

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

SAFRA YOLU OBSTRUKSİYONUNA BAĞLI HEPATİK FİBROZİSTE OZON TEDAVİSİNİN ROLÜ

Dr. Osman Hakan Kocaman
Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Feryal GÜN

İSTANBUL – 2013

ÖNSÖZ

Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Alaaddin Çelik başta olmak üzere, uzmanlık eğitimim süresince tecrübelerini ve tüm bilgi birikimlerini benimle paylaşan öğretim üyeleri Prof. Dr. F.Tansu Salman, Prof. Dr. Erbuğ Keskin ve Prof. Dr. Hüseyin Özbey'e;

Uzmanlık eğitimim boyunca üstün bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım ve bu çalışmanın planlanmasında ve yürütülmesinde bana yol gösteren değerli tez danışmanım Doç. Dr. Feryal Gün'e;

Bu çalışmanın ortaya çıkarılmasında ve yürütülmesindeki tüm katkılarından dolayı Prof. Dr. Müjdat Uysal'a, Prof. Dr. Ümit Türkoğlu'na ve Uzm. Dr. Semen Yeşil Önder'e;

Aileme, birlikte çalıştığım araştırma görevlisi dostlarım ve tüm hemşire arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER.....	III
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	V
ŞEKİLLER	VII
TABLolar	VIII
RESİMLER	IX
ÖZET	X
ABSTRACT	XII

I- GİRİŞ VE AMAÇ	1
------------------------	---

2-GENEL BİLGİLER	3
------------------------	---

2. 1. Karaciğer ve Ekstrahepatik Kolestaz	3
2. 1.1. Karaciğer Anatomisi ve Histolojisi.....	3
2. 1. 2. Safra Kesesi Anatomisi ve Histolojisi.....	7
2. 1. 3. Safra Yapımı	8
2. 1. 4. Ekstrahepatik kolestaz	11
2. 1. 4. Ekstrahepatik Kolestaz Belirteçleri	12
2. 1. 4. 1. Transaminazlar	12
2. 1. 4. 2. Alfa Düz Kas Aktini	12
2. 1. 4. 3. Fibrozis ve Periportal İnflamasyon	13
2. 2. Ozon	14
2. 2. 1. Doğada Ozon ve Etkileri	14
2. 2. 2. Medikal Ozon.....	14
2. 2. 2. 1. Medikal Ozonun elde edilmesi.....	14
2. 2. 2. 2. Medikal Ozonun Uygulama Biçimleri.....	16

2. 2. 2. 2. 1. Major Otohemoterapi.....	16
2. 2. 2. 2. 2. Rektal Ozon İnsüflasyon.....	16
2. 2. 2. 2. 3. Minör Otohemoterapi.....	17
2. 2. 2. 2. 4. Düşük Basıncılı Ozon Uygulaması.....	17
2. 2. 2. 2. 5. Transkutan Ozon İrrigasyonu.....	17
2. 2. 2. 2. 6. Ozonize Su Uygulaması.....	18
2. 2. 2. 2. 7. Topikal Olarak Rektal İnsüflasyon.....	18
2. 2. 2. 2. 8. İntraartiküler Ozon Uygulaması.....	18
2. 2. 2. 2. 9. Ozonize Zeytinyağı Uygulaması.....	19
2. 2. 2. 3. Medikal Ozonun Etki Mekanizması	19
3- GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3. 1. Deneyisel Tıkanma Sarılığı Oluşturulması.....	22
3. 2. Biyokimyasal İnceleme.....	25
3. 3. Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal İnceleme.....	25
3. 4. İstatistiksel Analiz.....	28
4- BULGULAR.....	29
5- TARTIŞMA	37
6- SONUÇLAR.....	41
7- KAYNAKLAR.....	42
8- ÖZGEÇMİŞ.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

SOD	Süperoksit Dismutaz
mm	Milimetre
cm	Santimetre
gr	Gram
l	Litre
mmol	milimol
mg	miligram
dl	desilitre
ALP	Alkalen Fosfataz
AST	Aspartat Amino Transferaz
ALT	Alanin Amino Transferaz
SMA	Düz Kas Aktini (Smooth Muscle Actin)
ECM	Ekstrasellüler Matriks
nm	Nanometre
UV	Ultraviyole
V	Volt
MAH	Major Otohemoterapi
ml	Mililitre
µg	Mikrogram
ATP	Adenozin Trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
SOR	Serbest Oksijen Radikali

VI

kg	Kilogram
⁰ C	Santigrat derece
Min.	Minimum
Max.	Maximum
U	Unit
NO	Nitrik oksit
O ₃	Ozon
O ₂	Oksijen
NOS	Nitrik oksit sentetaz

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Karaciğerin segmenter anatomisi.....	4
Şekil 2. Karaciğer lobülünün histolojik sınıflaması.....	5
Şekil 3. Safra kesesi anatomisi.....	8
Şekil 4. Safra oluşumu.....	10
Şekil 5. Hepatik fibrozis.....	13
Şekil 6: Medikal ozon jeneratörünün işleyiş ilkesi.....	15
Şekil 7. Grupların AST, ALT, ALP, total bilirubin, direk bilirubin, hepatik fibrozis ve α -SMA ortalamalarının karşılaştırması.....	32
Şekil 8. Grupların hepatik fibrozis skorlarının yüzdesel dağılımı.....	33
Şekil 9. Grupların toplam hepatik fibrozis skorları.....	34
Şekil 10. Grupların α -SMA skorlarının yüzdesel dağılımı.....	35
Şekil 11. Grupların toplam α -SMA skorları.....	35
Şekil 12. Grupların periportal inflamasyon değerlerinin dağılımı.....	36

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Safra bileşimi.....	8
Tablo 2. Hepatik fibrozisin histopatolojik skorlaması.....	26
Tablo 3. α -SMA'nın immunohistokimyasal skorlaması.....	27
Tablo 4. Deney grubundaki sıçanların AST, ALT, ALP, total bilirubin, direk bilirubin, hepatik fibrozis, α -SMA ve periportal inflamasyon değerleri.....	29
Tablo 5. Kontrol grubundaki sıçanların AST, ALT, ALP, total bilirubin, direk bilirubin, hepatik fibrozis, α -SMA ve periportal inflamasyon değerleri.....	30
Tablo 6. Sham grubundaki sıçanların AST, ALT, ALP, total bilirubin, direk bilirubin, hepatik fibrozis, α -SMA ve periportal inflamasyon değerleri.....	31
Tablo 7. Grupların AST, ALT, ALP, total bilirubin, direk bilirubin, hepatik fibrozis ve α -SMA ortalamalarının karşılaştırması.....	31
Tablo 8. Grupların hepatik fibrozis skorlarının dağılımı.....	33
Tablo 9. Grupların α -SMA skorlarının dağılımı.....	34
Tablo 10. Grupların periportal inflamasyon değerleri.....	36

RESİMLER

Resim	Sayfa
Resim 1. Laparotomi ile koledok kanalının ortaya konulması ve bağlanması..	23
Resim 2. Rektal ozon uygulaması.....	23
Resim 3. Safra yolu obstruksiyonu sonrası relaparotomi.....	24
Resim 4. Kan ve doku örneklerinin alınması.....	25
Resim 5. Mason Trikrom ile boyanmada normal histolojik yapılar (skor 0) (MT, x100).....	26
Resim 6. α -SMA ile hepatik stellat hücrelerin %11-20'sinde boyanmanın gösterilmesi (skor 2) (SMA, x200).....	27

ÖZET

Yenidoğan sarılığı dışında çocukluk çağında görülen sarılıkların önemli bir bölümü tıkanma sarılıklarıdır. Tıkanma sarılığında gelişen hepatik hasarın patogenezi açıklamaya çalışan birçok teori vardır. Safra yolu obstrüksiyonlarında reaktif oksijen radikallerinin hepatik hasarda önemli rolü olduğu gösterilmiştir.

Medikal ozon uygulamasının nitrik oksit (NO) düzeyinde artış ve iskemik alanlarda vazodilatasyona neden olarak hipokside azalma, süperoksit dismutaz (SOD) aktivasyonu ve glutatyon seviyesinde azalma sonucu oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir.

Bu deneysel çalışmada safra yolu obstrüksiyonuna bağlı hepatik fibroziste ozon tedavisinin rolü araştırılmıştır.

Her grupta 7 sıçan olmak üzere toplam 21 adet erkek Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Deney grubuna laparotomi yapıp koledok kanalı bağlandıktan sonra 21 gün boyunca 1 mg/kg dozda, 50 µg/ml konsantrasyonda rektal ozon uygulaması yapıldı. Kontrol grubuna laparotomi yapıp koledok kanalı bağlandıktan sonra herhangi bir tedavi verilmedi. Sham grubuna ise sadece laparotomi yapıp karın içi 1cc serum fizyolojik ile yıkandı. Tüm hayvanlar post operatif 21.günde relaparotomi yapılarak histopatolojik değerlendirme için karaciğer doku örneği ve karaciğer fonksiyon testleri için intrakardiyak kan örneği alındı.

Çalışmamızda AST, ALT, total bilirubin ve direk bilirubin değerlerinde düşüş saptamakla beraber deney ve kontrol grupları karşılaştırıldığında sadece total bilirubin seviyesinde anlamlı azalma saptadık. Sıçan karaciğerlerinin histopatolojik incelenmesinde hepatik fibrozisin ve periportal inflamasyonun deney grubunda daha düşük olduğunu saptadık. Kontrol grubundaki sıçanların %57,1'inde inkomplet siroz saptanırken, deney grubunda siroza rastlanmadı.

Deney grubundaki 7 sıçanın 3'ünde periportal inflamasyon varken kontrol grubundaki sıçanların hepsinde periportal inflamasyon saptandı. İmmunohistokimyasal olarak kontrol grubunda vasküler düz kas hücrelerinde, sinüzoidlerde, fibrotik septalar ve proliferatif safra duktuslarında α -SMA ile pozitif reaksiyon izlenmiştir. Ozon verilen grupta pozitif α -SMA reaksiyonunda belirgin azalma olduğu saptandı.

Çalışmamızda ozonun tıkanma sarılığı modelinde karaciğer harabiyetini gösteren AST, ALP, total bilirubin ve direk bilirubin değerlerinde düşüş; hepatik fibrozisi, periportal inflamasyonu ve hepatik stellat hücrelerin α -SMA ile pozitif reaksiyonunu azalttığını; yaptığını saptadık. Ancak ozonun klinik kullanımı için daha fazla sayıda sıçanla çalışma yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Tıkanma sarılığı, medikal ozon, hepatik fibrozis, periportal inflamasyon, α -SMA

ABSTRACT

As a surgical point of view, a significant portion of childhood jaundice is obstructive. There are many different theories trying to explain hepatic damage pathogenesis caused by extrahepatic cholestasis. Reactive oxygen radicals have been shown to play an important role in hepatic damage in bile duct obstructions.

Medical ozone application has been shown to raise nitric oxide (NO) levels and cause an increase in hypoxic vasodilation in ischemic areas. That in turn causes a decrease in hypoxia and oxidative stress related to reduced levels of glutathione and an activation of superoxide dismutase (SOD).

In this experimental study we investigated the role of ozone therapy in hepatic fibrosis caused by biliary obstruction.

A total of 21 male Sprague-Dawley rats, seven rats in each group were used. In the experimental group after common bile duct ligated by laparotomy, 1 mg / kg dose, 50 mg / ml concentration of ozone was applied rectally for 21 days. In the control group, no treatment was given after the binding of common bile duct with laparotomy. In the sham group, only laparotomy was performed and intraperitoneal cavity is washed with 1 cc of saline. Hepatic tissue sample and intra-cardiac blood samples were collected from all animals at post-op 21st day with relaparotomy.

In our study, we detected a decrease in AST, ALT, total bilirubin and direct bilirubin levels however when we compared the experiment and control groups, we found a value of $p = 0.025$ in Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction which is close to the limit of significance of $p < 0.0167$. Histopathological examination of hepatic fibrosis and inflammation in the livers of rats in the experimental group was lower than periportal lesions. In the control group incomplete cirrhosis was detected in 57.1% of the rats, when in the experimental group no cirrhosis was detected. Periportal inflammation was

seen in 42.9% of the in the experiment group and 100% in the control group. In control group a positive reaction was observed with α -SMA in vascular smooth muscle cells sinusoids, fibrotic septa and proliferating bile ducts immunohistochemically. A significant decrease in positive α -SMA- reaction was observed in ozone-treated group.

We suggest that ozone can decrease the hepatic destruction levels in biliary diseases such as biliary atresia, bile duct cyst, primary biliary cirrhosis, cholangitis resulting in hepatic fibrosis and delay liver transplantation. However, for clinical use and for significant results, more studies should be performed.

Key words: Extrahepatic cholestasis, medical ozone, hepatic fibrosis, periportal inflammation, α -SMA

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çocukluk çağında görülen sarılıkların cerrahi açıdan önemli bir bölümü tıkanma sarılıklarıdır. Bunların içinde en sık biliyer atrezi, koledok kistleri, safra taşları, primer biliyer siroz ve sklerozan kolanjit yer alır. Tıkanma sarılığında gelişen hepatik hasarın patogenezi açıklamaya çalışan birçok teori vardır.

Safra yolu obstrüksiyonlarında reaktif oksijen radikallerinin hepatik hasarda önemli rolü olduğu gösterilmiştir (1,2). Safra yolu bağlanmış sıçanlarda safra asidi konsantrasyonunun artması lipid peroksidasyonunu uyararak polimorfonükleer fagositlerdeki fagositik aktiviteyi stimüle eder (3). Hepatik nötrofil infiltrasyonu ile lipid peroksidasyonu arasında yakın ilişki vardır (4). Bunların sonucunda biliyer obstrüksiyon hepatosellüler hasara ve ilerleyici hepatik fibrozise neden olur (5). Komplet biliyer obstrüksiyonda hepatosellüler nekroz ve apoptosis, safra kanalı epiteli hücre proliferasyonu ve bunların sonucunda hepatik fibrozisle sonuçlanır (6).

Bu yüzden, bu hastalıklar sonucunda gelişen veya gelişebilecek karaciğer hasarını ve sirozunu engellemeye ya da azaltmaya yönelik tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmuştur.

Ozon (O_3), aktiflenmiş oksijenin üç atomlu halidir. Medikal uygulamalarda ozon O_2/O_3 karışımı şeklinde kullanılır. Sistemik ozon uygulamasının nitrik oksit (NO) düzeyinde artış ve iskemik alanlarda vazodilatasyona neden olarak hipoksiyi azalttığı, süperoksit dismutaz (SOD) aktivasyonu ve glutatyon seviyesinde azalma sonucu oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (7,8).

Bu deneysel çalışmada sıçanlarda safra yolları bağlanarak oluşturulan karaciğer hasarı modelinde ozonun koruyucu etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlandı.

