



T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METOTREKSAT HEPATOTOKSİTESİNDE BOR VE
B17 VİTAMİNİ UYGULAMASI SONRASI HİSTOLOJİK
DEĞİŞİKLİKLER VE SERUM TİYOL-DİSÜLFİT
DENGESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Andaç KİPALEV NEŞELİOĞLU

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

Ankara, 2021

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METOTREKSAT HEPATOTOKSİTESİNDE BOR VE
B17 VİTAMİNİ UYGULAMASI SONRASI HİSTOLOJİK
DEĞİŞİKLİKLER VE SERUM TİYOL-DİSÜLFİT
DENGESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Andaç KİPALEV NEŞELİOĞLU

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

Ankara, 2021

TEŞEKKÜR

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Ve Embriyoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisansım boyunca yanımda olan, tezime başlarken beni özgür bırakan, bilimsel konularda yol gösteren, yaşam tarzımı bilimsel yönde geliştirmemi sağlayan, bana güvenen sayın Danışman Hocam Prof. Dr. H. Meltem ÖZGÜNER'e

Hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, tezim boyunca beni yönlendiren ve hiç yalnız bırakmayan sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Hilal NAKKAŞ'a,

Tezime destek veren değerli hocam Prof. Dr. Oya EVİRGEN'e,

Ayrıca kendimi şanslı hissetmemi sağlayan, hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet Çevik TUFAN'a ve Prof. Dr. Sevil ÇAYLI'ya,

Tezimde desteğini esirgemeyen eşim Doç. Dr. Salim NEŞELİOĞLU'na ve Prof. Dr. Özcan EREL'e

Tezim boyunca beni hiç yalnız bırakmayan ve tezimde çok emeği olan bölüm arkadaşım Gülben AKCAN'a,

Her zaman yanımda olduklarını hissettiren tüm sevgili bölüm arkadaşlarıma,

Daima desteklerini hissettiğim annem'e, babam'a, bana güç veren canım oğlum'a ve eşim'e, her zaman sevgilerini hissettiren, desteklerini esirgemeyen, yanımda bulunan tüm güzel insanlara,

Sonsuz teşekkürlerimle...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Karaciğer Anatomisi	3
2.1.2. Lobları.....	3
2.1.3. Damarları	5
2.2. Karaciğer Embriyolojisi	6
2.3. Karaciğer Histolojisi	7
2.3.1. Stroma.....	9
2.3.2. Karaciğerin Kan Dolaşımı	10
2.3.3. Parankima	12
2.3.4. Hepatositlerin Histolojik Özellikleri.....	15
2.3.5. Hepatositlerin Sitolojik Özellikleri.....	16
2.3.6. Sinüzoid	18
2.3.7. Karaciğerin Yenilenmesi (Rejenerasyon).....	19
2.4. Karaciğer Fizyolojisi.....	19
2.4.1. Karaciğer Fonksiyonları	19
2.5. Karaciğer Enzimleri	23
2.5.1. Aminotransferazlar (AST, ALT)	23
2.5.2. Alkalen fosfataz (ALP).....	23

2.5.3. Gama glutamil transferaz (GGT).....	24
2.5.4. Laktat Dehidrogenaz (LDH).....	24
2.5.5. 5’Nükleotidaz.....	24
2.6. Metotreksat (MTX).....	24
2.7. B17 Vitamini (Amigdalın).....	26
2.8. Borik Asit (BA).....	28
2.9. Oksidan ve Antioksidan Sistemler.....	31
2.9.1. Serbest Radikaller.....	31
2.9.2. Antioksidan Sistemler.....	32
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	36
3.1. Histolojik Yöntemler.....	36
3.2. Dokuları Histolojik İncelemeye Hazırlama	36
3.3. Histolojik Boyama Yöntemleri	39
3.3.1. Hematoksilen	39
3.3.2. Eozin	40
3.3.3. Masson Trikrom.....	40
3.6. Biyokimyasal Yöntemler	47
3.6.1. Çalışılan Parametler.....	47
3.6.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	47
3.6.3. Cihazlar.....	47
3.6.4. Yöntemler	48
4. BULGULAR.....	51
4.1. Gruplar	51
4.1.1. Grup 1 (Kontrol Grubu).....	51
4.1.2. Grup 2 (MTX).....	52

