0,001$ ), grup 3 ile arasında bir fark olmadığı görüldü( $p=0,32$ ). İkinci gruptaki değerlerin üçüncü gruptaki değerlere göre daha yüksek olduğu görüldü ( $p=0,001$ ).



**Grafik 11:** Doku TLR- 4 düzeyleri

Karaciğer TNF  $\alpha$  düzeyleri grup 2 ve grup 3 te, grup 1 e kıyasla daha yüksek bulundu( $p<0,0001$ ). İkinci grup ile üçüncü grup arasında TNF  $\alpha$  düzeyleri arasında fark bulunmadı( $p=0,45$ ).

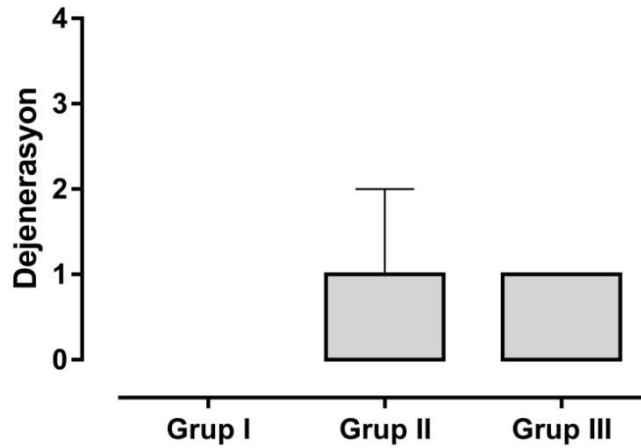


**Grafik 12:** Doku TNF alfa düzeyleri

Doku örnekleri mikroskopik olarak steatoz açısından incelendiğinde her üç grupta da steatoz olmadığı gözlemlendi.

Karaciğer doku örnekleri dejenerasyon açısından incelendiğinde grup 1 de diğer gruplara kıyasla daha az dejenerasyon olduğu gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). Grup 2 ile grup 3 arasında fark gözlenmedi ( $p > 0,05$ ).

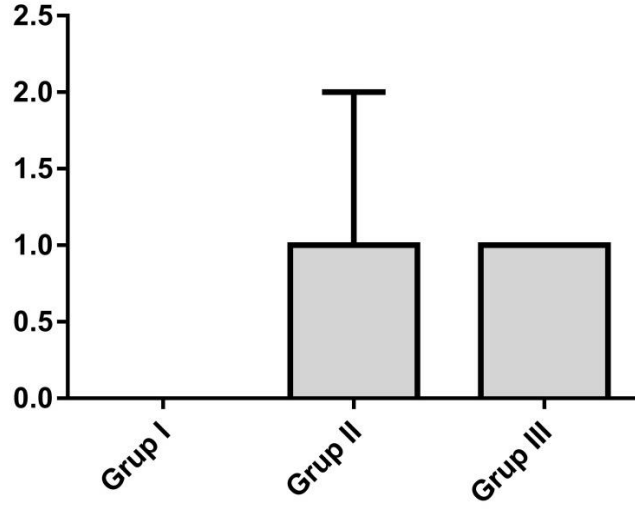
### Dejenerasyon



**Grafik 13:** Karaciğerde dejenerasyon düzeyleri

Karaciğer doku örnekleri portal enflamasyon açısından incelendiğinde grup 1 de diğer gruplara kıyasla daha az portal enflamasyon olduğu gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). Grup 2 ile grup 3 arasında fark gözlenmedi ( $p > 0,05$ ).

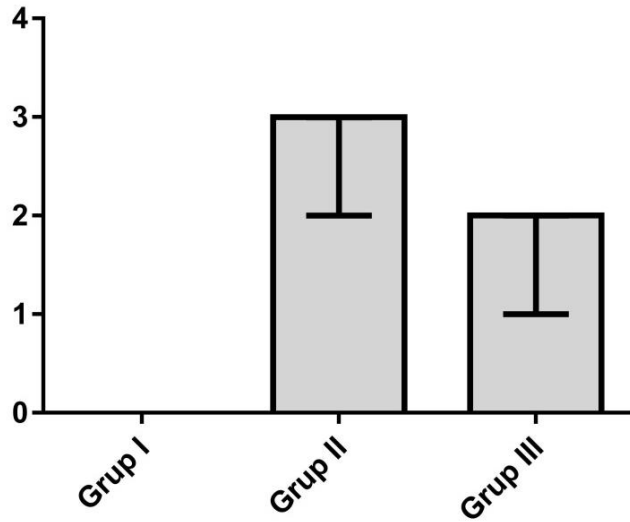
### Portal inflamasyon



**Grafik 14:** Karaciğer doku örneklerinde portal inflamasyon

Karaciğer doku örnekleri odaksal nekroz açısından incelendiğinde grup 1 de diğer gruplara kıyasla daha az odaksal nekroz olduğu gözlemlendi( $p < 0,0001$ ). Grup 2 ile grup 3 arasında fark gözlenmedi( $p > 0,05$ ).