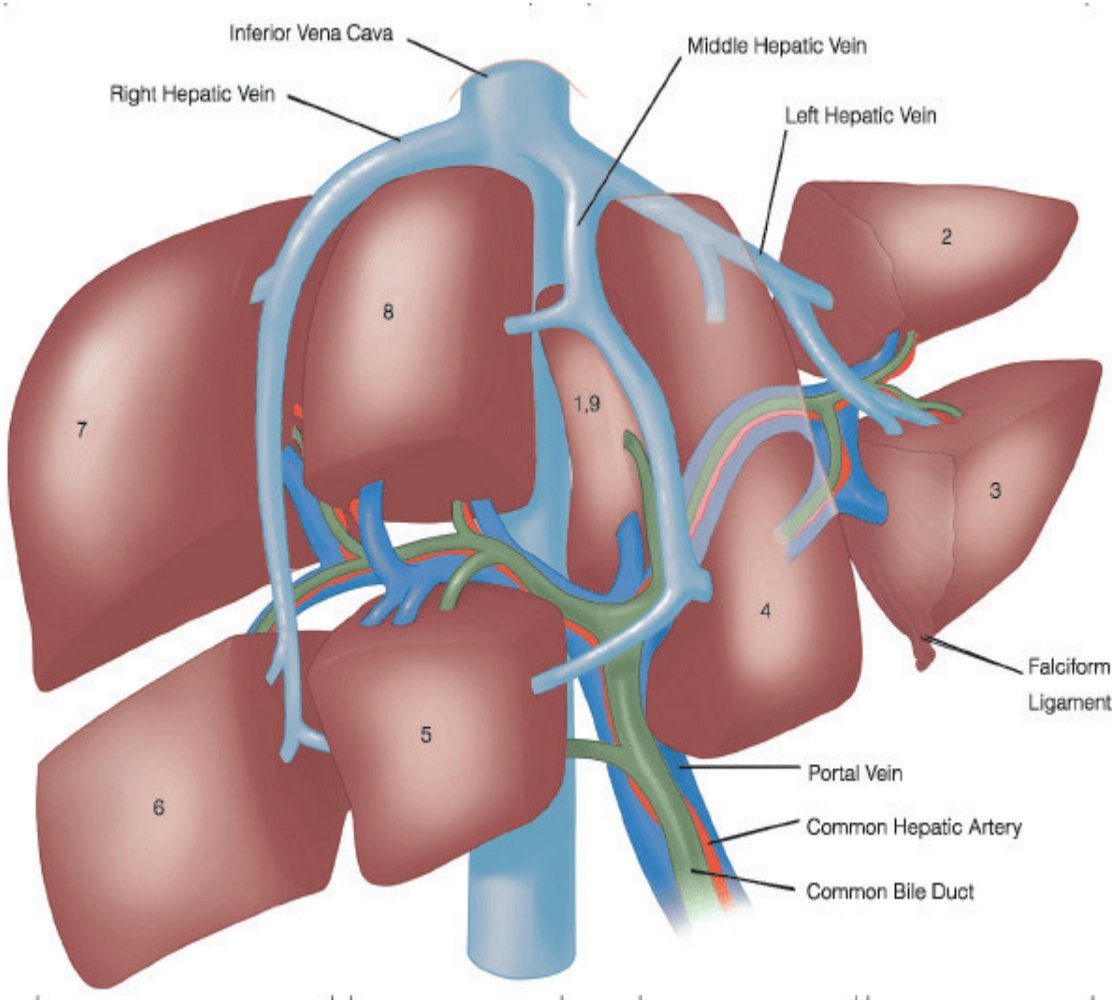
2. GENEL BİLGİLER

2.1. KARACİĞER VE EKSTRAHEPATİK KOLESTAZ

2. 1. 1. KARACİĞER ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Karaciğer vücudumuzun en büyük iç organı ve bezidir (9). Karaciğerin diyaframla komşu olan yüzü (facies diaphragmatica) konveks, iç organlarla komşu olan yüzü (facies viseralis) ise konkavdır. Karaciğer alt yüzü sağda duodenum, kolon, sağ böbrek ve sürrenal ile solda özofagus ve mide ile komşudur. Diyaframa doğrudan temas halinde bulunan bir alan (area nuda) dışında tamamen peritonla kaplıdır (10). Karaciğer hilusta kalınlaşan, elastik ve kollajen liflerden oluşan Glisson kapsülü adı verilen özel bir dokuyla kaplıdır (11).

Karaciğer 1957 yılında Couinaud tarafından tanımlanan anatomik segmentlere ayrılmıştır. Buna göre; sol ve sağ loblar arasındaki hat safra kesesi yatağının medial kenarından arkada vena kavaya kadardır. Bu sınıflamaya göre sol lob; sol medial segment (segment IV) ve sol lateral segmentler (segment II ve III) olmak üzere 3 segmente ayrılır. Sağ lob portal ven ve hepatik arterlerin dallarına göre, anterior-inferior (segment V), posterior-inferior (segment VI), posterior-superior (segment VII) ve anterior-süperior (segment VIII) olmak üzere dört segmente ayrılır. Kaudat lob (segment I) arkada sağ ve sol hepatik loblar arasında yerleşmiştir (12).

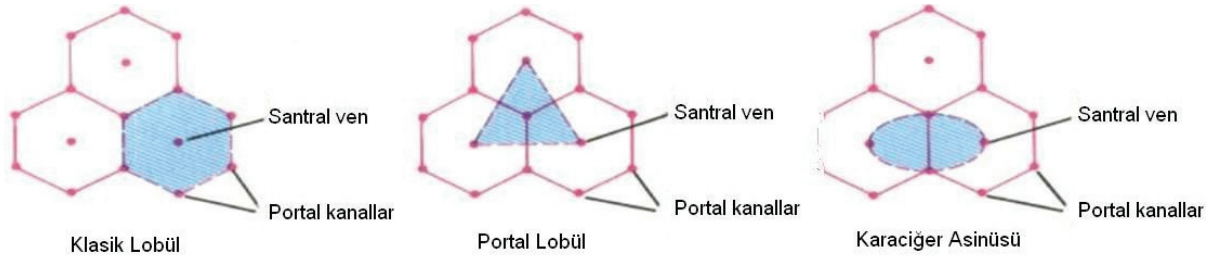


Şekil 1: Karaciğerin segmenter anatomisi

Karaciğere gelen kanın %25'i arteria hepatica ile %75'i ise vena porta ile taşınır. Trunkus çölyakustan çıkan arteria hepatica communis, arteria gastroduodenalis yan dalını verdikten sonra arteria hepatica propria adını alır ve hepatoduodenal ligamanı takip ederek hilusta sağ ve sol dallara ayrılır. Vena porta; vena mezenterika superior ile vena lienalis'in birleşmesinden oluşur. Karaciğer lobüllerindeki santral venler sağ, sol ve ortak hepatik venlerle vena kava inferiora dökülürler.

Karaciğerin yüzeyel lenfatikleri diyafram ve karaciğerin asıcı ligamanı vasıtasıyla posterior mediastene drene olurlar. Derin lenfatikler ise hepatik venleri takip ederek veya portal venlerle birlikte porta hepatis'e ulaşarak sisterna şiliye, oradan da duktus torasikus'a drene olur. Karaciğer medulla spinalis'in T9-L1 segmentlerinden gelen sempatik, sağ ve sol vagustan gelen parasempatik liflerle innerve olur (12,13).

Karaciğerin fonksiyonel ünitesi birkaç mm uzunluğunda, 0,8-2 mm çapında olan karaciğer lobülüdür (10). Karaciğer parankiminin organizasyonu ile ilgili 3 temel birim vardır (Şekil 2) (14).



Şekil 2: Karaciğer lobülünün histolojik sınıflaması

Klasik karaciğer lobül kavramı; ortada santral ven ve santral venden periferik uzanan hücre kordonları, bunların arasında yer alan sinüzoidlerden oluşur. Portal lobül kavramı; safranin salgılanışına göre tasarlanmıştır. Üç karaciğer lobülünün santral venlerinin birleştirilmesiyle oluşan üçgen modeldir. Buna göre, bu 3 lobülde oluşan safra ortadaki portal alanda bulunan safra kanalına ortak olarak akmaktadır.

Karaciğer asinüsü modeline göre; hepatositler kanlanması göre 3 zona ayrılır. Periferik zon (Zon I); oksijen ve besin maddelerinden en zengin kanla karşılaşan bölgedir. Lobüldeki en aktif bölgedir. Ara zon (Zon II); orta bölgedeki hücrelerdir, orta seviyede aktivite gösterirler. Santral zon (Zon III); santral veni çevreleyen en içteki hücre topluluğudur, en az aktif olan bölgedir (15-17).

Karaciğerde hepatosit, endotel hücresi, Kupffer hücresi, hepatik stellat hücreler (İto hücreleri) ve safra kanalı epitelyum hücresi olmak üzere 5 çeşit hücre topluluğu vardır (18). Hepatositler; karaciğerin endokrin ve ekzokrin görev yapan fonksiyonel hücreleridir. Karaciğerdeki hücrelerin %80'ini hepatositler oluşturur ve oksidatif stresle ilişkili hücrelerdir (18). Bir hepatositin mikrovillus içeren, disse aralığına ve sinüzoid boşluğuna bakan bazolateral bölgesi ve safra kaçışını önlemek için safra kanallarının etrafını sarmış mikrovilluslarla kaplı girinti şeklinde apikal bölgesi vardır. Endotel hücrelerinin duvar yapısı sayesinde kandan madde geçişine izin verirler. Kupffer hücreleri; endotel hücreleri arasında bulunan, monositlerden köken alan fagositoz yeteneğindeki hücrelerdir. Stellat hücreler; disse aralığında yer alan A vitamini metabolizmasında ve depolanmasında görevli yıldızlı hücrelerdir, patolojik durumlarda kollojen üreten miyofibroblast benzeri hücrelere dönüşürler. Safra kanalikülleri, karaciğer lobülünün plakları boyunca anastomoz yapan kompleks bir ağ oluşturur ve portal alanda sonlanır.

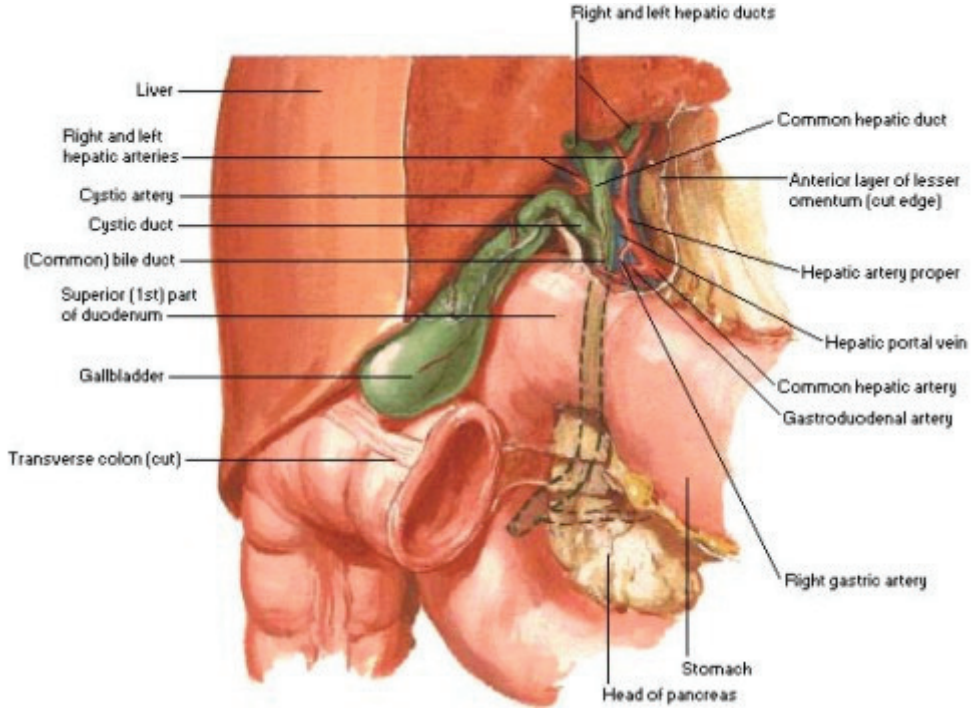
Kanaliküllerin duvarlarını oluşturan karaciğer hücreleri sıkı tipte bağlantı (zonula adherens) oluşturarak safra salgısının sızıntısını önlerler. Safra, safra kanaliküllerinden lob içi safra kanalcıklarına oradan da lobül dışındaki Hering kanallarına akarak portal alandaki safra kanallarına boşalır. Safra kanalcıkları önce karaciğer içi safra kanallarında birleşerek sağ ve sol hepatik kanalları oluşturur (16, 19, 20).

2. 1. 2- SAFRA KESESİ ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Ana hepatik kanal, sağ ve sol hepatik kanalların porta hepatiste birleşmesiyle oluşur. Ana hepatik kanal ile sistik kanal birleşerek koledoku (ana safra kanalı) oluşturur. Koledok erişkinlerde 6-8 cm uzunluğunda, ortalama 7,6 mm çapındadır. Koledok pankreas başına 5-7 mm'lik bir lümenle açılır. Kanalın çapındaki ani düşme sonucu koledok sfinkteri (Oddi sfinkteri) oluşur. Hepatikopankreatik ampulladan geçen safra duodenum 2. kısmındaki papiller ostiuma açılır.

Ekstrahepatik safra yolları; sağ ve sol hepatik kanal, ana hepatik kanal, safra kesesi ve koledoku kapsar (Şekil 3) (21). Safra kesesi, karaciğer alt yüzünde sağ ve sol lobları ayıran oluğa yerleşmiştir. Safra kesesi boyun kısmının yapısına göre çeşitli varyasyonlar gösterir. Boyun kısmı dar ve uzun ise tübüler, kısa ve geniş ise sakküler veya sferik şekildedir. Safra kesesi konjenital bazı varyasyonlar gösterebilir; transvers, retroperitoneal, suprahepatik yerleşimli, 'vesica divisa' denilen çift safra kesesi olması, 'Rokitansky-Aschoff sinüs'ü denilen psödodivertikülü, genişlemiş intramural uzantı şeklinde olan "Luscka" kanalı, safra kesesi ve sistik kanalın konjenital yokluğu sayılabilir. Sistik kanalın ana hepatik kanala önden veya arkadan çaprazlayarak soldan giriş yapması anormal varyasyon olarak tanımlanır.

Safra kesesini sağ hepatik arterden ayrılan sistik arter besler. Sistik arter, karaciğer, ana hepatik kanal, sistik kanalın sınırladığı "Callot" üçgeninde bulunur. Karaciğer dışı safra yolları vena portaya drene olur. Safra kesesinde sempatik uyarı kesenin gevşemesine, vagus yoluyla gelen parasempatik uyarı ise safra kesesinin kasılmasına neden olur. Safra koliği ağrısı sempatik liflerdeki afferent liflerle taşınır (22). Safra kanalları silendirik epitelle döşelidir ve mukus glandları bulunur. Mukus glandları safra kesesi boyun kısmında bulunur (23). Safra kesesi duvarı içten dışa doğru mukoza, musküler tabaka, subseroza ve serozadan oluşmuştur.