4.1.3. Grup 3 (BA)	53
4.1.4. Grup 4 (B17).....	54
4.1.5. Grup 5 (BA+B17)	55
4.1.6. Grup 6 (MTX+B17).....	56
4.1.7. GRUP 7 (MTX+BA)	57
4.1.8. GRUP 8 (BA+MTX)	58
4.2. Gruplararası Kıyaslama.....	60
4.2.1. Kontrol-MTX.....	67
4.2.2. Kontrol-MTX-BA.....	68
4.2.3. MTX-(MTX+BA)-(BA+MTX)	69
4.2.4. Kontrol-MTX-(MTX+B17).....	64
4.2.5. BA-B17-(BA+B17)	64
4.2.6. Kontrol-(MTX+BA)-(BA+MTX).....	66
4.2.7. (MTX+B17)-(MTX+BA)-(MTX+BA+B17).....	67
3.5. Skarlama	69
4.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları	75
4.3.1. Karaciğer Fonksiyon Testleri.....	76
4.3.2. Antioksidan Parametreler	77
4.3.3. Oksidan Parametreler.....	79
5. TARTIŞMA	83
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	99
7. KAYNAKLAR	92
8.EKLER.....	105
Ek-1. Etik Kurul Onay Formu.....	105
Ek-2. Özgeçmiş	119

ÖZET

Metotreksat Hepatotoksisitesinde Bor ve B17 Vitamini Uygulaması Sonrası Histolojik Değişiklikler ve Serum Tiyol-Disülfid Dengesinin Değerlendirilmesi

Amaç: Bir folik asit antagonisti olan metotreksat (MTX), bazı kanser türlerinin yanı sıra çeşitli inflamatuvar hastalıkların tedavisinde de kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır. Bu çalışmadaki amaç; MTX'ın hepatotoksik yan etkisine karşı Borik Asitin (BA) etkilerini ışık mikroskopik ve biyokimyasal düzeyde incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Her grupta 6 Erkek Wistar Albino rat olacak şekilde; kontrol, MTX, BA, B17, BA+B17, MTX+B17, MTX+BA, BA+MTX, MTX+BA+B17 olarak 9 gruba ayrıldı. Deneylerin 11. gününde tüm gruplardaki ratların karaciğer dokuları intraperitoneal (i.p) uygulanarak oluşturulan anestezi (75mg/kg ketamin + 10mg/kg xylazine) altında yapılan dekapitasyondan sonra midsagittal insizyonla hızlıca çıkarıldı. %10'luk formaldehit ile tespit edildi. Parafin bloklar hazırlandı ve bloklardan 4µm kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilen & Eozin (H&E) ve Masson Trichrom boyası ile boyandı. Olympus BX43 fotomikroskop ile incelenip fotoğraflandı ve skorelama yapıldı. Ayrıca ratların serumlarında çeşitli oksidan(disülfide, %disülfide/native thiol, MPO, LOOH) ve antioksidan(native thiol, total thiol, katalaz, albümin) karaciğer fonksiyon testleri ölçüldü. Çalışmada ölçülen tüm biyokimyasal testler Siemens ADVIA 1800 Oto Analizöründe (siemens healthcare GmbH, Erlangen, Germany) çalışıldı.

Bulgular: Işık mikroskopik incelemelerde MTX verilen rat karaciğerlerinde sinüzoidal dilatasyona, hepatosit dejenerasyonuna, vasküler konjesyon-tromboza, inflamatuvar infiltrasyon bulgularına rastlandı. Borik Asitin koruyuculuğunun tedavisinden daha etkili olduğu gözlemlendi. MTX verilen gruplarda lipid hidroperoksit, MPO ve disülfid gibi oksidatif stres ile ilişkili parametrelerin düzeyi arttı, buna karşılık native tiyol, total tiyol ve katalaz gibi antioksidan parametrelerin düzeyi azaldı.