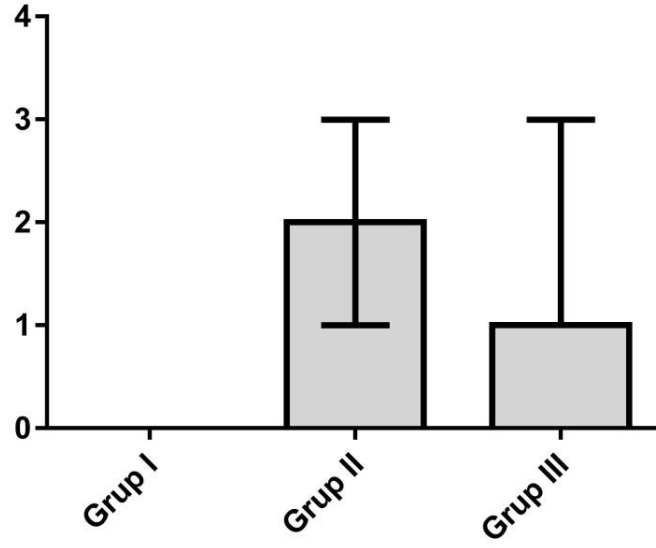
### Odaksal nekroz



**Grafik 15:** Karaciğerde odaksal nekroz

Karaciğer doku örnekleri periportal nekroz açısından incelendiğinde grup 1 de diğer gruplara kıyasla daha az dejenerasyon olduğu gözlemlendi( $p < 0,0001$ ). Grup 2 ile grup 3 arasında fark gözlenmedi( $p > 0,05$ ).

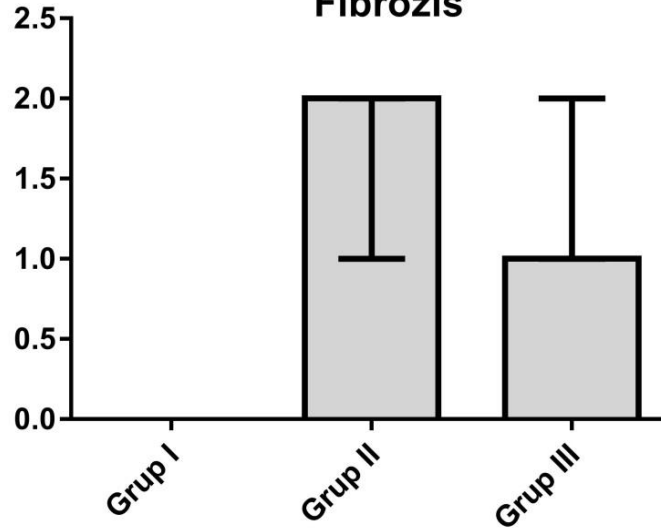
### Periportal nekroz



**Grafik 16:** Karaciğerde periportal nekroz

Karaciğer doku örnekleri fibrozis açısından incelendiğinde grup 1 de diğer gruplara kıyasla daha az fibrozis olduğu gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). Grup 2 ile grup 3 arasında fark gözlemlenmedi ( $p > 0,05$ ).

### Fibrozis



**Grafik 17:** Karaciğerde fibrozis düzeyleri

## 5. TARTIŞMA

Tıkanma sarılığı (TS) ana safra yollarında ya da intrahepatik safrayollarındaki tıkanıklığa bağlı olarak görülebilen klinik bir tablodur(48). TS tablosu gelişmesi durumlarında cerrahi, endoskopi ve radyolojik dekompresyon yöntemleriyle drenaj yapıp sarılık tablosu geriletebilirken endotoksemi, SIRS, karaciğer hasarı, sepsis gibi durumların engellenmesi için yeterli olmayıp, mortalitesi oldukça yüksek olan bir durumdur(1, 49). Bu klinik tabloyu ve doku hasarını gösteren birçok laboratuvar parametresi ve bununla ilgili yapılan çalışmalar mevcuttur. Tümör nekrozis faktör  $\alpha$ (TNF  $\alpha$ ), akut faz reaktanı olup inflamasyon sürecinde önemli bir rol oynar(34). Bizim çalışmamızdaki amacımız tıkanma sarılığında oluşan hasarı engelleyebilmek için antiinflamatuvar bir ajan olan TNF  $\alpha$  inhibitörü enanercept ile literatüre katkı sağlayabilmektir.

Etanercept (Enbrel\*) bir TNF  $\alpha$  inhibitörü olup, tuzak bir reseptör olarak TNF  $\alpha$  molekülünü bağlamakta ve ticari olarak kullanıma hazır formu bulunmaktadır. Etanercept, bir füzyon proteini olup, rekombinant DNA tarafından üretilen biyolojik bir ilaçtır. Literatürü taradığımızda deneysel ve klinik olarak tıkanma sarılığı ile etanercept üzerine bir çalışmaya rastlamadık. Ancak karaciğer hasarı üzerine çalışmalar olduğundan yola çıkarak bu çalışmamıza karar verdik. Abdul Hamid ve ark.(50) yaptıkları bir çalışmada karaciğer sirozu olan hastalara TNF  $\alpha$  inhibitörü etanercept verilmesinin karaciğer hasarını azalttığını bildirmişlerdir. Yine Kılıçoğlu ve ark.(51)'nin yaptıkları bir çalışmada karaciğer transplantasyonu, travma gibi durumlarda iskemi reperfüzyon hasarında etanerceptin karaciğer hasarını azalttığını ve olumlu etkileri olduğunu belirtmişlerdir. Biz de literatürde bu gibi birçok çalışmaya bakarak etanerceptin karaciğerdeki olumlu etkisinden faydalanmak amacıyla tıkanma ikteri üzerine deneysel olarak etkisini araştırmayı planladık.