Şekil 3: Safra kesesi anatomisi

2. 1. 3. SAFRA YAPIMI

Safra hepatositler tarafından sentezlenerek safra kanaliküllerine salgılanmaktadır (24). Safra; su, organik asit, inorganik asitler ve safra tuzlarından (kolik asit, kenodeoksikolik asit) oluşur. Safra içinde bulunan maddeler Tablo-1’de gösterilmiştir (25).

Tablo 1. Safranin bileşimi

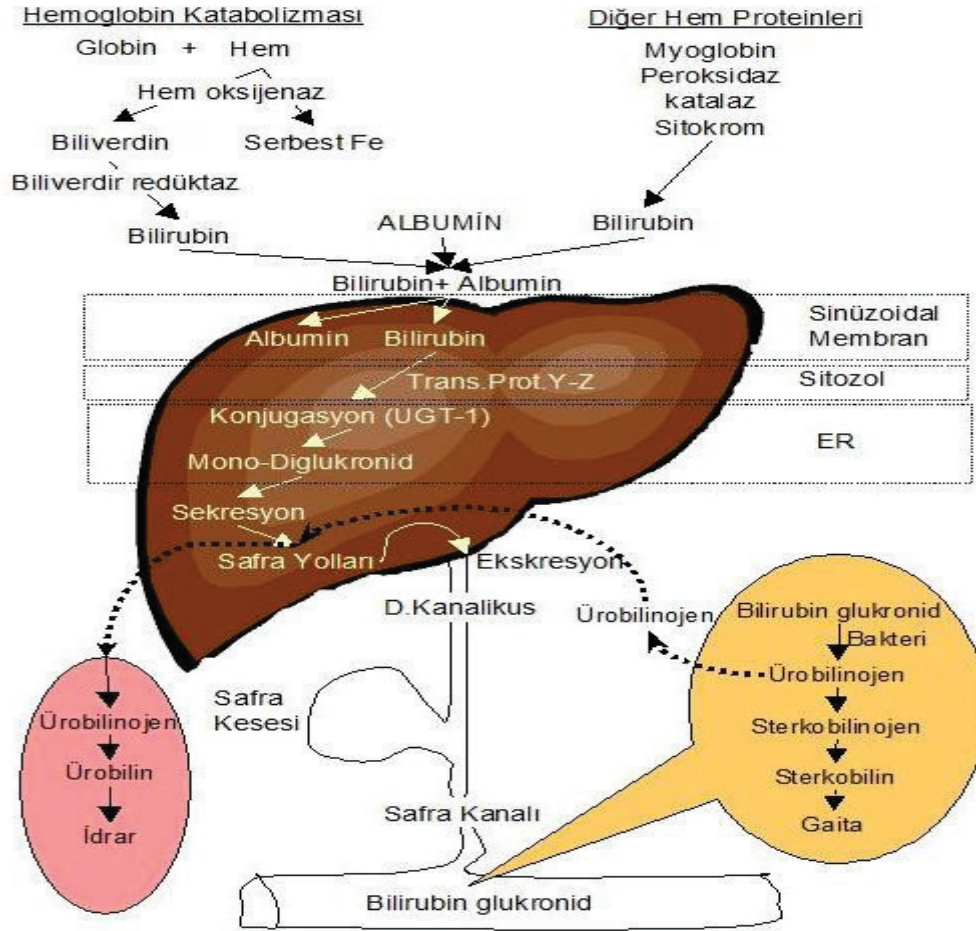
Su (g/l)	950-980
Safra asitleri (g/l)	10
Bilurubin (g/l)	2
Kolesterol (g/l)	1
Yağ asitleri (g/l)	1
Lesitin (g/l)	0,5
İnorganik moleküller (mmol/l)	280

Ana safra asitleri olan kolik asit ve kenodeoksikolik asit, glisin ve taurin ile konjuge edilerek suda eriyebilir hale gelirler. Deoksikolik asit ve litokolik asit ise barsakta bakteriler tarafından ana safra asitlerinden oluşturulur. Litokolik asit suda erimez ve dışkı ile atılır, diğer safra tuzları ise tekrar emilerek safraya katılır. Barsağa geçmiş olan safra tuzlarının %94'ü distal ileumdan aktif transportla geri emilerek portal ven yoluyla tekrar karaciğere döner. Safra tuzlarının bu dolaşımına enterohepatik dolaşım adı verilir (22,29).

Safra ile atılan maddelerden biri de hemoglobinin yıkımının son ürünü olan bilirubindir. Ömürlerini tamamlamış eritrositler karaciğer ve dalakta bulunan retiküloendotelyal sistem hücreleri tarafından yıkılır. Hücre membranının yırtılması ile serbestleşen hemoglobin doku makrofajları tarafından fagosite edilerek hem ve globine ayrılır. Hem halkası açılarak biliverdin oluşur. Biliverdin indirgenerek bilirubini oluşturur. Unkonjuge halde olan bilirubin yağda eriyebilir ve albumine bağlanarak karaciğere taşınır. Karaciğer hücre membranında bulunan Y ve Z proteinleri ile birleşerek hücre içine taşınır. Bu proteinlerden ayrılan bilirubinin %80'i glukronik asit ile birleşerek bilirubin glukronat, %10'u sülfatla birleşerek bilirubin sülfata dönüşür, %10'u ise çeşitli maddelerle birleşir. Unkonjuge bilirubin endoplazmik retikuluma taşınarak glukronil transferaz enzimi ile monoglukronid ve diglukronidlere dönüştürülür. Konjuge hale gelen bilirubin suda çözünebilir ve hepatositlerden safraya atılır (30,31).

Safranın iki temel işlevi vardır; birincisi yağların sindirim ve emilimi, ikincisi ise bilirubin ve kolesterol gibi yıkım ürünlerinin kandan uzaklaştırılmasıdır (23, 26). Safranın salgılanması iki aşamada gerçekleşir. İlk aşamada hepatositler tarafından üretilen safra küçük safra kanallıklarına salgılanır. Bundan sonraki aşamada ise safra, intralobüler septumlara, oradan da safra kanallarına akar. Büyük safra kanallarına geçen safra ihtiyaç varsa duodenuma geçer, ihtiyaç yok ise safra kesesinde depo edilir (27, 28).

Duodenumdan salgılanan kolesistokininin safra kesesinde kontraksiyonları başlatan en güçlü hormondur. Bu hormon aynı zamanda Oddi sfinkterinde de gevşetici etkiye sahiptir. Bunun dışında safra kesesi vagus ve enterik sinir sistemindeki asetilkolin salgılayan sinir lifleri ile de uyarılır (26).



Şekil 4: Safra oluşumu

2. 1. 4. EKSTRAHEPATİK KOLESTAZ

Safra kanalikülünden Oddi sfinkterine kadar olan herhangi bir bölgede safra akımının engellenmesi sonucu oluşan tabloya tıkanma sarılığı denir (32). Tıkanıklık intrahepatik bölgede ise intrahepatik kolestaz, ekstrahepatik ise ekstrahepatik kolestaz denir (33, 34). Ekstrahepatik kolestazda iki mekanik problem oluşur:

- Safra barsağa akıtılamaz
- Tıkanıklığa sekonder safra kanallarında basınç artışı sonucu safra reflüsü gelişerek staz, kolanjit ve fibrozis gelişir (33, 34).

Sarılığı olan hastalarda deri ve sklerada sararmanın görülmesi için bilirubin düzeyinin 2-3 mg/dl' nin üzerinde olması gerekir.

Uzun süreli safra yolu tıkanıklıklarında safranin barsaklara akamaması bilirubin ve safra tuzlarının dokularda birikmesine yol açar. Bunun sonucunda sistemik ve hepatik birtakım değişiklikler oluşur (35). Tıkanma sarılığında, serum bilirubin ve alkalen fosfataz (ALP) yüksekliği karaciğer hasarını gösteren spesifik belirteçlerdir (36). Safra kanallarındaki tıkanıklık sonucunda biliyer basınç artar (30-40 cmH₂O) ve karaciğerde histopatolojik değişiklikler oluşur. Akut tıkanıklıklarda en erken bulgu kanaliküler kolestaz olup ilerleyen dönemlerde safra duktus hücreleri proliferer olur. Kronik tıkanıklıklarda periduktal bağ dokusu artışı ve fibröz tabakalar meydana gelir. Kronik kolestaz siroz gelişimine öncülük eden bir durumdur (37).

Tıkanma sarılığı, biliyer atrezi, koledok kistleri, safra kanalı hipoplazisi (Alagille sendromu), ekstrahepatik safra yollarının spontan perforasyonu, intrahepatik safra kanallarının konjenital dilatasyonu (Caroli Hastalığı) gibi konjenital veya safra taşları, tümörler, striktür gibi edinsel patolojilere bağlı ortaya çıkabilir (32, 38, 39).

2. 1. 4. 1. Transaminazlar

Transaminazlar alfa aminoasitin amino grubunu alfa ketoaside transferini katalize eden bir grup mitokondriyal enzimdir. Serum aspartat amino transferaz (AST) ve serum alanin amino transferaz (ALT) klinikte kullanılan iki önemli transaminazdır. Bu enzimlerin değeri Karmen ünitesi olarak ölçülmektedir ve normal değerleri 0-40 arasında olmalıdır. Bu enzimler başlıca kalp, karaciğer, iskelet kası olmak üzere bütün dokularda bulunurlar. Karaciğerde daha çok ALT bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu enzimlerin serum seviyesinin yüksekliği ile karaciğer hasarı arasında paralellik saptanmıştır. Akut karaciğer hasarında enzim seviyeleri çok yüksek değerlere çıkabilirken, kronik karaciğer hasarında 1,5 katı kadar yükselmektedir. Enzim düzeyleri ile prognoz arasında ilişki saptanmamıştır (29).

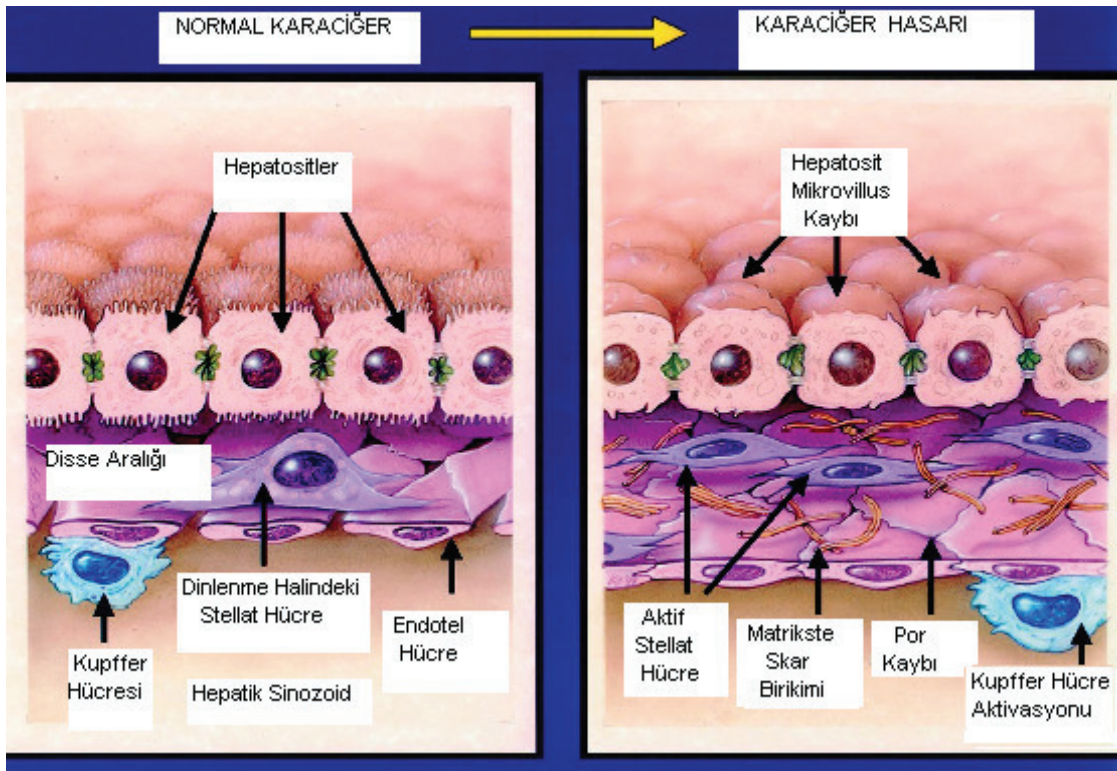
2. 1. 4. 2. Alfa Düz Kas Aktini (α -SMA)

Normal ve hastalıklı insan karaciğeri İto hücrelerinde sinüzoid ve perisinüzoidal yapının gelişimi ile bağlantılı olarak α -SMA immunreaktivitesi araştırılmış ve İto hücrelerini tanımlamak için α -SMA ile immunohistokimyasal çalışmalar yapılmıştır. Normal yetişkin karaciğerinde ince stoplazmik oluşumlar olan presinüzoidal hücreler, vasküler düz kas hücreleri ve perisitler α -SMA pozitif boyanırlar. İmmunoelektron mikroskobu, α -SMA pozitif perisinüzoidal hücrelerin, yağ damlacıkları içeren İto hücreleri olduklarını göstermiştir (40, 41).

Kronik karaciğer hasarında α -SMA pozitif İto hücrelerinde özellikle nekrotik alanlarda immün boyanma yoğunluğunda artma gösterilmiştir. Bu hücreler, düzensiz stoplazmik uzantılar, mikrofılaman miktarının artması ve karakteristik olarak yağ damlacıklarının kaybı ile beraber, şekil olarak dentritik yapı kazanmışlardır. Bu sonuçlar göstermiştir ki; anti- α -SMA antikoru kullanılan hücreler immunohistokimya, karaciğerde normal ve dönüşmüş İto hücrelerinin tanımlanması için güvenli ve duyarlı bir metoddur (40, 41).

2. 1. 4. 3. Fibrozis ve Periportal İnflamasyon

Hepatik fibroziste temel patoloji, karaciğerde başta kollajen olmak üzere ekstrasellüler matriks (ECM) birikimi ile karakterizedir (42). Akut karaciğer hasarında parankimal hücre rejenerasyonu yeterli olurken, kronik hasarda bu rejenerasyon yeterli olmaz (43). Karaciğer fibrozisi geri dönüşümlü iken, fibrozisin ilerlemiş şekli olan siroz ise geri dönüşümsüzdür (44). Hepatik fibrozisin oluşumunda normalde sakın olan İto hücrelerinin aktivasyonu birinci dereceden sorumlu tutulmaktadır (45). Hepatik fibroziste, subendotelyal aralıkta normalde düşük yoğunlukta bulunan matriks içeriğinden kollajen fibrilleri içeren interstisyel tip matriks içeriğine doğru ECM’de hafif bir değişim eşlik eder (46). Karaciğer fibrozisinde özellikle Tip-I kollajenlere bağlı ortaya çıkan karaciğer skar organizasyonu ECM bileşenlerin üretimini arttırması ile karakterizedir. İlerlemiş evrelerde karaciğer normalin 6 katı kadar ECM içermektedir (47). İto hücrelerinin aktivasyonu matrikste skar birikimine yol açarak, hepatositlerin (aynı zamanda mikrovillusların kaybı) ve sinüzoidal endotel porlarının kaybına neden olur.