Sonuç: Bu çalışmada metotreksat ile meydana gelen karaciğer hasarında, borik asitin koruyucu etkisinin tedavi edici etkisinden daha fazla olduğu belirlendi. Metotreksatın oluşturduğu oksidatif hepatotoksisite tiyol disülfid dengesini bozarak oksidasyon

lehine kaymasına sebep oldu. Bulgularımız ışığında MTX tedavisine başlamadan önce hastalara hem lipofilik hem de hidrofilik özelliklere sahip olan amfipatik tiyol donörleri (alfa-lipoik asit vb.) uygulanmasının MTX'ın yan etkilerini anlamlı düzeyde azaltacağı öngörülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Borik asit, disülfid, metotreksat, oksidatif stres, tiyol



ABSTRACT

Histological Changes After Boron and Vitamin B17 Application in Methotrexate Hepatotoxicity and Evaluation of Serum Thiol-Disulfide Balance

Objective: Methotrexate (MTX), a folic acid antagonist, is a chemotherapeutic drug used in the treatment of various inflammatory diseases as well as some types of cancer. The purpose of this study; To examine the effects of boric acid (BA) against the hepatotoxic side effect of MTX at light microscopic and biochemical level.

Materials and Methods: There will be 6 male Wistar Albino rats in each group; control was divided into 9 groups as MTX, BA, B17, BA + B17, MTX + B17, MTX + BA, BA + MTX, MTX + BA + B17. On the 11th day of the experiments, liver tissues of rats in all groups were removed rapidly by midsagittal incision after decapitation performed under anesthesia (75mg / kg ketamine + 10mg / kg xylazine) by intraperitoneal (i.p) application. It was fixed with 10% formaldehyde. Paraffin blocks were prepared and 4µm thick sections were cut from the blocks. It was stained with Hematoxylin & Eosin (H&E) and Masson Trichrom stain. It was examined and photographed with an Olympus BX43 photomicroscope. Scoring was done using the Score method. In addition, various oxidant (disulfide,% disulfide / native thiol, MPO, LOOH) and antioxidant (native thiol, total thiol, catalase, albumin) liver function tests were measured in the sera of the rats. All biochemical tests measured in the study were performed on the Siemens ADVIA 1800 Auto Analyzer (siemens healthycare GmbH, Erlangen, Germany).

Results: Light microscopic examinations revealed sinusoidal dilatation, hepatocyte degeneration, vascular congestion-thrombosis, and inflammatory infiltration in the liver of rats given MTX. It was observed that the sparing of boric acid was more effective than its treatment. In the groups given MTX, the level of oxidative stress-related parameters such as lipid hydroperoxide, MPO and disulfide increased, whereas the level of antioxidant parameters such as native thiol, total thiol and catalase decreased.

Conclusion: In this study, it was determined that the protective effect of boric acid was more than the therapeutic effect in liver damage caused by methotrexate. Oxidative hepatotoxicity caused by methotrexate disrupted the thiol disulfide balance

and caused it to shift in favor of oxidation. In the light of our findings, it was predicted that administering amphipathic thiol donors (alpha-lipoic acid, etc.) with both lipophilic and hydrophilic properties to patients before starting MTX treatment would significantly reduce the side effects of MTX.