TNF- $\alpha$  önemli bir akut faz reaktanı olup akut karaciğer hasarında ve yetmezliğinde ciddi bir gösterge olarak kullanılabilir(52). Biz de çalışmamızda tedavi göstergesi olarak parametrelerden birisini TNF- $\alpha$  olarak belirledik. Feng ve ark(52)'nin karaciğer yetmezliği üzerine yaptıkları çalışmada TNF- $\alpha$  nın önemli ve anlamlı bir parametre olarak gösterilebileceği belirtilmiştir. Zhou ve ark.(53) yaptıkları deneysel bir tıkanma ikteri çalışmasında ikter yaptıkları grupta TNF- $\alpha$ 'nın diğer gruplara göre

istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğunu ve ginsenoside ile koruma yaptığı grupta TNF- $\alpha$  düzeyinin daha düşük olduğunu bildirmiştir. Bizim de çalışmamızda serum TNF- $\alpha$  düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmaz iken, doku TNF- $\alpha$  düzeylerinde TS grubunun diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü. Ancak tedavi grubunda TNF  $\alpha$  düzeyi düşük çıksa da istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı. İnflamatuar uyarı sonrasında etkisi 30 dakika içinde başlar ve 90-120 dakika içinde maksimuma ulaşır. Yaklaşık 4 saat sonra etkisi kaybolur(54). Serum örneklerini sakrifikasyondan hemen sonra almamızdan ötürü TNF  $\alpha$  düzeyinin serumda anlamsız çıktığını düşünüyoruz. Tedavide ise etanerceptin antiinflamatuvar süreçte TNF  $\alpha$  üzerine etkisinin olmadığını düşünüyoruz.

Karaciğer fonksiyon testlerinin göstergesi olarak AST, ALT, Total Bilirubin(T.Bil) ve ALP değerlerini serumda çalışmayı planladık. Literatürdeki karaciğer hasarıyla ilgili yapılan çalışmaların hemen tamamında en basit parametreler olarak bu parametrelerin çalışıldığını görmekteyiz. Bai ve ark.(55) yaptıkları çalışmada pankreas başı kanserli tıkanma ikteri oluşturulmuş ratlarda AST,ALT, Bil ve ALP değerlerinin yükseldiği bildirilmiştir. Xu ve ark(56)'nın akut hepatit üzerinde yaptıkları bir çalışmada ise yine aynı enzimlerin ratlarda yükseldiği bildirilmektedir. Biz de çalışmamıza baktığımızda kontrol grubunda tüm değerlerin tıkanma ikteri ve tedavi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğunu gözledik. Tıkanma ikteri yaptığımızda bu değerlerin yükselmesi önemli parametreler olduğunu göstermektedir. Tedavi grubunda TS grubuna göre değerler nispeten düşük gözükse de istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemedik. Bu değerler üzerinden de etanerceptin TS üzerine antiinflamatuvar ve antioksidan bir etkisi olmadığını gözlemekteyiz.

Kaspazlar fagozomal olgunlaşma, lizozom füzyonunun dinamiklenmesi yoluyla antioksidan savunmayı ve konakçı direnci arttırmakta, apoptozun yanı sıra doku tahribini de engelleyerek antiinflamasyonu da sağlamaktadır(57). Kaspaz-3, Kaspaz-6 ve Kaspaz-7 ile birlikte etkili olup apoptotik etkiye sahiptir ve kısa bir N-terminal prodomainine sahiptirler(57). Liu ve ark.(58) yaptıkları bir çalışmada ratlarda oluşturdukları tıkanma ikteri üzerine hidrojenli salinin etkisini araştırmışlar ve bunun belirteci olarakta kaspaz-3 ü kullanmışlardır. TS yaptıkları grupta kaspaz-3 anlamlı olarak yükselirken tedavi verdikleri grupta da TS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde kaspaz-3 düzeyinde

gerileme olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda serum ve doku örneklerine bakıldığında 3 grup arasında da kaspaz-3 değerlerinde anlamlı farklılık olmadığını saptadık. Etanerceptin tıkanma ikterinde antiapoptotik aktivitesinin olmadığını düşünmekteyiz.

HMGB1(High Mobility Group Box 1) nükleer proteini önemli derecede koruyan bir protein olup DNA hasarı, gelişmesi, ekstraselüler hasar ve farklılaşmanın önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir(59, 60). Meme kanseri, kolorektal kanser, mide kanseri, mezotelyoma gibi malignitelerde belirteç olarak ve prognozda kullanılabilir(61-63). Liu ve ark(48) yaptıkları bir çalışmada tıkanma ikteri oluşturdukları ratlarda HMGB1 düzeyinin serumda ve karaciğer dokusunda yükseldiğini ve hidrojen salin ile tedavi ettikleri grupta ise HMGB1 düzeyinin doku ve serumda anlamlı olarak düştüğünü bildirmişlerdir. HMGB1 proteinin karaciğer dokusu için hasar bildirmede önemli bir gösterge olabileceğini de bildirmektedirler. Bizim çalışmamızda Tıkanma ikteri ile hasar oluşturulan grupta HMGB1 düzeyi anlamlı olarak yükselirken etancept ile tedavi edilen grupta ise HMGB1 düzeyi ilaç almayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde düşük saptanmıştır. Buradan da anlaşılacağı üzere HMGB1'in tıkanma ikterinde oluşan karaciğer hasarında önemli bir gösterge olacağına ve etanerceptin karaciğerin DNA hasarı ve farklılaşması aşamasında etkisi olabileceğini düşünmekteyiz.