Şekil 5: Hepatik Fibrozis (47)

2. 2. OZON

2. 2. 1. DOĞADA OZON VE ETKİLERİ

Ozon, üç oksijen atomundan oluşan bir kimyasal bileşendir. Oda sıcaklığında renksiz ancak karakteristik kokusu olan bir gazdır.

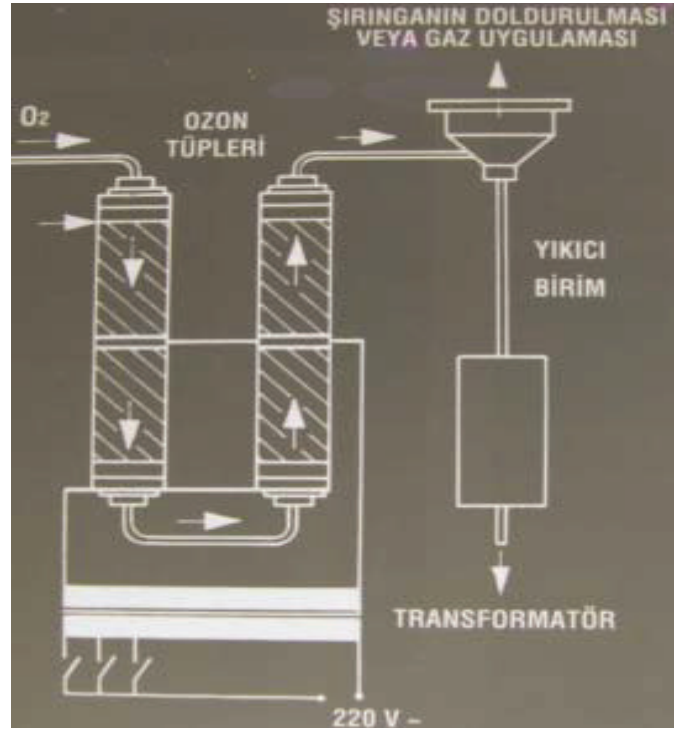
Ozon, stratosfer tabakasında bulunan en önemli gazlardan biridir. 200-300 nanometre (nm) dalga boyunda UV aralığındaki Emilim kapasitesi sayesinde güneşin yaydığı ultraviyole ışınlar karşısı koruyucu bir tabaka oluşturmakta ve biyolojik dengeyi korumaya yardımcı olmaktadır. Ozonosferdeki ozon tabakasının tahrip olmasına bağılı ozon konsantrasyonunda düşüş olmakta ve güneşin zararlı UV ışınlarına maruziyet artmaktadır.

2. 2. 2. MEDİKAL OZON

Medikal ozon sessiz elektrik deşarjı ile hazırlanır ve istenen konsantrasyonda ozon/oksijen karışımı elde edilir. Medikal ozon saf ozon ile saf oksijenin karışımıdır. Uygulanmasına bağılı olarak ozonun konsantrasyonu 1-100 µg/ml (%0,05-5 O₃) arasında değışebilir. Ozon molekülü sabit bir molekül değıldir ve her zaman taze olarak özel bir jeneratör yardımıyla çalışma yerinde hazırlanarak anında kullanılır. Jeneratörlerde enerji, O₂ moleküllerinin oksijen atomlarına ayrışmasını sağılar. Atomlar, var olan başka bir O₂ molekülüyle birleşerek O₃ molekülünü meydana getirir.

2. 2. 2. 1. Medikal Ozonun Elde Edilmesi

Piyasada farklı teknik yapıda ozon jeneratörleri bulunmaktadır. Şekil 6'da düşük frekans voltajda plazmik deşarjlı medikal ozon jeneratörünün çalışma ilkesi açıklanmaktadır.



Şekil 6: Medikal ozon jeneratörünün işleyiş ilkesi (48)

Burada medikal ozon, seri bağlanmış iki yüksek voltaj tüpünden geçmektedir. Tüpler yaklaşık 4000 ile 9000 V arasında değişen voltaja bağlıdır. Enerji O_2 moleküllerinin oksijen atomlarına ayrışmasını sağlar. Atomlar var olan bir O_2 molekülüyle birleşerek O_3 ozon molekülünü oluşturur. Fazla ve kullanılmayan ozon katalitik yolla tekrar oksijene dönüştürülür (49).

Ozon jeneratöründe voltaj ve gaz akımı miktarı kontrol edilebilir. Uygulanan voltaj arttırıldıkça ozon konsantrasyonu da artar, gaz akışı arttıkça ozon konsantrasyonu düşer. Ozon konsantrasyonu ek olarak sıcaklık, basınç gibi çeşitli parametrelere de bağlı olduğundan jeneratörlerdeki O_3 konsantrasyonu devamlı ölçülmelidir. Standart ölçüm olarak UV fotometresi tercih edilen bir yöntemdir.

2. 2. 2. 2. Medikal Ozonun Uygulama Biçimleri

2. 2. 2. 2. 1. Major Otohemoterapi (MAH):

Son yıllarda MAH düşük riskli ozon uygulamalarının en önemli biçimi haline gelmiştir. Ozon+kan reaksiyonu hastanın vücudu dışında olmakta, daha sonra hastanın kendi kanı aktif eritrositlerle reinfüzyona sokulmakta ve immunokompetan hücreler aktive olmaktadır.

Bu işlem steril koşullarda tek kullanımlık malzemelerle yapılır. Hastanın 50-100 ml kanı alınarak doğru dozda ozon ile zenginleştirilir. Ozon/oksijen karışımı kandan geçirilir. Kan daha sonra hastaya tekrar transfüze edilir.

MAH'nin en önemli endikasyonları; arteriyel dolaşım bozuklukları, bağışıklık yeterizliğinden kaynaklanan hastalıklar, enfeksiyon, romatizmal hasarlar, kanser hastalarına ek tedavi ve artritlerdir (49, 50, 51).

2. 2. 2. 2. 2. Rektal Ozon İnsüflasyonu

En eski sistemik ve lokal uygulama yollarından biridir. Bu yöntemle yaklaşık 10-12 insüflasyonluk bir uygulama dizisini takiben MAH'ye benzer sonuçlar elde edilebilir.

Rektal ozon uygulamasında katetere bağlı ozona dirençli bir enjektör yardımı ile veya bir ozon konteyneri ve silikon doz çantası kullanılarak 150-300 ml O₃/O₂ karışımı tatbik edilebilir.

Bu uygulama yöntemi çocuklarda en uygun ve pratik yöntem olduğu gösterilmiştir.

Genel olarak rektal insüflasyon, venöz yapıların MAH için uygun olmadığı hastalarda, bağırsakta proktit veya kolit gibi patolojilerin olduğu hastalarda veya immün sistemi zayıf pediatrik hastalarda rekürren enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir (48).

2. 2. 2. 3. Minör Otohemoterapi

Ozona dirençli 30 ml'lik tek kullanımlık enjektöre 10 ml'lik O_3/O_2 karışımı doldurulur ve hastanın 3-5 ml kanına 20 $\mu\text{g/ml}$ eklenir. Daha sonra bu karışım intramusküler olarak yeniden enjekte edilir.

Temel endikasyonları alerjik durumlar, akne, fronkülozistir (49).

2. 2. 2. 4. Düşük Basıncılı Ozon Uygulaması

Lokal olarak sınırlı yaralarda, ozon gazının normal atmosfer basıncının altındaki değerlerdeki bir basınçta ve vakum kabı altında sürekli akışının olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir (49). Tedavi edilecek bölge daha önce su ile ıslatılır, artık O_3 geri çekilir ve kataliz aracılığı ile yeniden O_2 'ye dönüştürülür. Vakum hastanın kendini en rahat hissedeceği şekilde ayarlanır. Lezyonun ciddiyetine göre vakum basıncı ayarlanır.

Bu uygulamanın özellikle dekübitis, radyasyon tahribatında ve fistüllerde yararlı olduğu bilinmektedir (49).

2. 2. 2. 5. Transkütan Ozon İrrigasyonu

Venöz ülserler ve geniş alana yayılmış enfekte yaraların tedavisinde ozona dirençli plastik çanta ve/veya torbaların kullanılması pratik olmaktadır.

Yara, uygulama öncesinde salin ile yıkanır, ardından bir “velcro bandı” ile gaz kaçırmayı önlenir. İçerisindeki hava önce açma-kapama musluğu ile çıkartılır ve ardından belirlenmiş oksijen/ozon karışımı ile doldurulur. Ülser veya yara bölgesi ile gaz karışımının teması sağlanır. Medikal ozon ortalama 10-15 dakika kadar süreyle uygulanır. Artık ozon, katalizör kullanılarak oksijene dönüştürülür ve solunum yolu ile ortaya çıkabilecek bir sorun engellenmiş olunur (48).

2. 2. 2. 2. 6. Ozonize Su Uygulaması

Ozonize su yeni veya yakın zamanda yapılmış cerrahi müdahaleler de dahil olmak üzere enfekte olmuş her türlü yaraya karşı topikal uygulama için endikedir.

Ozonize su kompresler biçiminde uygulanabilir. Ozonize su kompresleri, özellikle ödem oluşumu gibi enflamatuvar süreçlerin başlangıç aşamalarında, hızlı ve önemli ölçüde ağrı gidericidir. Lokal O₃ uygulaması hücrel metabolizmayı aktive eder, ATP’de artış sağlar ve lezyonun en yakınında olup da henüz üremeye yatkınlığını koruyan hücrelerin yeniden polarize olmalarına katkıda bulunur (49, 50).

Kural olarak ozonize su çift damıtılmış sudan taze olarak hazırlanır. Bu suyun ml’si azami 20 µg ozon absorbe eder, oda sıcaklığında yarı ömrü yaklaşık 10 saattir. Buzdolabında bu süre 5 güne çıkar, yani ozonize suyun evde kullanılması da mümkündür. Ozonize su tamamen güvenli bir maddedir. Pratik olarak herhangi bir gaz açığa çıkarmadığı için havaya ozon karışmaz.

Bu tedavinin en önemli endikasyonları; yeni yaralar, enfekte yaralar, mantar enfeksiyonları, liken veya küfler, zona, herpes zoster, otitis eksternadır (51).

2. 2. 2. 2. 7. Topikal Olarak Rektal İnsüflasyon

Sistemik etkisine ek olarak rektal ozon/oksijen gaz insüflasyonunun lokal etkisi de kolit ve proktit tedavisinde önemli yer tutar. Fistül tedavisinde fistül içine ozon/oksijen infiltrasyonu için kateter ve emilim kabı birlikte kullanılır (48).

2. 2. 2. 2. 8. İntraartiküler Ozon Uygulaması

İntraartiküler ozon enjeksiyonunun başta diz ve omuz eklemleri olmak üzere akut ve kronik ağrılı eklem rahatsızlıklarında yararlı ve etkin olduğu kanıtlanmıştır. En önemli endikasyonları; gonartrozis, akut omuz eklemleri

sorunu, kısmi sınırlı hareket fonksiyonu, kronik omuz eklemi hastalıkları, ağrılı hareketlerin tedavisidir (52).

2. 2. 2. 9. Ozonize Zeytinyağı

Doğrudan uygulanan ozonla karşılaştırıldığında, mantar ve bakteri öldürücü etkisi daha yavaştır. Mikroorganizmaların ozonize suda inaktivasyonu birkaç saniye alırken, ozonize zeytinyağında, içerdiği peroksidik ürünler nedeniyle aynı etki birkaç saat içinde gerçekleşir. Mantar ve bakteri öldürücü etkisi nedeniyle ozonize zeytinyağı başta yaygın fungoid/mikoid deri enfeksiyonları olmak üzere lezyonların lokal dezenfeksiyonu ve iyileştirilmesi için kullanılmaktadır (49,50).

2. 2. 2. 3. Medikal Ozonun Etki Mekanizması

Medikal ozonun etki mekanizmaları (52-54):

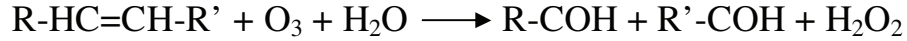
- 1- İskemik doku kan akımını ve eritrositlerde 2,3 difosfoglisarat düzeyini arttırarak doku oksijenizasyonunu arttırmak.
- 2- Kronik oksidatif strese bağlı antioksidan sistem aktivasyonu ve HO-1 miktarını arttırmak.
- 3- Lokal uygulamada bakterisidal, fungusidal ve virostatik etkili
- 4- Yara iyileşme ve hızlandırma etkisi
- 5- Sitokin salınımını sağlayarak immunoaktivatör etki

Aslında, ozon vücutta nötrofiller tarafından bakterisidal etki oluşturmak amaçlı immün sistemin bir parçası olarak kullanılan biyomoleküldür (55, 56).

Ozon vücutta plazma, lenf sıvısı veya serum fizyolojik içerisindeki çeşitli biyomoleküller ile hemen reaksiyona girer ve sonuçta moleküler oksijen ve reaktif oksijene dönüşür.



Ozonun kendisi toksik madde değildir ve etkisini ortaya çıkardığı radikaller üzerinden sağlar. Vücutta çoklu doymamış yağ asitleri ile kısa zamanda reaksiyona girerek hidrojen peroksidi oluşturur (57).



Hidrojen peroksitin kendisi serbest radikal olmamasına rağmen biyolojik zarlara nüfuz edebilmesi ve daha reaktif oksijen türlerinin yapım aşamasında aldığı rolden dolayı önemlidir. Diğer bir önemli işlevi de hücre içi sinyal molekülü olarak görev yapmasıdır (54). Hidrojen peroksit sitokin salınımını arttıran en önemli indikatörlerden biridir (58). Hidrojen peroksitin plazma yarı ömrü çok kısa olup (2,5 dakika) hızla glutatyon peroksidaz ve katalaz tarafından parçalanır (59).

Vücudumuzda serbest radikallere karşı çok hassas bir denge bulunur. Oksidan/antioksidan denge olarak tanımlanan bu dengenin bozulması oksidatif strese yol açar. Oksidatif stres endojen ve eksojen kaynaklardan oluşabilir. Oksidatif stresin endojen nedenleri; mitokondriyal sızıntı, solunumsal patlama, enzim reaksiyonları ve otooksidasyon tepkimeleridir. Çevresel faktörler ise sigara dumanı, hava kirliliği, UV ışınlar, iyonize radyasyon ve ksenobiyotiklerdir (60).