Keywords: Boric acid, disulfide, methotrexate, oxidative stress, thiol



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MTX	: Metotreksat
BA	: Borik Asit
B17	: Amigdalın
Lig.	: Ligamentum
GER	: Granüllü Endoplazmik Retikulum
DHF	: Dihidrofolat
DHFR	: Dihidrofolat Redüktaz
LGL	: Büyük Granüllü Lenfosit
ALP	: Alkalen Fosfataz
GGT	: Gama Glutamil Transferaz
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
FH2	: Dihidrofolat
FH4	: Tetrahidrofolat
dUMP	: Deoksiuridilik Asit
dTMP	: Deoksitimidilik Asit
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Karaciğerin anterior görünümü	4
Şekil 2.2. Karaciğerin inferiyor görünümü	4
Şekil 2.3. Karaciğerin visseral yüz görünümü	5
Şekil 2.4. Karaciğerin vasküler dallanması	6
Şekil 2.5. Karaciğer Embriyolojisi.....	7
Şekil 2.6. Karaciğer histolojisi.....	8
Şekil 2.7. Üç boyutlu karaciğer görüntüsü.....	8
Şekil 2.8. Karaciğer Lobülü 1	10
Şekil 2.9. Karaciğer Lobülü 2	10
Şekil 2.10. Karaciğerdeki kan ve safra akış yönleri	11
Şekil 2.11. Karaciğer lobülünün histolojik sınıflandırılması	13
Şekil 2.12. Karaciğer lobülünün fonksiyonel sınıflandırılması	14
Şekil 2.13. MTX'in Dihidrofolat redüktazı inhibe etmesi.	26
Şekil 3.1. Blok hazırlama ve kesit alma.....	39
Şekil 4.1. Grup 1 ışık mikroskopik görüntüleme	52
Şekil 4.2. Grup 2 ışık mikroskopik görüntüleme	53
Şekil 4.3. Grup 3 ışık mikroskopik görüntüleme	54
Şekil 4.4. Grup 4 ışık mikroskopik görüntüleme	55
Şekil 4.5. Grup 5 ışık mikroskopik görüntüleme	56
Şekil 4.6. Grup 6 ışık mikroskopik görüntüleme	57
Şekil 4.7. Grup 7 ışık mikroskopik görüntüleme	58
Şekil 4.8. Grup 8 ışık mikroskopik görüntüleme	59
Şekil 4.9. Grup 9 ışık mikroskopik görüntüleme	60
Şekil 4.10. Grup 1,Grup 2	61
Şekil 4.11. Grup1, Grup 2, Grup 3.....	62
Şekil 4.12. Grup2, Grup7,Grup8.....	63
Şekil 4.13. Grup1, Grup2, Grup6.....	65
Şekil 4.14. Grup 3, Grup4, Grup5.....	66
Şekil 4.15. Grup1, Grup7, Grup8.....	67
Şekil 4.16. Grup6, Grup7, Grup9.....	68
Şekil 4.17. ALT sonuçları	77

Şekil 4.18. AST sonuçları	77
Şekil 4.19. ALP sonuçları	78
Şekil 4.20. Albumin sonuçları	78
Şekil 4.21. Katalaz sonuçları	79
Şekil 4.22. Total tiyol sonuçları	79
Şekil 4.23. Nativ tiyol sonuçları	80
Şekil 4.24. Disülfid sonuçları	80
Şekil 4.25. LOOH sonuçları	81
Şekil 4.26. MPO sonuçları	81



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Bazı gıda maddelerinin amigdalin içerikleri	27
Tablo 2.2. Besin t��lerine göre Bor konsantrasyonu ($\mu\text{g/g}$)	30
Tablo 3.1. Çalışma grupları	44
Tablo 3.2. Doku takibi metodu.....	45
Tablo 3.3. Hematoksilen-Eozin Boya Prosedürü	46
Tablo 3.4. Masson Tricrom Boya Prosedürü.....	47
Tablo 4.1. BA'nın ve B17'nin MTX'a Etkileri	69
Tablo 4.2. Skolama	70
Tablo 4.3. Skolama İstatistiği.....	75
Tablo 4.4. Çalışma gruplarındaki ratların laboratuvar bulguları	82

1.GİRİŞ

Karaciğer sindirim kanalının hem endokrin hem ekzokrin fonksiyonu olan en büyük aksesuar bezidir. Deriden sonraki 2. büyük organdır. Karaciğer, kaburga kemikleriyle çevrelenmiş bir şekilde diyaframın hemen altında karın boşluğunun sağ üst kısmında bulunmaktadır [1, 2]. Safra yapımı ve salgılanmasında, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında, bazı maddelerin (ilaç ve alkol gibi) işlemden geçirilmesinde rol oynar [1].