Toll like receptore 4 (TLR4) uyarılmış ince barsak mukozasında bulunan ve bakteriyel komponentlerin mukoza reseptörlerini uyaran bir reseptör olarak bilinmektedir(64). Bu inflamatuvar komponentinden faydalanarak inflamatuvar barsak hastalığından, diareye, karaciğerde iskemi reperfüzyon hasarından akut pankreatite, obeziteye dek birçok çalışmaya dek literatürde belirteç olarak kullanılabileceğini gösteren çalışmalar bildirilmiştir(65-68). Fei ve ark(69)'nın yaptığı deneysel TS modelinde TS yapılan ratlarda TLR4' ün yüksek olduğu ve Radix Astragali denilen ajan ile tedavi edilen grupta da bu markerın düştüğü bildirilmiştir. Lin ve ark.(70)'nın yaptığı tıkanma sarılığına bağlı gelişen son dönem karaciğer yetmezliğinde TLR4' ün iyi bir belirteç olabileceğini göstermişler ve burada inflamatuvar marker olarak önermişlerdir. Çalışmamızda ise serum TLR4 değerlerine bakıldığında tedavi grubunda en yüksek değer saptanırken, kontrol grubunda ise en düşük değer olduğu gözlemlendi. Doku TLR4 değerlerinde ise etanercept verilen tedavi grubunda TLR4 değerinin diğer gruplardan daha düşük olduğu, en yüksek

grubun ise tedavi verilmeyen TS oluşturulan grup olduğu gözlemlendi. Doku değerlerine bakıldığında hem TLR4' ün TS' nin inflamatuvar belirteçliği açısından literatür ile paralellik gösterdiğini hem de etanerceptin tedaviye anlamlı yanıt verdiğini görmekteyiz. Ancak serum TLR4 değerlerine bakıldığında bunu söylememiz mümkün olmamaktadır. TLR4'ün sadece karaciğer dokusu değil, ince barsak ve kolon mukozasında da reseptör özelliği olduğu için(66) serumdaki bu değişken miktarının olabileceğini ve dokudan alınan örneklerin daha doğru olduğunu düşünmekteyiz.

Tıkanma sarılığının en önemli etkilerinden birisinin de histopatolojik değişiklikler olduğunu düşünmekteyiz. Karaciğer hasarı ve tıkanma sarılığı ile ilgili literatürde yapılan birçok çalışmada kan ve dokudan alınan biyokimyasal parametrelerin yanı sıra Knodell ve ark.(71)' nin yaptığı histopatolojik skorlamada kullanılmıştır. Biz de doku hasarı ve nekroz derecesini değerlendirebilmek açısından bu skorlama sistemini kullanmayı uygun gördük. Kontrol grubunda skorlama sistemi derecelerimiz düşük görülürken, grup 2 ve grup 3 de daha yüksek nekroz derecelerine rastladık ancak tedavi grubu ve TS grubu arasında istatistiksel bir fark gözlemledik. Etanerceptin biyokimyasal markırlarda etkili olabilirken histopatolojik ölçüde etkili olmadığını düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tıkanma sarılığı morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenleri olup sepsis gibi komplikasyonların gelişimine neden olabilmektedir. Tedavisinde cerrahi, endoskopik ya da radyolojik olarak drenaj gerekmekte olup septik tabloyu düzeltmekte yeterli olmayıp inflamasyon durumunun önüne geçebilmek için destek tedavisine ihtiyaç gerekmektedir. Etanercept, bir TNF- $\alpha$  inhibitörü olup birçok inflamatuvar ve otoimmün hastalıkta antiinflamatuvar amaçla kullanılmaktadır. Biz de çalışmamızda TS' nin tedavisinde antiinflamatuvar ve antiapoptotik amaçla etanerceptin etkilerini araştırdık. Biyokimyasal, histopatolojik olarak çalışma verilerimizi incelediğimiz zaman; etanerceptin tıkanma sarılığı tedavisinde antiinflamatuvar, antiapoptotik etkinliğinin olmadığını ancak hücresel düzeyde DNA hasarı üzerine etkilerinin olabileceğini düşünmekteyiz. Histopatolojik düzeydede etkisinin kısa dönemde olmadığını düşünmekteyiz.

## ÖZET

Safra yollarının herhangi bir seviyesinde, herhangi hastalığa bağlı olarak gelişen kısmi veya tam tıkanıklık sonucu safra akışının engellenmesi ile tıkanma sarılığı oluşur. Kolestazda gelişen hastalarda morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenleri arasında sepsis gibi enfeksiyöz komplikasyonların gelişimidir (1).Barsağa safra akışının olmamasına bağlı olarak safra ile atılan maddelerin kanda birikimine neden olur. Kolestaz sonucu ile retiküloendotelial sistem fonksiyon bozukluğu, intestinal mukozanın yapı ve fonksiyonlarında bozulma, immun sistem supresyonu, barsak duvarında oksidatif hasar, bakteriyemi ve endotoksemi gibi patolojik durumlar ortaya çıkar (2, 3). Kolestazda staza sekonder karaciğer hasarı ortaya çıkar.