Ozon özellikle çoklu doymamış yağ asitleri, askorbik asit, ürik asit, sistein, redükte glutatyon ve albumin ile reaksiyona girer. Ozon dozuna bağlı olarak karbonhidratlar, enzimler, DNA ve RNA elektron vericisi olarak oksidasyona uğrarlar.

Ozonun etkisi ile oluşan serbest oksijen radikalleri hücre membranını etkiler. Süperoksit ve hidroksil radikalleri hücresel, nükleer, mitokondriyal ve endoplazmik zarlarda lipid peroksidasyonunu başlatır. Bunun sonucunda kalsiyum kanalları açılarak hücre içi enzim aktivasyonuna bağlı tepkimeler oluşur (61).

Ozon plazma ile temas ettikten sonra organizma içerisinde SOR ve lipid oksidasyon ürünü (LOP; lipid oxidation product) adlı iki kimyasal yapının

oluşumunda rol alır. Bu maddeler kontrollü oksidatif stres oluşumu sağlayarak kan hücreleri ve diğer organların fonksiyon ve yapılarında değişikliğe neden olur (52, 61).

Bu bilgiler ve literatür ışığında çalışmamızda rektal yoldan uygulanan ozonun inferior mezenterik ven yolu ile karaciğere ulaşması ve iliak venlerle de sistemik dolaşıma girerek safra yolu bağlanmış sıçanlarda hepatik fibrozis üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde (DETAE) yapılmıştır ve öncesinde DETAE Hayvan Deneyleri Etik Kurul onayı alınmıştır.

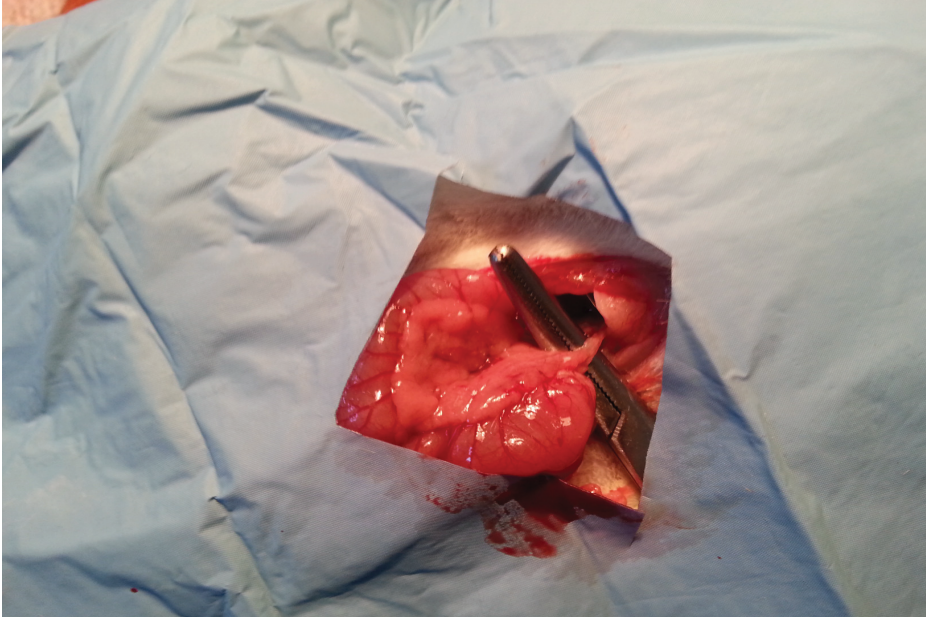
Çalışmamızda ağırlıkları 180-220 gr arası 21 adet erkek Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık standart laboratuvar şartlarında uygun kafeslerde, şehir suyu ve standart yem ile beslendiler. Hayvanlara uygulanan cerrahi işlemler steril şartlarda ve intraperitoneal olarak uygulanan 40 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ve 10 mg/kg xylazine hidroklorür (Rompun, Bayer, Almanya) genel anestezisi altında gerçekleştirildi.

Her grupta 7 sıçan olmak üzere 3 grupta toplam 21 sıçan kullanıldı. Gruplar:

1. Deney Grubu: Laparotomi yapıp koledogun bağlanarak obstrüktif sarılık geliştirilen ve post operatif ilk günden itibaren 30 gün süreyle rektal ozon verilen grup
2. Sham Grubu: Laparotomi yapıp karın içinin sadece 1 cc serum fizyolojik ile yıkandığı grup
3. Kontrol Grubu: Laparotomi yapıp koledogun bağlanarak obstrüktif sarılık geliştirilen ve rektal ozon verilmeyen grup

3.1. Deneysel Tıkanma Sarılığı modeli Oluşturulması

Tüm sıçanların batın ön duvarı tüyleri traşlanarak povidon iyot ile saha temizliği yapıldıktan sonra median laparotomi ile batına girildi. Sham grubunda koledok bulundu ve bırakıldı. Deney ve kontrol grubunda koledok bulunarak disektörle dönüldü ve 4/0 ipek ile bağlandı (Resim 1). Katlar usulüne uygun cilt 3/0 ipek sütür ile kapatıldı. Hayvanlar anesteziden çıkmak üzere uygun kafeslere alındı ve post operatif 6.saatten itibaren oral beslenmeye başlandı.



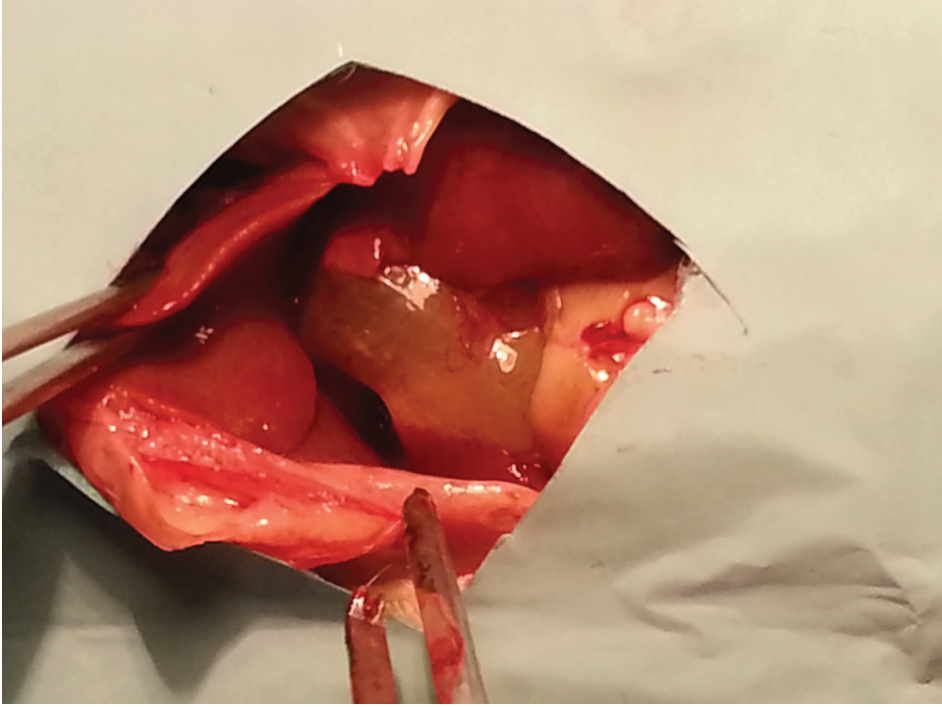
Resim 1: Laparotomi ile koledok kanalının ortaya konulması ve bağlanması

Deney grubunda postoperatif ilk günden itibaren 1 mg/kg dozda, 50 µg/ml konsantrasyonda rektal ozon uygulandı (Resim 2).



Resim 2: Rektal ozon uygulaması

Postoperatif 21.günde tüm hayvanlar ketamin anestezisi altında karın orta hattın relaparotomi yapılarak intrakardiyak kan örneği ve karaciğerden doku örneği alındı (Resim 3 ve resim 4).



Resim 3: Relaparotomi



Resim 4: Kan ve doku örneklerinin alınması

3.2. Biyokimyasal İnceleme

Kan örnekleri biyokimya tüpüne alınarak 5 dakika 3500 devirde santrifüj edilerek serumları ayrıldı, serumlar analiz dönemine kadar -80°C 'de saklandı. Serum örneklerinden hazır kitler kullanılarak kolorimetrik yöntemlerle AST, ALT, GGT, ALP, total bilirubin ve direk bilirubin düzeyleri çalışıldı.

3.3. Histopatolojik ve İmmunhistokimyasal İnceleme

Karaciğer dokuları %10'luk formalin ve Bouin's solüsyonunda 24 saat fikse olduktan ve standart takip işlemlerinden geçirildikten sonra parafine gömülüp 5 mm kalınlıkta kesildi. İmmunhistokimyasal reaksiyonlar Ventana hazır immünhistokimya cihazında standart işlemlerden geçirilerek gerçekleştirilmiştir.

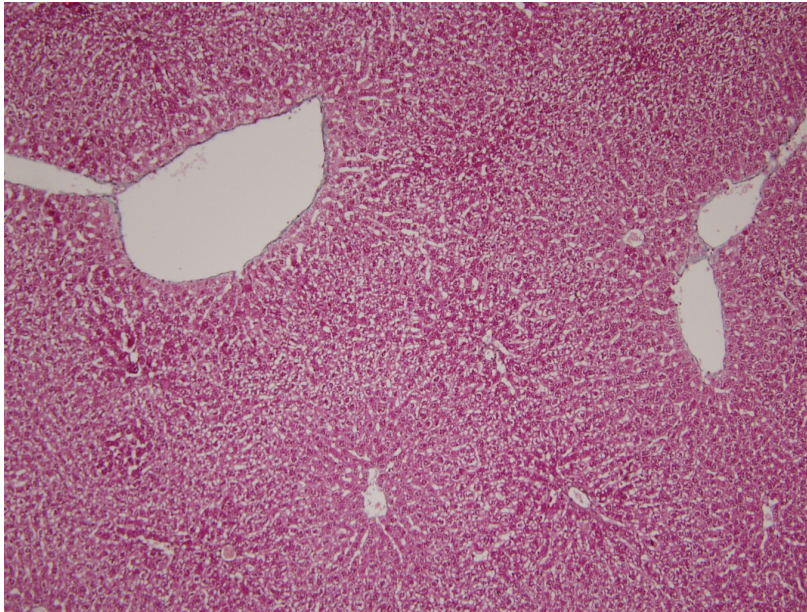
Düz kas aktini (SMA): Cat.MS-113-P, Neomarker , Fremont, CA, USA - 1:50 dilusyonla kullanılmıştır. Ayrıca elde edilen karaciğer kesitleri

hematoksilen eozin (H&E) ve fibrozisi degerlendirmek amacıyla Masson Trikrom histokimyasal yöntemi ile boyanmıştır.

Fibrozisin ve periportal inflamasyonun histopatolojik değerlendirmesi aşağıdaki tablolara göre yapılmıştır (62) (Tablo 2 ve Resim 5).

Tablo 2: Hepatik fibrozisin histopatolojik sınıflaması

Histopatoloji	Skor
İnflamasyon yok	0
Portal fibrozis	1
Septal fibrozis	2
İnkomplet siroz	3
Komplet siroz	4



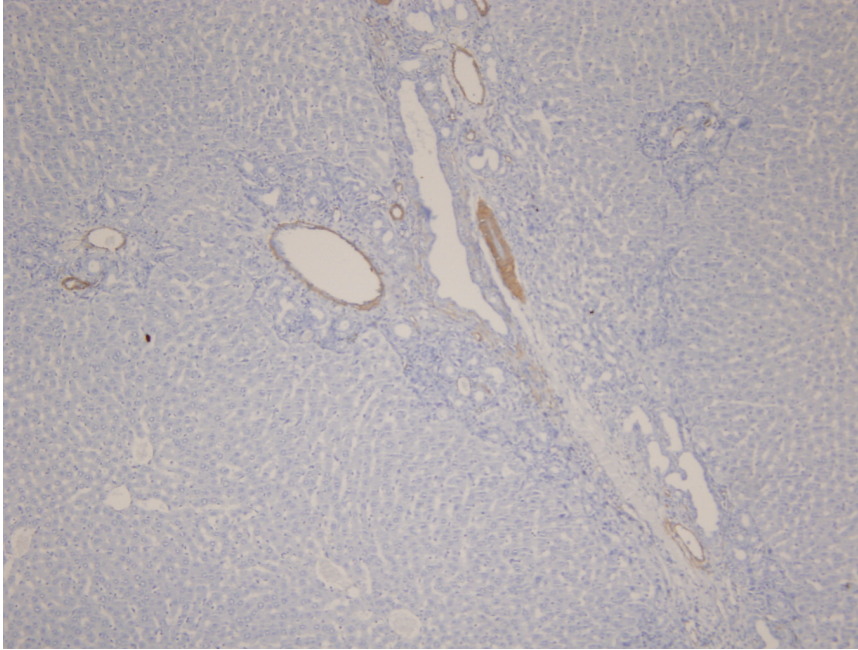
Resim 5: Masson Trikrom ile boyanmada normal histolojik yapılar (skor 0) (MT, x100)

Periportal inflamasyon histopatolojik olarak inflamasyon var veya yok diye değerlendirilmiştir.

Her preparatta α -SMA pozitif hücrelerin sayısının skorlaması yapıldı. Her preparatta rastgele seçilen 10 alanda şu şekilde skorlama yapıldı (63) (Tablo 3 ve Resim 6).

Tablo 3: α -SMA'nın immunohistokimyasal skorlaması

α -SMA skorlaması	Skor
Pozitif reaksiyon yok	0
Hepatik stellat hücrelerin %10'undan azında boyanma var	1
Hepatik stellat hücrelerin %11-20'sinde boyanma var	2
Hepatik stellat hücrelerin %21-40'ında boyanma	3
Hepatik stellat hücrelerin >%40'ında boyanma	4



Resim 6: α -SMA ile hepatik stellat hücrelerin %11-20'sinde boyanmanın gösterilmesi (skor 2) (SMA, x200)

3.4. İstatiksel Analiz

Tanımlayıcı değerler; median, minimum (min.), maksimum (max.), frekans ve yüzde şeklinde sunuldu.

Gruplar arasındaki ölçümsel değişkenlerin farklılığı Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. İkili kıyaslamalar Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Anlamlılık sınırı $p < 0,0167$ olarak alındı.

Kategorik değişkenler Fisher kesin olasılık testi ile değerlendirildi. Anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak alındı.

Analizler SPSS 21 paket programında yapıldı

4. BULGULAR

Çalışma süresince her gruptan 7 hayvan olmak üzere toplam 21 hayvan kullanıldı. Gerek kontrol grubunda, gerekse deney gruplarında ölen hayvan olmadı.