Metotreksat (MTX), (eski adıyla amethopterin), bir folik asit antagonistidir. Antineoplastik ve immünosupresif özelliklerinden dolayı; romatoid artrid, psoriasis ve multiple skleroz gibi çeşitli otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılır. Kemoterapötik özelliğinden dolayı da akut lenfoblastik lösemi (ALL), osteojenik sarkom ve akciğer kanseri gibi birçok kanser türünde kullanılır [3]. ALL ve romatoid artrit gibi hastalıklarda $20\text{mg}/\text{m}^2$ doz uygulanırken onkolojik hastalıklarda yüksek doz tercih edilmektedir. MTX, hücrelerin sentez fazına etki eder. Dihidrofolat redüktaz, hücre replikasyonunda anahtar enzim görevindedir. MTX, bu enzime bağlanarak pürin ve pirimidin yapımında görevli tetrahidrofolat sentezini inhibe eder. Nükleik asitlerin ve protein sentezinin engellenmesinden dolayı DNA defektleri ortaya çıkar. MTX, sitotoksik bir ilaç olduğu için kanser hücrelerini yok ederken sağlıklı hücrelere de zarar vermektedir. MTX, karaciğeri, akciğerleri, böbrekleri, kemik iliğini ve ince bağırsığı etkiler [4, 5].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, Borik asit (BA)'nın immün sistemde, kemik gelişiminde, hormon metabolizmasında ve özellikle antioksidan sistemde çok etkili olduğu vurgulanmaktadır [6-8]. Borik asit (BA) ile birlikte, geleneksel tıpta kullanılan bor, doğal bir mineraldir. Ayrıca endüstriyel, tarımsal ve kozmetik uygulamalarda da kullanılmaktadır. BA'nın antioksidan [9], hepatoprotektif ve antijenotoksik etkilerinin dışında, vücuttaki glutatyon miktarını arttırdığı ve reaktif oksijen türlerini inhibe edip oksidatif hasarı ortadan kaldırdığı da öne sürülmüştür [10].

B17 vitamini (Amigdalın, Laetril) ilk kez 1830'da Fransız biyokimyacılar tarafından acı bademden elde edilmiştir [9]. Kiraz, kayısı, badem, erik ve armut gibi meyve çekirdeklerinde bulunmaktadır [11, 12]. Amigdalın (B17), ısıtma işlemiyle parçalandığında zehirli hidrojen siyanür oluşmaktadır. B17 vitamini en çok kansızlık, astım, damar sertliği, kanser ve şeker hastalığı tedavisinde tercih edilmektedir. Bazı çalışmalarda tümör gelişimini engellediği sonucuna varılsa da hastalığı ileri boyutta olan kişilerde tümör gelişimini önlediğiyle ilgili net bir bilgi bulunmamaktadır. B17 vitamini parçalandığında ortaya çıkan hidrojen siyanür miktarı belirlenebilirse bir bakıma B17 vitamin miktarı da belirlenmiş olacaktır. Hidrojen siyanür miktarı kılcak elektroforez, spektrofotometrik, elektrokimyasal ve kromatografik tekniklerle belirlenebilmektedir [12, 13].

Bu çalışmada, borik asitin ve B17 vitamininin MTX kaynaklı hepatotoksik yan etkisine karşı koruyucu özelliğini ve bu hepatotoksiteyi tedavi edici etkisini değerlendirmeyi amaçladık. Bununla birlikte bu etkilerin tiyol-disülfid homeostazisi ile olan ilişkisini bir diğer primer amaç olarak belirledik.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Karaciğer Anatomisi

2.1.1. Karaciğerin Lokalizasyonu

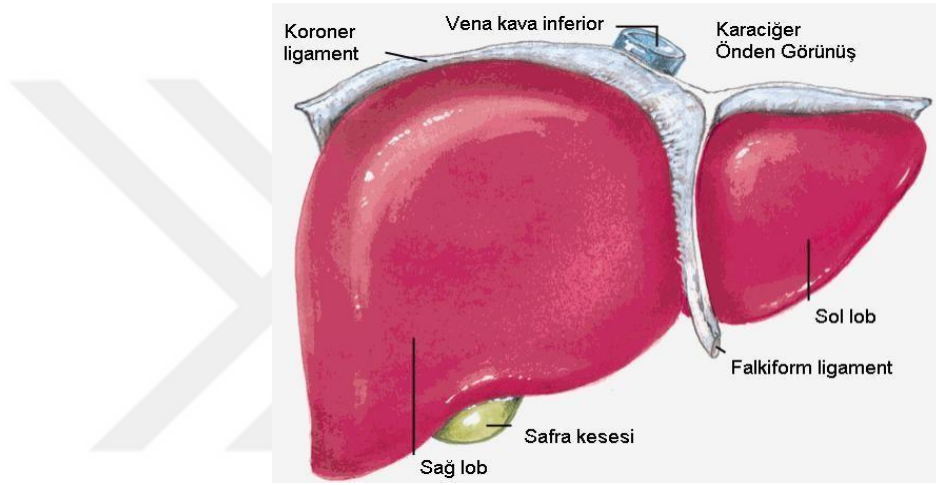
Vücut ağırlığının % 2,5' ini oluşturan karaciğer deriden sonraki en büyük organ olup yaklaşık 1-2,5 kg ağırlığındadır [2]. Yeni doğanlarda vücutlarına oranla daha büyüktür. Karın boşluğunun en üst kısmında bulunan karaciğer boşluğun sağ üst kadrantını kaplarken sol üst kadrantına doğru da uzanır ve diafragmanın hemen altında yer alır.