Kolestatik sarılıkta, enfeksiyöz patojenlere ek olarak hücrel stres ve hasar, alarm molekülleri olarak bilinen endojen moleküllerin salınımını tetikleyebilmektedir. Bunun sonucunda konakçıda immun sistem yanıtı başlamakta olup Toll like receptor molekülleri (TLR1,2,4,6,7,9) salınmaktadır. HMGB1 (High mobility group box-1) proteininin ise ilk defa 1999 yılında farelerde endotoksin ile ilgili ölümlerde önemli bir molekül olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle, HMGB 1 molekülünün kolestatik karaciğer hastalığının gelişmesinde önemli olabileceği öne sürülmüştür. Huang ve ark., çalışmalarında ratlarda tıkanma sarılığında glukokortikoidlerin HMGB 1 ekspresyonunu ve TLR aktivasyonları araştırmışlar. Plazmada HMGB 1 düzeylerini ölçmüşler ve yüksek saptamışlar. Ratlara glukokortikoid tedavisi uyguladıklarında ise karaciğerde HMGB 1 protein ekspresyonunun ve serum düzeylerinin azaldığını saptamışlar. Yine, TLR 2 ve TLR 4 ekspresyonlarının HMGB 1 sinyali ile ilişkili olduğunu rapor etmişler, bununla birlikte glukokortikoid tedavisinin TLR 4 düzeylerine TLR 2 düzeylerine kıyasla daha fazla etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgulardan, tıkanma sarılıklarında karaciğer hasarında HMGB 1 – TLR4 ekseninin önemli bir rolü olduğunu belirtmişlerdir(9)

Karaciğerde hücre ile tedavide transplante edilen hücrelerin aşılınması çok kritiktir, nötrofillerin veya Kupffer hücrelerinin aktivasyonundan sonra, transplante edilen hücrelerin çoğu karaciğer sinüzoidleri tarafından proinflamatuvar sitokinler/kemokinler/reseptörler tarafından hızlı bir şekilde karaciğerden temizlenmektedir. Wiswanathan ve ark., çalışmalarında hücre-transplantasyonu ile

indüklenen hepatik inflamasyonda, TNF  $\alpha$  antagonisti olan etanerceptin ratlarda hepatosit transplantasyonunda etkisini araştırmışlar. Hücre transplantasyonundan sonra, bir çok sitokin/kemokin/reseptörlerin miktarlarında artış olduğunu, halbuki hücre transplantasyonundan önce etanercept kullanımının bu yanıtı normalize ettiğini bildirmişlerdir. Bundan başka, etanerceptin hücre transplantasyonu ile indüklenen intrahepatik sekretuar sitokinlerin [High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1) gibi] salınımını önemli ölçüde azalttığını rapor etmişlerdir. Etanerceptin bu etkisinin hücre transplantasyonu ile ilgili nötrofillerin aktivasyonunu azalttığı, fakat Kupffer hücrelerine etkisi olmadığını bildirmişlerdir. Etanerceptinin yüksek dozları ile muamele edilen hayvanlarda transplante edilen hücrelerin reddedilmesinin azaldığı bildirilmiştir(7).

Her grupta 10 adet hayvan içeren deney, kontrol ve sham grubu olmak üzere toplam 3 grup oluşturuldu. Sham grubu anestezi maddelerin ve olası risklerin diğer gruplarla karşılaştırılması, çalışmanın standardize edilmesi amacıyla oluşturuldu. Grup I (n=10): Sham Grubu Laparotomi sonrası ana safra kanalı ortaya konup batın kapatıldı ve takiben hayvanlara 7 gün süre ile standart yem ve su verildi. Grup II (n=10): Kontrol Grubu Laparotomi sonrası ana safra kanalı ortaya konup 4/0 ipek ile bağlanan hayvanlara 7 gün süre ile standart yem ve su verildi. Grup III (n=10): Deney Grubu Laparotomi sonrasında ana safra kanalı ortayakonup 4/0 ipek ile bağlanan hayvanlara 7 gün süre ile standart yem ve su verildi. Bu gruptaki hayvanlara, safra kanalı bağlandıkları günden itibaren 7 gün boyunca 2 mg/kg dozunda intraperitoneal etanercept verildi. Sonrasında ratlardan karaciğer ve kan örnekleri alınarak ratlar sakrifiye edildi.

TS' nin tedavisinde antiinflamatuvar ve antiapoptotik amaçla etanerceptin etkilerini araştırdık. Biyokimyasal, histopatolojik olarak çalışma verilerimizi incelediğimiz zaman; etanerceptin tıkanma sarılığı tedavisinde antiinflamatuvar, antiapoptotik etkinliğinin olmadığını ancak hücresel düzeyde DNA hasarı üzerine etkilerinin olabileceğini düşünmekteyiz. Histopatolojik düzeydede etkisinin kısa dönemde olmadığını gözlemledik.