Deney grubunda AST ortalama 142,86 U/L (min:78, max:263, median:96); ALT ortalama 69,57 U/L (min:46, max:126, median:53); ALP değerleri ortalama 95,29 U/L (min:42, max:194, median:95); total bilirubin değerleri ortalama 0,15 mg/dL (min:0,06, max:0,31, median:0,09); direk bilirubin ortalama 0,1 mg/dL (min:0, max:0,3, median:0) olarak bulundu (Tablo 4).

Tablo 4: Deney grubundaki sıçanların AST, ALT, ALP, total bilirubin, direk bilirubin, hepatik fibrozis, α -SMA ve periportal inflamasyon değerleri

Denek No	AST	ALT	ALP	T.Bil	D.Bil	Hepatik Fibrozis	α -SMA	Periportal İnflamasyon
1	78	46	48	0,09	0	1	1	Yok
2	93	48	95	0,09	0	2	1	Yok
3	96	48	95	0,09	0	0	1	Yok
4	95	74	102	0,07	0	1	1	Var
5	133	53	42	0,06	0	0	1	Yok
6	242	90	134	0,28	0,2	2	2	Var
7	263	126	194	0,31	0,3	2	2	Yok
Ortalama	142,86	69,57	95,29	0,15	0,1	1,14	1,28	

Kontrol grubunda AST ortalama 214,71 U/L (min:118; max:377; median:210); ALT ortalama 66 U/L (min:48; max:123; median:53); ALP ortalama 160 U/L (min:46; max:280; median:150); total bilirubin ortalama 3,92

mg/dL (min:0,12; max:11,8; median:2,9); direk bilirubin ortalama 3,6 mg/dL (min:0,1; max:10,7; median:2,6) olarak bulundu (Tablo 5).

Tablo 5: Kontrol grubundaki sıçanların AST, ALT, ALP, total bilirubin, direk bilirubin, hepatik fibrozis, α -SMA ve periportal inflamasyon değerleri

Denek No	AST	ALT	ALP	T.Bil	D.Bil	Hepatik Fibrozis	α -SMA	Periportal İnflamasyon
1	118	50	150	0,17	0,1	3	2	Var
2	139	48	83	0,12	0,1	1	2	Var
3	143	60	46	0,15	0,1	3	2	Var
4	210	53	140	2,9	2,6	2	3	Var
5	219	79	180	4,9	4,6	3	2	Var
6	297	49	280	7,38	7	3	3	Var
7	377	123	241	11,8	10,7	2	3	Var
Ortalama	214,71	66	160	3,92	3,6	2,42	2,42	

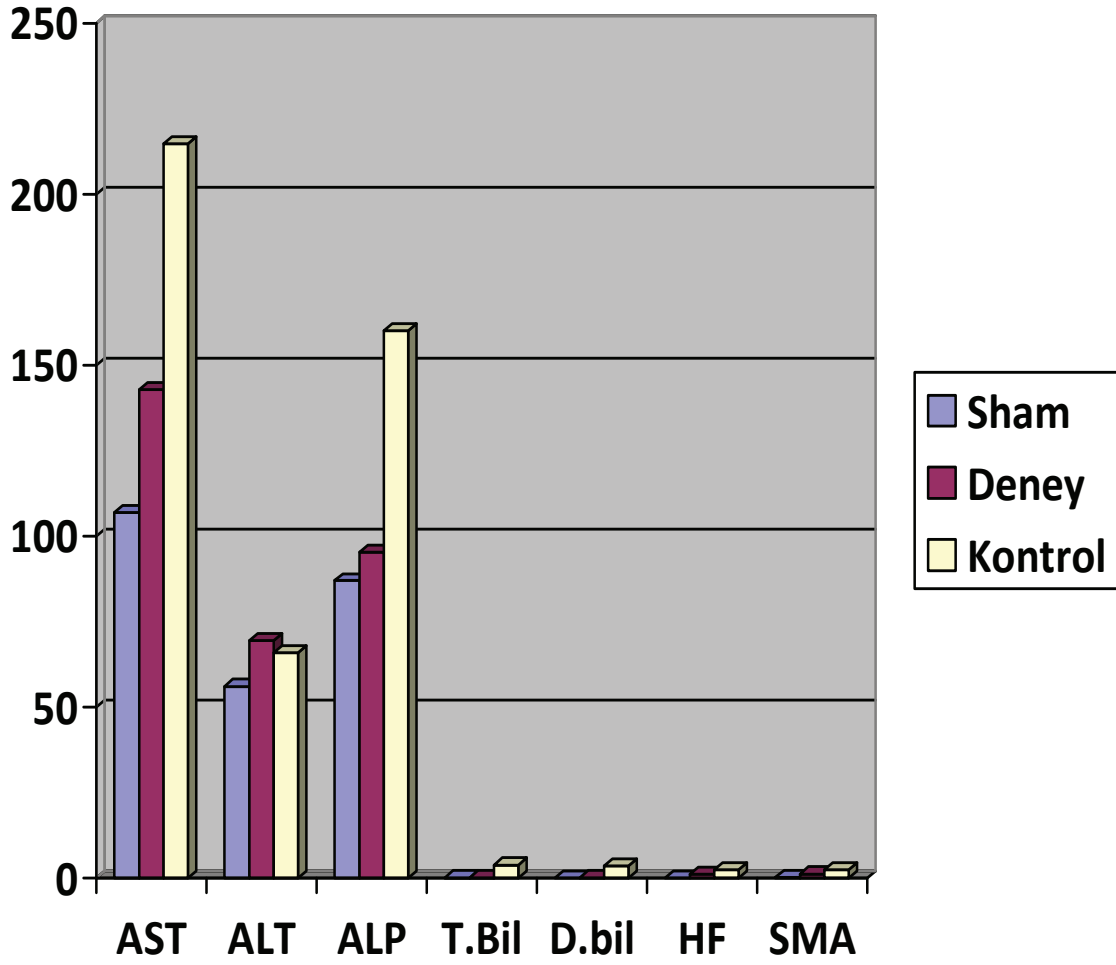
Sham grubunda AST ortalama 107 U/L (min:73; max:128; median:112); ALT ortalama 56,14 U/L (min:35; max:77; median:54); ALP ortalama 87 U/L (min:57; max:114; median:98); total bilirubin ortalama 0,09 mg/dL (min:0,07; max:0,12; median:0,08); direk bilirubin ortalama 0 mg/dL (min:0; max:0; median:0) olarak bulundu (Tablo 6).

Tablo 6: Sham grubundaki sıçanların AST, ALT, ALP, total bilirubin, direk bilirubin, hepatik fibrozis, α -SMA ve periportal inflamasyon değerleri

Denek No	AST	ALT	ALP	T.Bil	D.Bil	Hepatik Fibrozis	α -SMA	Periportal İnflamasyon
1	73	35	98	0,08	0	0	0	Yok
2	87	53	72	0,08	0	0	0	Yok
3	109	54	57	0,12	0	0	0	Yok
4	112	65	66	0,07	0	0	0	Yok
5	113	77	101	0,07	0	0	1	Yok
6	127	53	101	0,1	0	0	1	Yok
7	128	56	114	0,09	0	0	0	Yok
Ortalama	107	56,14	87	0,09	0	0	0,28	

Tablo 7: Grupların AST, ALT, ALP, total bilirubin, direk bilirubin, hepatik fibrozis ve α -SMA ortalamalarının karşılaştırması

Gruplar	AST	ALT	ALP	T.Bil	D.Bil	Hepatik Fibrozis	α -SMA
Sham	107	56,14	87	0,09	0	0	0,28
Deney	142,86	69,57	95,29	0,15	0,1	1,14	1,28
Kontrol	214,71	66	160	3,92	3,6	2,42	2,42



Şekil 7. Grupların AST, ALT, ALP, total bilirubin, direk bilirubin, hepatik fibrozis ve α -SMA ortalamalarının karşılaştırması

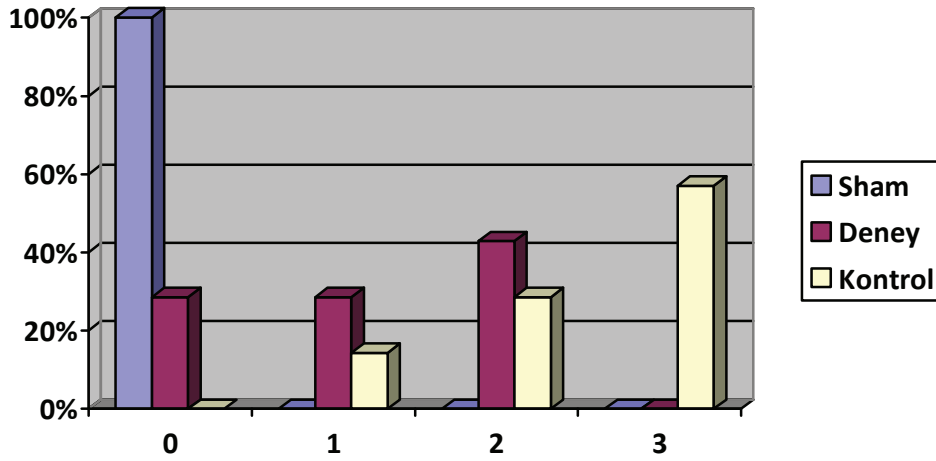
Deney, kontrol ve sham gruplarının birbirleriyle AST, ALT, ALP, total bilirubin ve direk bilirubin açısından karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan AST, total bilirubin ve direk bilirubin değerleri arasında fark bulunmuştur. Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testine göre sadece sham grubu ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0,0167$). Deney ve kontrol grubu birbiriyle karşılaştırıldığında total bilirubin ($p = 0,025$) ve direk bilirubinde ($p = 0,026$) anlamlılık sınırına yakın saptandı (Şekil 7).

Deney grubundaki sıçanların hepatik fibrozis değerleri incelendiğinde 2 sıçanda fibrozis saptanmadı (skor 0), 2 sıçanda portal fibrozis (skor 1), 3

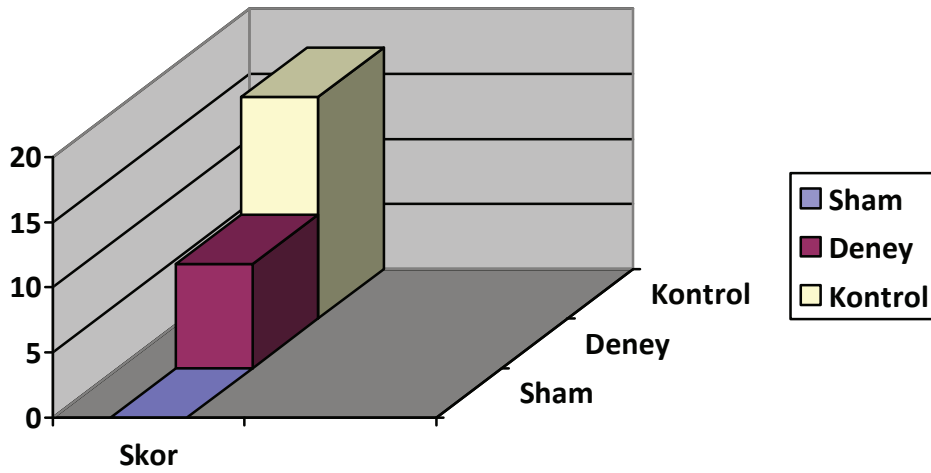
sıçanda septal fibrozis (skor 2) saptandı. Kontrol grubundaki sıçanların hepatik fibrozis değerleri incelendiğinde 1 sıçanda portal fibrozis (skor 1), 2 sıçanda septal fibrozis (skor 2), 4 sıçanda inkomplet siroz (skor 3) saptandı. Sham grubundaki sıçanların hepsinde normal histolojik bulgular saptandı (skor 0) (Tablo 8 ve Şekil 8).

Tablo 8. Grupların hepatik fibrozis skorlarının dağılımı

Gruplar	Fibrozis				Toplam
	0 n=9 %	1 n=3 %	2 n=5 %	3 n=4 %	
Sham	7 (%100)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	7 (%100)
Deney	2 (%28,6)	2 (%28,6)	3 (%42,9)	0 (%0)	7 (%100)
Kontrol	0 (%0)	1 (%14,3)	2 (%28,6)	4 (%57,1)	7 (%100)



Şekil 8. Grupların hepatik fibrozis skorlarının yüzdesel dağılımı

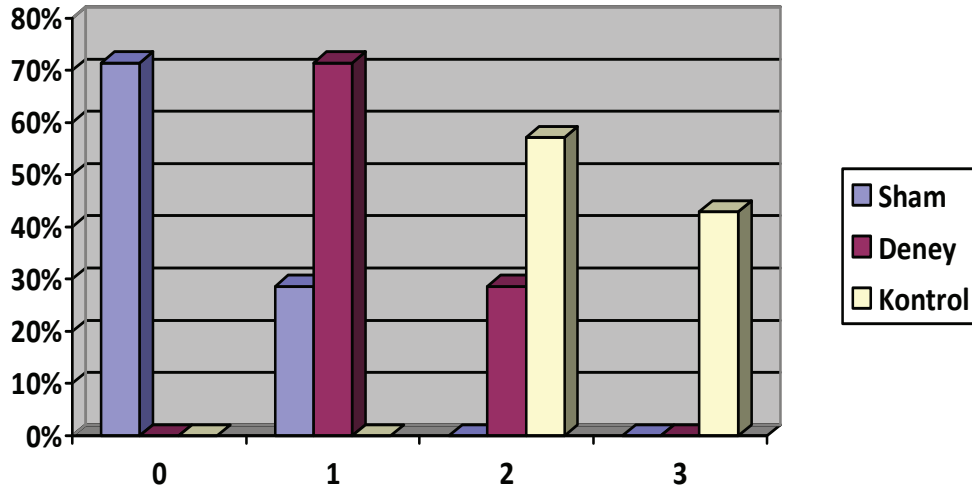


Şekil 9. Grupların toplam hepatik fibrozis skorları

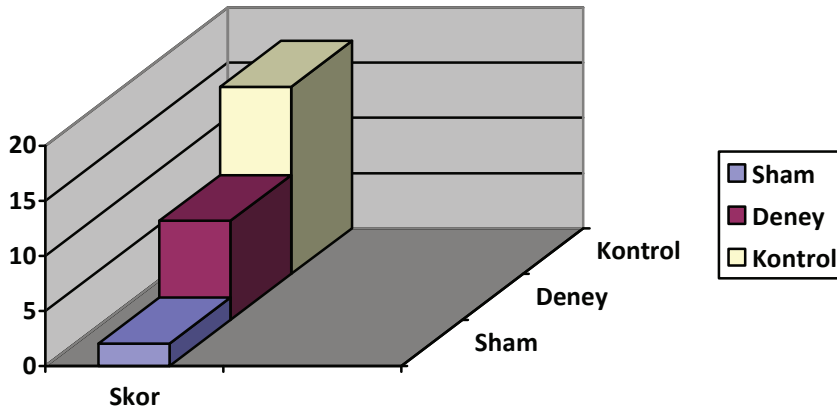
Deney grubundaki sıçanların α -SMA reaksiyonları değerlendirildiğinde 5 sıçanda hepatik stellat hücrelerin %10'undan azında boyanma (skor 1), 2 sıçanda hepatik stellat hücrelerin %11-20'sinde boyanma (skor 2) saptandı. Kontrol grubundaki sıçanların α -SMA reaksiyonları değerlendirildiğinde 4 sıçanda hepatik stellat hücrelerin %11-20'inde boyanma (skor 2), 3 sıçanda hepatik stellat hücrelerin %21-40'ında boyanma (skor 3) saptandı. Sham grubundaki sıçanların α -SMA reaksiyonları değerlendirildiğinde 5 sıçanda hepatik stellat hücrelerde pozitif boyanma saptanmadı (skor 0), 2 sıçanda hepatik stellat hücrelerin %10'undan azında boyanma (skor 1) saptandı (Tablo 9, Şekil 10 ve Şekil 11).