İntraperitoneal bir organ olan karaciğer, sağ hipokondrium ve epigastriumun bir kısmını ve sol hipokondriumu kapsar. Sadece diyafragmatik yüzün arkadaki küçük kısmıyla safra kesesi, vena kava inferior ve porta hepatisin bulunduğu yerlerde periton gözlenmez [1].

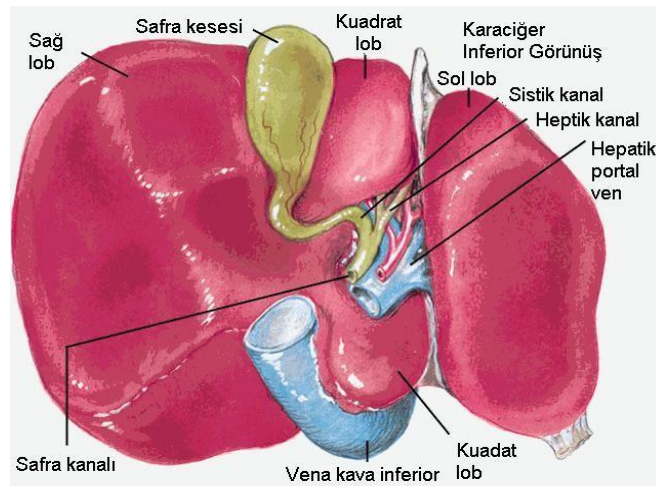
2.1.2. Lobları

Diafragmaya gevşek bağ dokusuyla tutunan karaciğerde 2 yüz, 2 kenar, 4 lob ve yaygın damar ağı mevcuttur [1, 2]. Diafragmaya temas eden üst yüze diafragmatik yüz, karın organlarına komşu alt yüze de visseral yüz denir (Bkz. Şekil 2.1,2.2). Karaciğeri plevradan, akciğer perikardından ve kalpten ayıran altında bulunduğu diaphragmadır [14]. Karaciğer fibröz kapsül yapısındaki glisson kapsülü tarafından sarılır. Ve bu kapsül damarlar çevresine uzantılar göndererek karaciğeri lob ve lobüllere ayırır [15]. Diafragmatik yüzün posteriorunda bulunan area nuda adı verilen kısım hariç tamamı periton ile kaplıdır. Area nuda da karaciğer diafragma ile direk temas eder. Bu çıplak bölgenin sınırlarını diaphragma'dan karaciğere uzanan ligamentum (lig) coronarium çizer. Keskin bir ön kenar (margo inferior) ve künt bir arka kenardan (margosuperoposterior) oluşur [2]. İki ana loptan meydana gelir. Sol lob sağdakinden küçüktür. Hepatik hücrelerden oluşan karaciğere girenler hepatic arter ve hepatic portal vendir. Hepatik ven safra kanalına açılır (Bkz. Şekil 2.2.). Sol lob sağdan sola doğru incilir. Önde yer alan visseraldeki lob Quadratus Lob'dur. Arkada üstte yer alan lob ise Kaudatus Lob'dur. Karaciğerin tüm ligamentleri periton