## SUMMARY

At any level of the bile ducts, as a result of the partial or complete occlusion concluding of any disease, obstructive jaundice occurs by the inhibition of bile flow. One of the leading causes of morbidity and mortality in patients with cholestasis is the development of infectious complications such as sepsis(1). If there is no bile secretion to the intestine, substances that excreted from the bile may accumulate at blood. As a result of the cholestasis, pathologic conditions such as reticuloendothelial dysfunction, deterioration of structure and function of intestinal mucosa, immunosuppression, oxidative damage in the intestinal wall, bacteraemia and endotoxemia occur (2, 3). In cholestasis, stasis secondary liver damage occurs.

At cholestatic jaundice, in addition to infectious pathogens, cellular stress and damage can trigger release of endogenous molecules known as alarming molecules. As a result, in the host, the immune system response is initiated and the Toll like receptor molecules (TLR1,2,4,6,7,9) are released. HMGB1 (High mobility group box-1) protein was reported to be an important molecule in endotoxin-related deaths in mice for the first time in 1999. For this reason, it has been suggested that HMGB1 molecule may be important in the development of cholestatic liver disease. In their study, Huang et al. investigated HMGB1 expression and TLR activation of glucocorticoids in obstructive jaundice rats. They measured HMGB1 levels in plasma and found them to be high. When they administered glucocorticoid therapy to rats, they found that HMGB1 protein expression and serum levels were decreased in the liver. Again, they reported that TLR2 and TLR4 expressions are associated with the HMGB1 signal, and that glucocorticoid therapy is more effective at TLR4 levels compared to TLR2 levels. From these findings, they found that HMGB1, TLR4 axis plays an important role in hepatic damage in obstructive jaundice (9).

In liver, inoculation of transplanted cells in cell therapy is very critical, after activation of neutrophils or Kupffer cells, most of the transplanted cells are rapidly cleared from the liver by the proinflammatory cytokines / chemokines / receptors by the liver sinusoids. In their study, Wiswanathan et al. investigated the etanerceptin, a TNF  $\alpha$  antagonist effect on hepatocyte transplantation of rat, in cell-transplantation-induced

hepatic inflammation. There was an increase in the quantities of many cytokines/chemokines/receptors after cell transplantation, whereas prior to cell transplantation, they reported that the use of etanercept normalized this response. Furthermore, they reported that etanercept significantly reduced the release of intrahepatic secretory cytokines [such as High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1)] induced by cell transplantation. Etanercept has reported that this effect reduces neutrophil activation associated with cell transplantation, but does not affect Kupffer cells. It has been reported that the rejection of cells transplanted in animals treated with high doses of etanerceptin (7).

In each group, which had 10 animals, 3 groups were formed for experiment, control and sham group. The Sham group was created to standardize the study of anaesthetics and the possible risks compared to other groups. Group I (n = 10): Sham Group, after the laparotomy, the main bile duct of animals was exposed and the bell was closed, followed by feeding the animal with standard feed and water for 7 days. Group II (n = 10): Control Group after laparotomy, the main bile ducts of animals were exposed and bonded with 4/0 silk, and the animals fed were given standard feed and water for 7 days. Group III (n = 10): Experimental Group after laparotomy, the main bile ducts of animals were exposed and bonded with 4/4 silk, and the animals fed were given standard feed and water for 7 days. The animals in this group were given intraperitoneal etanercept at a dose of 2 mg / kg for 7 days starting from the day when they were biliary duct. Afterwards, liver and blood samples were taken from the rats and the rats were sacrificed.

We investigated the effects of etanerceptin for anti-inflammatory and antiapoptotic purposes in the treatment of obstructive jaundice. Biochemically and histopathologically, when we examine our study data; we think that there is no anti-inflammatory, antiapoptotic effect of etanerceptin on obstructive jaundice therapy, but it may have effects on DNA damage at cellular level. At the histopathological level, we also observed that this effect was not in the short term.

## KAYNAKLAR

1. Greig, J., Z. Krukowski, and N. Matheson, *Surgical morbidity and mortality in one hundred and twenty-nine patients with obstructive jaundice*. British journal of surgery, 1988. 75(3): p. 216-219.
2. Batman, F. and S. Arslan, *Karaciğer fizyolojisi*. Temel cerrahi, 1996. 2: p. 1205.
3. Akin, M.L., et al., *Hyperbaric oxygen prevents bacterial translocation in rats with obstructive jaundice*. Digestive diseases and sciences, 2001. 46(8): p. 1657-1662.
4. Björnsson, E.S., et al., *Risk of drug-induced liver injury from tumor necrosis factor antagonists*. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2015. 13(3): p. 602-608.
5. Danese, S., *Mechanisms of action of infliximab in inflammatory bowel disease: an anti-inflammatory multitasker*. Digestive and Liver disease, 2008. 40: p. S225-S228.
6. Aparicio, A.M.G., et al., *Successful treatment with etanercept in a patient with hepatotoxicity closely related to infliximab*. Clinical rheumatology, 2007. 26(5): p. 811-813.
7. Tilg, H., A. Kaser, and A.R. Moschen, *How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases*. Liver International, 2006. 26(9): p. 1029-1039.
8. French, J.B., et al., *Hepatotoxicity associated with the use of anti-TNF- $\alpha$  agents*. Drug safety, 2016. 39(3): p. 199-208.
9. Huang, Y.-H., et al., *Glucocorticoid modulates high-mobility group box 1 expression and Toll-like receptor activation in obstructive jaundice*. Journal of Surgical Research, 2011. 170(1): p. e47-e55.
10. A, S. and A.M. D, *Sabiston Textbook of Surgery, Sixteenth Edition*. 2001: p. 1080–1082.
11. A., Ö., *İç Hastalıkları*. 1990, Bursa: Güneş Kitapevi.
12. Aran, Ö. and K. YA, *Safra yolları hastalıkları*. Temel Cerrahi. Sayek İ: Ankara Güneş kitapevi, 1996: p. 1293-1310.