Tablo 9. Grupların α -SMA skorlarının dağılımı

Gruplar	α -SMA				Toplam
	0	1	2	3	
	n=5	n=7	n=6	n=3	n=21
	%	%	%	%	%
Sham	5 (%71,4)	2 (%28,6)	0 (%0)	0 (%0)	7 (%100)
Deney	0 (%0)	5 (%71,4)	2 (%28,6)	0 (%0)	7 (%100)
Kontrol	0 (%0)	0 (%0)	4 (%57,1)	3 (%42,9)	7 (%100)



Şekil 10. Grupların α -SMA skorlarının yüzdesel dağılımı

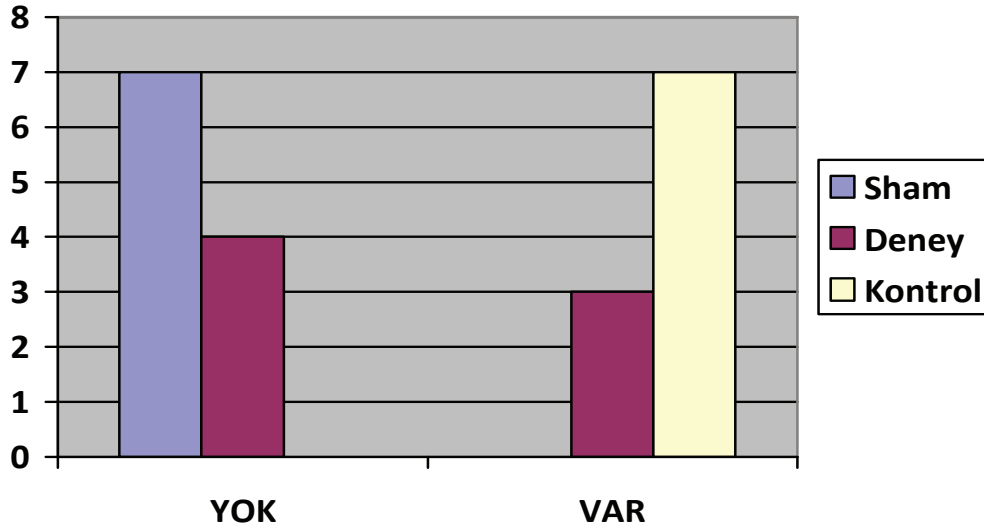


Şekil 11. Grupların toplam α -SMA skorları

Deney grubundaki sıçanların 5'inde periportal inflamasyon saptanmazken, 2 sıçanda periportal inflamasyon saptandı. Kontrol grubundaki sıçanların hepsinde periportal inflamasyon varken deney grubunda 3 sıçanda (%42,9) periportal inflamasyon saptandı. Sham grubundaki sıçanların hiçbirinde periportal inflamasyon saptanmadı (Tablo 10 ve Şekil 12).

Tablo 10. Grupların periportal inflamasyon değerleri

Gruplar	Periportal İnflamasyon		Toplam	
	Yok	Var		
	n=11 %	n=10 %	n=21 %	
Sham	7 (%100)	0 (%0)	7 (%100)	
Deney	4 (%57,1)	3 (%42,9)	7 (%100)	
Kontrol	0 (%0)	7 (%100)	7 (%100)	

**Şekil 12. Grupların periportal inflamasyon değerlerinin dağılımı**

5. TARTIŞMA

Karaciğer fibrozisinin progresyonunun yavaşlatılması ile kronik karaciğer hastalarında beklenen yaşam süresinin uzaması ve karaciğer transplantasyon ihtiyacının azalması sağlanabilir.

Karaciğer fibrozisi yapısal ve metabolik bozukluklara bağlı olarak ortaya çıkan patolojik bir durumdur ve çok sayıda faktör buna neden olabilmektedir. Hepatik stellat hücreler fibrozisin oluşmasında anahtar rol oynamaktadır. Aktifleşen bu hücreler miyofibroblast özelliği kazanmakta, kollojen tip 1 ve kollojen tip 3 artışı yanında ekstrasellüler matriks artışı da ortaya çıkmaktadır (64, 65).

Safra yolu obstruksiyonu ile birlikte safra tuzlarına bağlı karaciğer hasarı genellikle karaciğer disfonksiyonuna sebep olur ve ciddi morbidite ve mortaliteye yol açar (66, 67). Safra tuzlarının yol açtığı karaciğer hasarının mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Akut safra yolu tıkanıklıkları; kanaliküler kolestaz, safra duktus hücreleri proliferasyonu, portal traktus değişiklikleri, kronik süreçte ise periduktal bağ dokusu artışı ve fibröz tabakaların gelişimi ile sonuçlanır (36). Kolestatik karaciğer hasarında safra asitlerinin dokuda birikimi artmakta ve hepatositlerde safra akımı yavaşlayarak inflamasyonu tetiklemekte, bu da serbest oksijen radikallerini ve oksidatif hasarı artırmaktadır (66, 68).

Hepatik hasar ve fibrozisle sonuçlanan çeşitli karaciğer hastalıklarının patogenezinde serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksitler de rol oynamaktadır (69). Fizyolojik koşullarda organizma endojen veya ekzojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve buna bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan defans sistemine sahiptir. Serbest radikal oluşum hızı antioksidan sistemin yok etme gücünü aştığında ise bu denge bozulur ve

serbest radikallere bağlı oksidatif stres ortaya çıkar (70). Serbest oksijen radikallerinin sitotoksisite, mutagenez ve gen ekspresyonundaki değişiklikler ile sonuçlanan pek çok hüresel ve moleküler etkileri mevcuttur.

Safra yolu obstruksiyonu oluşturulan sıçanlarda portal alanda fibrozisin uyarıldığı, erken evrede safra kanal epitellerinin ve çevresindeki fibroblastların çoğaldığı ve inflamasyonun arttığı gösterilmiştir (71).

Hepatik fibrozis önceleri pasif ve geri dönüşümsüz kronik karaciğer hasarı olarak tanımlanırken, günümüzde fibrozisin dinamik bir süreç olduğu ve kısmen geri dönüşebilir olduğu kabul edilmektedir (72). Hepatik fibrozis, geri döndürülebilen dönemde tedavi edilirse başarı oranı yüksektir ve siroza gidiş nlenebilir. Buna rağmen karaciğer fibrozisin tedavisi için henüz hiçbir ilaç onaylanmamıştır.

Medikal uygulamalarda ozon O_2/O_3 karışımı şeklinde kullanılır. Son yıllarda medikal ozon kullanımı hızla yaygınlaşmaktadır. Günümüzde düşük doz ozon ile antioksidan enzimlerin, nitrik oksit yolunun ve diğer hüresel aktivitelerin düzenlenebileceği kanıtlanmıştır ve birçok patolojik durumda ozonun şaşırtan etkileri grlmştir (73). Medikal ozon uygulanan hastaların tedaviye verdiği yanıtlardaki farklılıklar ve standardize edilmiş çalışmaların yapılmaması nedeniyle terapötik bir ajan olarak sınıflamasını zorlaştırmaktadır (74). Bununla birlikte, insan ve hayvanlardaki ozon kullanımının tartışmaları halen devam etmektedir. Özellikle yüksek doz kullanımında serbest radikal oluşumundaki artışa bağlı ortaya çıkan yan etkiler ve inhalasyon yolu ile verildiğinde ise respiratuar sistemdeki irritan etkileri bu tartışmada önemli rol oynamaktadır (75, 76).

Kılıç B. yaptığı çalışmada sıçanlarda yanık sonrası uyguladığı ozon tedavisinde bakteriyel translokasyonu azalttığını saptamıştır (77).

Gül H. ve arkadaşları yüksek doz asetaminofen verilen sıçanlarda intraperitoneal ozon tedavisinin oksidatif stresi azaltarak AST, ALT değerlerini düşürdüğünü saptamışlardır. Yine bu çalışmada mitokondriyal hasarın engellenmesi ve inflamatuvar yolların yeniden düzenlenmesi üzerinden ozonun karaciğer histolojisi üzerinde olumlu etkisi olabileceği düşünülmüş (78).

Ajamieh ve arkadaşları hepatik iskemi-reperfüzyon modelinde ozon tedavisinin nitrik oksit sentetaz (NOS) ekspresyonu sonucu NO salınımını artırarak AST, ALT'yi düşürdüğünü ve lipid peroksidasyonunu engelleyerek karaciğer hasarını engellediğini saptamışlar (7).

Gültekin ve arkadaşları iyonize radyasyonun oksidatif stres üzerinden doku hasarı yapmasını ozon terapi ile engelledikleri çalışmada ozon terapinin lipid peroksidasyonunu ve serbest oksijen radikallerinin karaciğer üzerine olan etkisini azalttığını saptamışlar (79).

Bizim çalışmamızda da AST, ALP, total bilirubin ve direk bilirubin değerlerinde düşüş saptamakla beraber deney ve kontrol grupları karşılaştırıldığında sadece total bilirubin seviyesinde Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testinde anlamlılık sınırı olan $p < 0,0167$ 'ye yakın değer olan $p = 0,025$ bulduk. Denek sayısının azlığından dolayı diğer parametrelerde anlamlı sonuca ulaşılamadı ancak AST ve ALP değerlerinin deney grubunda kontrol grubuna göre belirgin düşük saptadık. Denek sayısının artırılması ile çalışmanın tekrarlanması halinde anlamlı sonuca ulaşacağımızı düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, sıçan karaciğerlerinin histopatolojik incelenmesinde hepatik fibrozisin ve periportal inflamasyonun deney grubunda daha düşük olduğunu saptadık. Kontrol grubundaki sıçanların %57,1'inde inkomplet siroz saptanırken, deney grubunda siroza rastlanmadı. Deney grubundaki sıçanların %42,9'unda periportal inflamasyon varken bu oran kontrol grubunda %100 olarak bulundu.

Aksu ve arkadaşları metilen mavisinin safra yolu bağlanmış sıçanlarda koruyucu etkinliğini çalışmışlar ve metilen mavisi verilen grupta α -SMA pozitifliğinin azaldığını göstermişlerdir (80).

Bizim çalışmamızda da immunohistokimyasal olarak kontrol grubunda vasküler düz kas hücrelerinde, sinüzoidlerde, fibrotik septalar ve proliferatif safra duktuslarında α -SMA ile pozitif reaksiyon izlenmiştir. Ozon verilen grupta pozitif α -SMA reaksiyonunda belirgin azalma olduğu saptandı.

Sonuç olarak daha önceki çalışmalarda ozonun hepatik iskemi-reperfüzyon modelinde ve asetaminofen verilen sıçanlarda karaciğer hasarını azalttığı gösterilmesine rağmen tıkanma sarılığı modelinde ozonun etkisi araştırılmamıştır. Bu çalışmada tıkanma sarılığı modelinde ozonun karaciğer hasarı üzerine etkilerini araştırdık. Çalışmamızda ozonun tıkanma sarılığı modelinde karaciğeri koruyucu etkisi tam olarak açıklanamasa da hepatik fibrozisi, periportal inflamasyonu ve hepatik stellat hücrelerin α -SMA ile pozitif reaksiyonunu azalttığını; karaciğer harabiyetini gösteren AST, ALP, total bilirubin ve direk bilirubin değerlerinde düşüş yaptığını saptadık. Ozonun bu koruyucu etkisi muhtemelen antioksidan sistemi aktive ederek, doku oksijenizasyonu arttırarak, NO salınımı arttırarak, oksidatif stresi ve lipid peroksidasyonunun karaciğer üzerine olumsuz etkisini azaltarak, mitokondriyal hasarı engelleyerek, immunomodülatör etkisinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bundan sonraki çalışmamızda immunomodülatör etki yönünden bir çalışma yapmayı planlamaktayız.

Çocukluk çağında hepatik fibrozisle sonuçlanan bilyer atrezi, koledok kisti, primer bilyer siroz, kolanjit gibi hastalıkların tedavisinde ozonun karaciğer harabiyetini azaltacağını ve gerektiğinde karaciğer transplantasyonunu geciktireceğini düşünmekteyiz. Ancak klinik kullanım ve anlamlı sonuç için daha fazla sıçanla çalışılması gerekmektedir.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda safra yolu obstruksiyonu oluşturulan sıçanlarda hepatik fibroziste ozon tedavisinin rolü araştırılmıştır.

- 1- Sıçanlara laparotomi yapılarak koledoku bağlandığında sıçan karaciğerinde hepatik fibrozis oluşmuştur.
- 2- Biyokimyasal olarak AST, ALP, total bilirubin, direk bilirubin değerleri rektal ozon uygulanan grupta kontrol grubuna göre düşük saptandı.
- 3- Histopatolojik olarak hepatik fibrozis ve periportal inflamasyon rektal ozon uygulanan grupta kontrol grubuna göre daha düşük saptandı.
- 4- α -SMA ile boyanma rektal ozon uygulanan grupta kontrol grubuna göre daha düşük saptandı.
- 5- Ozonun gösterilen etkisini açıklayıcı nedenlere yönelik çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

- 1- Sokol RJ, Devereaux M, Khandwala RA. (1991): Effect of dietary lipid and vitamin E on mitochondrial lipid peroxidation and hepatic injury in the bile duct-ligated rat. *Lipid Res*; 32: 1349–1357.
- 2- Gonzalez-Correa JA, De La Cruz JP, Martin-Aurioles E, Lopez- Egea MA, Ortiz P, Sanchez de la Cuesta F. (1997): Effects of Sadenosyl- L-methionine on hepatic and renal oxidative stres in an experimental model of acute biliary obstruction in rats. *Hepatology*; 26: 121–127.
- 3- Tomioka M, Iinuma H, Okinaga K. (2000): Impaired Kupffer cell function and effect of immunotherapy in obstructive jaundice. *J Surg Res*; 92: 276.
- 4- Parola M, Leonarduzzi G. (1996): On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Radic Biol Med*; 20: 351.
- 5- Maher JJ, McGuire RF. (1990): Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. *Journal of clinical investigation*; 8: 1641-1648
- 6- Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. (1984): Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *British journal of experimental pathology*; 65: 305-311
- 7- Ajamieh HH, Menéndez S, Martínez-Sánchez G, Candelario-Jalil E, Re L, Giuliani A, et al. (2004): Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia reperfusion. *Liver Int*; 24(1): 55-62.
- 8- Peralta C, Leon OS, Xaus C, Prats N, Jalil EC, Planell ES, et al. (1999): Protective effect of ozone treatment on the injury associated with hepatic ischemia reperfusion: antioxidant-prooxidant balance. *Free Radic Res*; 31(3): 191- 196.