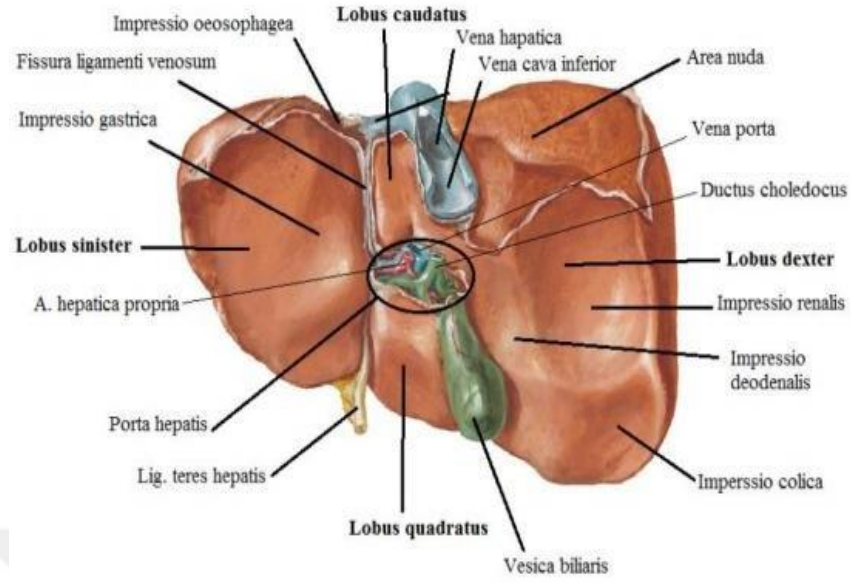
tarafından oluşturulmuştur. Farklı olarak ligamentum teres embriyonik kalıntıdır [2]. Ligamentum venozus fetal duktus venozusun kalıntısıdır ve Kaudat Lobun solunda bulunur. Vena cava ise sağında bulunur [2, 16]. Karaciğeri diyafragma bağlayan esas ligament diyafragma ve karaciğer arasında frontal plan boyunca bulunan koroner ligamenttir [2, 16]. Omentum minus ligamenti ise karaciğeri, duodonuma ve mideye bağlar. Karaciğerin tutunmasına yardımcı olan falciform ligament ise karaciğeri sağ ve sol loba ayırır. Bu ligamentin posterior kısmındaki kalınlaşmaya halka ligament (ligamentum teres) adı verilir.



Şekil 2.1. Karaciğerin anterior görünümü. [17]



Şekil 2.2. Karaciğerin inferiyor görünümü. [18]

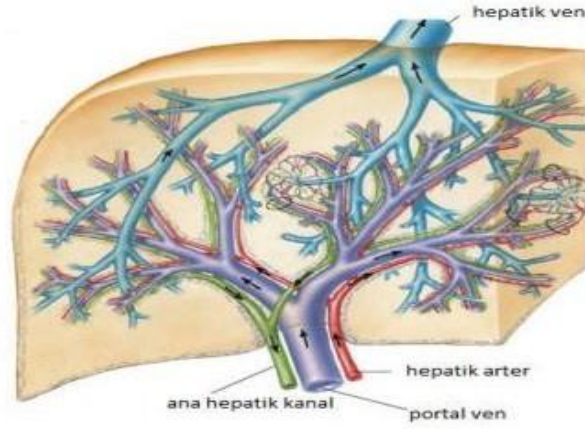


Şekil 2.3. Karaciğerin visseral yüz görünümü. [19]

2.1.3. Damarları

Karaciğer de lenf üretimi oldukça fazladır. Yüzeyel lenf damarları diyafragmatik ve visseral yüzlerin ön kısımlarını drene ediyorsa bu damarlar hepatik noda gelir, arka kısımlarını drene ediyorsa inferior vena kavaya veya inferior frenik noda gelir. Efferentleri ise diyafragmadan geçip posterior mediastinal noda drene olur [2]. Karaciğerin quadrat ve kaudat lobları arasında bulunan porta hepatis lenflerin sinirlerin ve kan damarlarının karaciğere girip çıktığı yer olduğu için karaciğerin kapısı olarak adlandırılır (Bkz.Şekil 2.3). Oksijenin %50'si hepatik portal venden, diğer yarısıysa aortun çölyak arterinin bir kolu olan hepatik arterden gelmektedir [2, 16].