13. Ceydilek, B. and A.R. Beyler, *Safra oluşumunda rol oynayan transport proteinleri* *Transport proteins in bile production*. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 2005. 58(02).
14. Nathanson, M.H. and J.L. Boyer, *Mechanisms and regulation of bile secretion*. *Hepatology*, 1991. 14(3): p. 551-566.
15. Esteller, A., *Physiology of bile secretion*. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2008. 14(37): p. 5641.
16. L. H. Blumgart, Y. Fong, and S. Erlinger., *Blumgart Fong Surgery of the Liver and Biliary Tract*. Third Edition ed. 2000, London: W. B. Saunders Company LTD. 109–120.
17. Wake, K., Y. Kawai, and B. Smedsrød, *Re-evaluation of the reticulo-endothelial system*. *Italian journal of anatomy and embryology= Archivio italiano di anatomia ed embriologia*, 2001. 106(2 Suppl 1): p. 261-269.
18. Sharp, P. and J.S. Villano, *The laboratory rat*. 2012: CRC press.
19. Hall, J.E., *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology E-Book*. 2015: Elsevier Health Sciences.
20. Noyan, A., *Fizyoloji Ders Kitabı*. Hacettepe Kitapçılık, Ankara, 1989.
21. Üçok, K., et al., *Safra Sistemi Fizyolojisi*. *Cerrahi Sanatlar Dergisi*, 2010. 3(1): p. 1-8.
22. Kacsoh, B., *Endocrine physiology*. 2000: McGraw Hill Professional.
23. Best, C.H., *Physiological Basis of Medical Practice: Best and Taylor's Physiological Basis of Medical Practice*. 1973, Williams & Wilkins.
24. Önür, N.D. and A.R. Beyler, *SAFRA ASİTLERİ METABOLİZMASI*. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 2001. 54(01).
25. V, K. and C. R., *Karaciğer, safra kesesi, safra yolları*. 9 ed. 2013, İstanbul: nobel tıp kitabevi.
26. Erlinger, S., *Cholestasis*. *Sciff's disease of the liver*. 18th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999: p. 611-29.

27. Kountouras, J., B.H. Billing, and P.J. Scheuer, *Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat*. British journal of experimental pathology, 1984. 65(3): p. 305.
28. Lee, S.S., et al., *Hemodynamic characterization of chronic bile duct-ligated rats: effect of pentobarbital sodium*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 1986. 251(2): p. G176-G180.
29. Zimmermann, H., et al., *Reversibility of secondary biliary fibrosis by biliodigestive anastomosis in the rat*. Gastroenterology, 1992. 103(2): p. 579-589.
30. Blumgart, L., *Biliary tract obstruction: new approaches to old problems*. The American Journal of Surgery, 1978. 135(1): p. 19-31.
31. Papakostas, C., et al., *Endotoxemia in the portal and the systemic circulation in obstructive jaundice*. Clinical and experimental medicine, 2003. 3(2): p. 124-128.
32. White, J., et al., *Patterns of bacterial translocation in experimental biliary obstruction*. Journal of Surgical Research, 2006. 132(1): p. 80-84.
33. Uygun, A. and Z. Polat, *Viral hepatitis dışı serum transaminaz düzeyinde artışa neden olan hastalıklar*. Güncel gastroenteroloji, 2009. 13(4): p. 211-24.
34. Kalfa, M. and K. Aksu, *Treatment with tumor necrosis factor-alpha antagonists and infection*. RAED Dergisi, 2011. 3(3-4): p. 49-56.
35. RA, B., R. CT, and K. CJ, *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells*. Nature, 1997. 385: p. 729-733.
36. B, B. and C. A, *The biology of cachectin/TNF- $\alpha$  primary mediator of the host response*. Annu Rev Immunol 1989. 7: p. 625-655.
37. G, C., et al., *The molecular action of tumor necrosis factor-  $\alpha$* . Eur J Biochem, 1991. 202: p. 3-14.
38. Bae, H.W., et al., *Protective effect of etanercept, an inhibitor of tumor necrosis factor- $\alpha$ , in a rat model of retinal ischemia*. BMC ophthalmology, 2016. 16(1): p. 75.
39. Schwartzman, R.A. and J.A. Cidlowski, *Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death*. Endocrine reviews, 1993. 14(2): p. 133-151.

40. Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik, *Caspases: enemies within*. Science, 1998. 281(5381): p. 1312-1316.
41. Altunkaynak, B. and E. Özbek, *Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir*. Tıp Araştırmaları Dergisi, 2008. 6(2): p. 93-104.
42. Bannert, K., et al., *Anti-apoptotic therapeutic approaches in liver diseases: do they really make sense?* Apoptosis, 2014. 19(8): p. 1243-1253.
43. Kang, R., et al., *HMGB1 in health and disease*. Molecular aspects of medicine, 2014. 40: p. 1-116.
44. Lotze, M.T. and K.J. Tracey, *High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal*. Nature Reviews Immunology, 2005. 5(4): p. 331.
45. Nikolay N. Kuzmich, et al., *TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis*. Vaccines (Basel), 2017. 5(4): p. 34-339.
46. Vaure, C. and Y. Liu, *A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species*. Frontiers in immunology, 2014. 5: p. 316.
47. Shi, H., et al., *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance*. The Journal of clinical investigation, 2006. 116(11): p. 3015-3025.
48. Liu, Q., et al., *Hydrogen-rich saline protects against liver injury in rats with obstructive jaundice*. Liver International, 2010. 30(7): p. 958-968.
49. Tsuyuguchi, T., et al., *Stenting and interventional radiology for obstructive jaundice in patients with unresectable biliary tract carcinomas*. Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences, 2008. 15(1): p. 69-73.
50. Abdul-Hamid, M., et al., *The antifibrogenic effect of etanercept on development of liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats*. Ultrastructural pathology, 2017. 41(1): p. 23-35.
51. Kilicoglu, B., et al., *Ultrastructural view of a promising anti TNF- $\alpha$  agent on hepatic ischaemia reperfusion injury*. Bratislavske lekarske listy, 2015. 116(10): p. 601-607.
52. Feng, L., et al., *Novel D-galactosamine-induced cynomolgus monkey model of acute liver failure*. World journal of gastroenterology, 2017. 23(42): p. 7572.

53. Zhou, T., et al., *Ginsenoside Rg1 prevents cerebral and cerebellar injury induced by obstructive jaundice in rats via inducing expression of TIPE-2*. *Neuroscience letters*, 2016. 610: p. 193-199.
54. Guzel, A., et al., *Anti-inflammatory and antioxidant effects of infliximab on acute lung injury in a rat model of intestinal ischemia/reperfusion*. *Journal of molecular histology*, 2012. 43(3): p. 361-369.
55. Bai, Z., et al., *Multi-modality imaging-monitored creation of rat orthotopic pancreatic head cancer with obstructive jaundice*. *Oncotarget*, 2017. 8(33): p. 54277.
56. Xu, L., et al., *Analyzing the hepatoprotective effect of the Swertia cincta Burkill extract against ANIT-induced cholestasis in rats by modulating the expression of transporters and metabolic enzymes*. *Journal of ethnopharmacology*, 2017. 209: p. 91-99.
57. Deveraux, Q.L., et al., *X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases*. *Nature*, 1997. 388(6639): p. 300.
58. Liu, Q., et al., *Hydrogen-rich saline protects against mitochondrial dysfunction and apoptosis in mice with obstructive jaundice*. *Molecular medicine reports*, 2016. 13(4): p. 3588-3596.
59. Bianchi, M.E. and M. Beltrame, *Upwardly mobile proteins: Workshop: The role of HMG proteins in chromatin structure, gene expression and neoplasia*. *EMBO reports*, 2000. 1(2): p. 109-114.
60. Müller, S., et al., *The double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal*. *The EMBO journal*, 2001. 20(16): p. 4337-4340.
61. Brezniceanu, M.-L., et al., *HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma*. *The FASEB journal*, 2003. 17(10): p. 1295-1297.
62. Völp, K., et al., *Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) is associated with an elevated level of the antiapoptotic c-IAP2 protein in human colon carcinomas*. *Gut*, 2006. 55(2): p. 234-242.

63. Wu, D., et al., *Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) is associated with progression and poor prognosis in human nasopharyngeal carcinoma.* The Journal of pathology, 2008. 216(2): p. 167-175.
64. He, X., et al., *Modulation of inflammation by toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome.* Oncotarget, 2017. 8(69): p. 113957.
65. Xiping, Z., et al., *Effects of salvia miltiorrhizae on ICAM-1, TLR4, NF- $\kappa$ B and bax proteins expression in multiple organs of rats with severe acute pancreatitis or obstructive jaundice.* Inflammation, 2009. 32(4): p. 218-232.
66. Xiping, Z., et al., *Effect of salvia miltiorrhizae on the expressions of TLR4 protein in the liver of rats with SAP or OJ.* Inflammation, 2009. 32(3): p. 151-162.
67. Hersoug, L.-G., P. Møller, and S. Loft, *Role of microbiota-derived lipopolysaccharide in adipose tissue inflammation, adipocyte size and pyroptosis during obesity.* Nutrition research reviews, 2018: p. 1-11.
68. Hamid, M., et al., *The Hepatoprotective Effect of Selenium-Enriched Yeast and Gum Arabic Combination on Carbon Tetrachloride-Induced Chronic Liver Injury in Rats.* Journal of food science, 2018.
69. Fei, Z.-w., et al., *Protective effects of Radix Astragali injection on multiple organs of rats with obstructive jaundice.* Chinese journal of integrative medicine, 2016. 22(9): p. 674-684.
70. Lin, L., et al., *Intervention of TLR4 signal pathway cytokines in severe liver injury with obstructive jaundice in rats.* International journal of sports medicine, 2012. 33(07): p. 572-579.
71. Knodell, R.G., et al., *Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis.* Hepatology, 1981. 1(5): p. 431-435.