- 9- Ozan H. Karaciğer. In: Ozan H. (Ed) (2004): Ozan Anatomi. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi
- 10-Ratych ER, SmithWG. (1996): Anatomy and physiology of the liver. George D. Zuidema GE (Eds). Surgery of the Alimentary Tract, Fourth Edition. Philadelphia: W.B Saunders Company; 357-74.
- 11-Kadioğlu M. B. (2005): Tıkanma sarılığı oluşturulan modelde ursodeoksikolik asit ve glutaminin bakteriyel translokasyon, karaciğer fonksiyon testleri ve karaciğer histopatolojisine olan etkileri. Uzmanlık Tezi. S. B. Kartal Eğitim ve Araştırma Hast.
- 12- Roshal M, Zhu Y, Planelles V. (2001): Apoptosis in AIDS. Apoptosis; 6: 103–116.
- 13-Williams P, Warwick R, Dyson M, Bannister LH. Gray's Anatomy. 37th ed. (1992): Edinburgh: Churchill Livingstone; chapter 11: p.1384-96.
- 14-Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. (2005): J Clin Invest;115:209-31.
- 15-Abraham L, Kierszenbaum MD (Çeviri: R. Demir) (2006): Histoloji ve Hücre Biyolojisi 1.baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 447-74.
- 16- Eroscheno VP (Çeviri: R. Demir) (2000): Di Fiore Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle Ankara: Palme Yayıncılık; 219-25.
- 17-Şentürk H. Serbest radikal hasarının hepato-biliyer sistem hastalıklarındaki rolü. Kocatepe Tıp Dergisi 2004; 5: 1–8.
- 18-Tekelioğlu M. (2002): Özel Histoloji, İnce Yapı ve Gelişme. Ankara, Antıp A.Ş; 79-86.
- 19-Junqueira LC, Carneiro J, RO Kelley, (1998): Temel Histoloji, Aytekin Y (Çeviri editörü), Barış Kitapevi; 16: 307-22.
- 20-Müslümanoğlu M. (2002): Safra kesesinin selim hastalıkları: Genel cerrahi/ İ.Ü.T.F. temel ve klinik bilimler ders kitapları; cilt II,sf 1177.
- 21-Aran Ö: (1996): Safra yolları hastalıkları. Sayek İ.(ed)Temel cerrahi; cilt 2: 1299

- 22-Januire LC, Carneio J, Long JA: (1996): Digestive Tract Basic Histology Fifth Edition, California; 354-379.
- 23-Erlinger S. (1987): Physiology of bile secretion and enterohepatic circulation. Physiology of the Gastrointestinal Tract, Second edition, edited by Leonard R. Jhonson. Reven Press, New York, Chapter 57, pp:1557-1580
- 24- Thews G., Vaupel P. (1985): Autonomic function in human physiology, Springer-Verlag, NY; pp:244-245
- 25-Guyton AJ, Hall JE (Çeviri: H. Çavuşoğlu). (2001): Tıbbi Fizyoloji, 10. Baskı. İstanbul: Nobel; 724-52.
- 26-Andreoli TE, Bennett JC, Carpenter JC. (Çeviri: S. Mısırlıoğlu) (1995): Sarılık, bilirubin metabolizması bölüm 40: Cecil Essentials Of Medicine. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; p.323.
- 27-Yüzen Y, Öncel T, Engin S, Aldemir S, Akyıldız A. (1993): Tıkanma sarılıklarında mortalite ve morbiditeyi etkileyen faktörler. Ulusal Cerrahi Derg; 9: 238-43.
- 28-Batman F,Arslan S: (1996): Karaciğer fizyolojisi. Sayek İ.(ed). Temel cerrahi; cilt 2: 1205.
- 29-Gitnick G. (1990) Hepatitis (review). Scand J Gastroenterol Suppl; 175:113-7.
- 30-Tygstrup N. (1990): Assesssment of liver function: principles and practice. J Gastroenterol Hepatol; 5(4):468-82,
- 31-Schwartz SI. Liver. In: Sielaff TD, Curley SA (Ed.) (2004): Principles of Surgery. 8 rd edition. McGraw-Hill, Philadelphia, USA, pp. 1139-87.
- 32-Lambou-Gianoukos S, Heler SJ. (2008): Lithogenesis and metbolism. Surg Clin North Am; 88(6):1175-94.
- 33-Scott-Conner CE, Grogan JB. (1994): Serum and cellular factors in murine obstructive jaundice. Surg; 115(1):77-84.

- 34-Maingot's abdominal operations. In: Kahng KU, Roslyn JJ, Zinner MJ (Eds). (1997); 1: 315-51.
- 35-Mishra JP, Singh LN. (1996): Changes in serum protease inhibitors and liver specific enzymes in experimental jaundice. Indian J Med Sci; 50: 221-7.
- 36-Lee RG. (1994): Diagnostik liver pathology: Cholestasis an biliary obstruction. Mosby Company; Chapter 4. s. 81-107,
- 37-Endo M, Katsuoda K, Yokoyama J, et al (1983): Extended dissection of the porta hepatis and creation of an intussuscepted ileocolic conduit for biliary atresia. J Pediatr Surg; 18: 784-793.
- 38-Nychytailo MIu, Malyk SV. (2004): Biochemical markers in diagnosis and prognosis of obstructive jaundice. Klin Khir; 8: 13-18.
- 39-Valenzuela A. (1991): The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. Life Sci; 48: 301-9.
- 40-Ramadori G, Veit T, Schwögler S, Dienes HP, Knittel T, Rieder H et al. (1990): Expression of the gene of the α - smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells. Virchows Archiv B Cell Pathol; 59: 349-57
- 41-Poli G. (2000): Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. Mol Aspects of Med; 21: 49-98.
- 42-Bortolotti F, Guido M. (2007): Reversal of liver cirrhosis: a desirable clinical outcome and its pathogenic background. J Pediatr Gastroenterol Nutr; 44(4):401-6.
- 43-Friedman SL. In Diseases of the Liver. In: Schiff E, Sorrell M, Maddrey W (Eds). (1998): Philadelphia: Lippincott-Raven; p.371-86.
- 44-Williams P, Warwick R, Dyson M, Bannister LH. Gray's Anatomy. (1992): 37th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, Chapter 11; p.1384-96.

- 45-Friedman SL. (2000): Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*; 275: 2247–50.
- 46-Mishra JP, Singh LN. (1996): Changes in serum protease inhibitors and liver specific enzymes in experimental jaundice. *Indian J Med Sci*; 50: 221-7.
- 47-Renate Viebahn-Haensler (2005): Ozonun tıpta kullanımı, İngilizce 4. baskıdan (2002) çeviri, 1. Türkçe baskı
- 48-Viebahn-Haensler R. (2006): Ozonun Tıpta Kullanımı. 4. Baskı, İstanbul, Yelken Basım
- 49-Rilling S: (1985): The basic clinical applications of ozone therapy. *Ozonachrichten*; 4: 7-17.
- 50- Briccoli A. (1991): Ozone in the treatment of drinking water. Monaco, International Ozone Association
- 51-Remirez D, González R, Merino N, Rodriguez S, Ancheta O. (2002): Inhibitory effects of *Spirulina* in zymosan-induced arthritis in mice. *Mediators Inflamm*; 11: 75-79.
- 52-Nathan C. (2002): Immunology. Catalytic antibody bridges innate and adaptive immunity; *Science*; 298: 2143-2144.
- 53-Wentworth P Jr, McDunn JE, Wentworth AD, Takeuchi C, Nieva J, Jones T, Bautista C, Ruedi JM, Gutierrez A, Janda KD, Babior BM, Eschenmoser A, Lerner RA. (2002): Evidence for antibodycatalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science*; 298: 2195-2199.
- 54-Bocci V. (2007): Tropospheric ozone toxicity vs. usefulness of ozone therapy. *Arc Med Res*; 38: 265-267.
- 55-Valacchi G, Fortino V, Bocci V. (2005): The dual action of ozone on the skin. *Br J Dermatol*; 153: 1096-1100.

- 56-Guven A, Gundogdu G, Sadir S, Topal T, Erdogan E, Korkmaz A, Surer I, Ozturk H. (2008): The efficacy of ozone therapy in experimental caustic esophageal burn. *J Pediatr Surg*; 43: 1679-1684.
- 57-Young IS, Woodside JV. (2001): Antioxidants in health and disease, *J Clin Pathol*; 54: 176-186.
- 58-Word RJ, Peters TJ. Free radicals. Kaplan LA, Pesce AJ (Eds). (1996): *Clinical Chemistry*. 3th ed. St. Louis, Mosby Inc; 765-777.
- 59-Di Paolo N, Bocci V, Garosi G, Borrelli E, Bravi A, Bruci A, Aldinucci C, Capotondo L. (2000) Extracorporeal blood oxygenation and ozonation (EBOO) in man. *Int J Artif Organs*; 23: 131-41.
- 60-Bocci V, Aldinucci C. (2004): Rational bases for using oxygen-ozonotherapy as a biological response modifier in sickle cell anemia and β -thalassemia: A therapeutic perspective. *J Biol Regul Homeost Agents*; 18: 38-44.
- 61-León OS, Menéndez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Pérez L, Cruz E, Bocci V. (1998): Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. *Mediators inflamm*; 7: 289-294.
- 62-Demirbilek S, Tas E, Gurunluoglu K, Akin M, Aksoy RT, Emre MH, Aydin NE, Ay S, Ozatay N. (2007): Fluvastatin reduced liver injury in a rat model of extrahepatic cholestasis *Pediatr Surg Int*;23(2):155-62. Epub 2006 Nov 4.
- 63- Schmitt-Gräff A, Krüger S, Bochard F, Gabbiani G, Denk H. (1991): Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. *Am J athol*; 138(5): 1233-42.
- 64-Li CH, Pan LH, Yang ZW, Li CY, Xu WX. (2008): Preventive effect of Qianggan-Rongxian Decoction on rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol*; 14: 3569-73.

- 65- Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? (2000): Gut; 46: 443-6.
- 66-Chuang JH, Chang NK, Huang CC, Lo SK, Wang HC, Chen CM, Wu CL, Chou MH, Lin TK. (2004): Biliary intervention augments chemotactic reaction and aggravates cholestatic liver injury in rats. J Surg Res; 120(2): 210–218.
- 67-Kismet K, Sabuncuoglu MZ, Kilicoglu SS, Kilicoglu B, Devrim E, Erel S, Sunay AE, Erdemli E, Durak I, Akkus MA. (2008): Effect of propolis on oxidative stress and histomorphology of liver tissue in experimental obstructive jaundice. Eur Surg Res; 41(2):231–237.
- 68-Padillo FJ, Cruz A, Navarrete C, Bujalance I, Briceño J, Gallardo JI, Marchal T, Caballero R, Túnez I, Muntané J, Montilla P, Pera-Madrado C. (2004): Melatonin prevents oxidative stress and hepatocyte cell death induced by experimental cholestasis. Free Radic Res; 38(7):697–704.
- 69-Kaçmaz B, Öğüs E, Pasaoğlu H, Kılınç D, Tülek N, Bakır F. (2001): Akut ve kronik viral hepatitli hastalarda lipid peroksidasyonu ve oksidasyona direncin incelenmesi. Viral Hepatit Dergisi; 7: 374–8.
- 70-McCord JM. (1993): Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. Clin Biochem; 26: 351-357.
- 71-Aronson CD, De Haan J, James J. (1988): Quantitative aspects of the parenchymal-stroma relationship in experimentally induced cholestasis. Liver; 8: 116–26.
- 72-Türkdoğan MK, Ozbek H, Yener Z, Tuncer I, Uygan I, Ceylan E. (2003) The role of *Urtica dioica* and *Nigella sativa* the prevention of carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. Phytother Res; 17: 942–6.
- 73-Re L, Mawsouf MN, Menendez S, Leon OS, Sanchez GM, Hernandez F. (2008): Ozone therapy: Clinical and basic evidence of it's therapeutic potential. Arch Med Res; 39: 17-26.

- 74-Bocci V. (2006): Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art Archives of Medical Research; 37: 425-435.
- 75-Pryor WA. (1994): Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. Free Radic Biol Med; 17: 451-465.
- 76-Bhalla DK, Gupta SK, Reinhart PG. (1999): Alteration of epithelial integrity, alkaline phosphatase activity, and fibronectin expression in lungs of rats exposed to ozone. J Toxicol Environ Health A; 57: 329-343.
- 77-Kılıç B. (2013): Sıçanlarda yanık sonrası oluşan bakteri translokasyonuna ozon tedavisinin etkisi. Uzmanlık Tezi. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi AB Dalı.
- 78-Gul H, Uysal B, Cakir E, Yaman H, Macit E, Yildirim AO, Eyi YE, Kaldirim U, Oztas E, Akgul EO, Cayci T, Ozler M, Topal T, Oter S, Korkmaz A, Toygar M, Demirbag S. (2012): The protective effects of ozone therapy in a rat model of acetaminophen-induced liver injury. Environ Toxicol Pharmacol; 34(1): 81-6.
- 79-Gultekin FA, Bakkal BH, Guven B, Tasdoven I, Bektas S, Can M, Comert M. (2013): Effects of ozone oxidative preconditioning on radiation-induced organ damage in rats. J Radiat Res; 54(1): 36-44.
- 80-Aksu B, Umit H, Kanter M, Guzel A, Aktas C, Civelek S, Uzun H. (2010): Effects of methylene blue in reducing cholestatic oxidative stress and hepatic damage after bile-duct ligation in rats. Acta Histochem; 112(3): 259-69.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Osman Hakan Kocaman

Adres : Seyit Ömer Mah. Keresteci Veli Sok. Kardeşler Apt.
No:41/11

Fatih/İSTANBUL

Telefon : 0 532 633 60 04

E-posta : drhakankocaman@yahoo.com

Doğum Yeri : Konya

Doğum Tarihi : 06/08/1983

Görev Yerleri :

2007-2013: İstanbul Üniveritesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi
Anabilim Dalı

Eğitim Bilgileri :

2001-2007: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi

2007-2013: İstanbul Üniveritesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi
Anabilim Dalı

Yabancı Dil : İngilizce