İntrahepatik venler karaciğerdeki santral venlerin birleşmesiyle oluşmakta olup inferior vena kavaya açılırlar [2, 16]. Porta hepatiste plexus çöliyakustan'tan çıkan dallardan da plexus hepaticus oluşur. Burada bulunan parasempatik dallar n.vagus'tan, sempatik dallar da T7-T9'dan gelir. Karaciğeri kaplayan peritonun duyusunu n.phrenicus taşır [2].



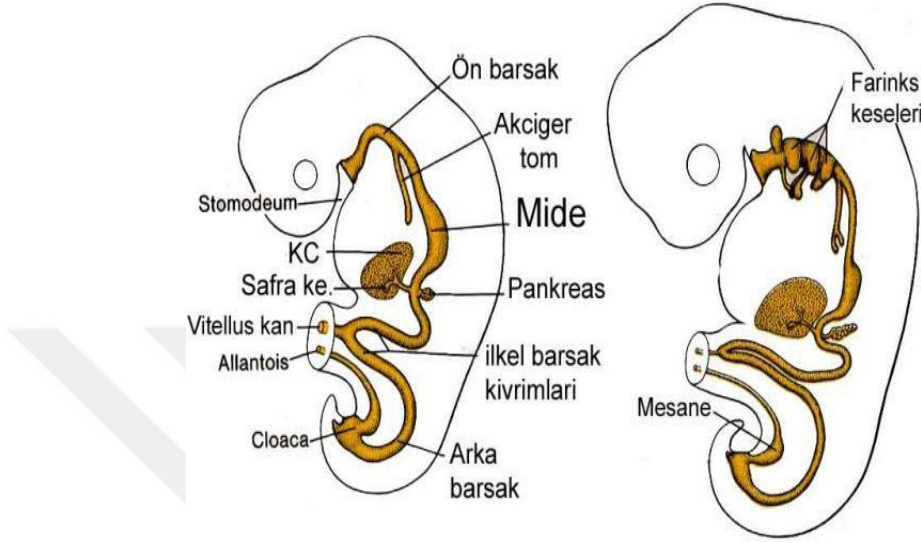
Şekil 2.4. Karaciğerin vasküler dallanması. [20]

2.2. Karaciğer Embriyolojisi

Fetal hayatın 4. haftasına girerken ön bağırsağın kaudal parçasının dışa doğru çıkıntısından dolayı hepatik divertikül oluşur. Daha sonra hepatik divertikül kalp ve mide arasındaki septum transversum'a uzanır. Septum transversum da, ventral mezenter ve diyaframın bir kısmını oluşturur. Hepatik divertikül de büyüme aşamasında iki kısma ayrılır [21, 22]. Kranial büyük kısmı endoderm hücrelerinin çoğaldığı karaciğer taslağıdır. Ve safra kanallarının intrahepatik tarafını saran epitelyum örtüyü ve karaciğer hepatosit kordon ağını meydana getirirler [22]. Endotelle döşenmiş boşlukların etrafında hepatik kordonlar ağ oluştururlar ve böylelikle karaciğer sinüzoidlerinin taslakları da oluşmuş olur [21]. Hematopoetik hücrelerin, bağ dokusu hücrelerinin ve Kupffer hücrelerinin kökeni de septum transversum mezodermidir [23].

Karaciğer beşinci haftadan onuncu haftaya kadar, çok hızlı büyür. Karaciğer gelişimini görebilmek için umbilikal venden karaciğere gelen kandaki oksijen miktarına bakılır [22]. Hematopoiezis altıncı haftada başlar [21]. Hematopoetik aktivite kemik iliği tarafından yapılır [23, 24]. Safra yapımı, karaciğer hücrelerinde onikinci haftada başlar [21]. Safra kesesi karaciğer divertikulumunun küçük kaudal parçasından, sistik kanal ise sapından oluşur [22, 23].

13. haftadan sonra koledok kanalı, sistik kanal ve hepatik kanalı duodenuma bağlayan kordon tarafından oluşur ve safranın bağırsağa akışı gerçekleşmiş olur [21, 23]. Koledok kanalının duodenuma girdiği yer anteriordan posteriora doğru yer değiştirince koledok kanalı duodenumun arkasından geçer [23].



Şekil 2.5. Karaciğer Embriyolojisi. [25]

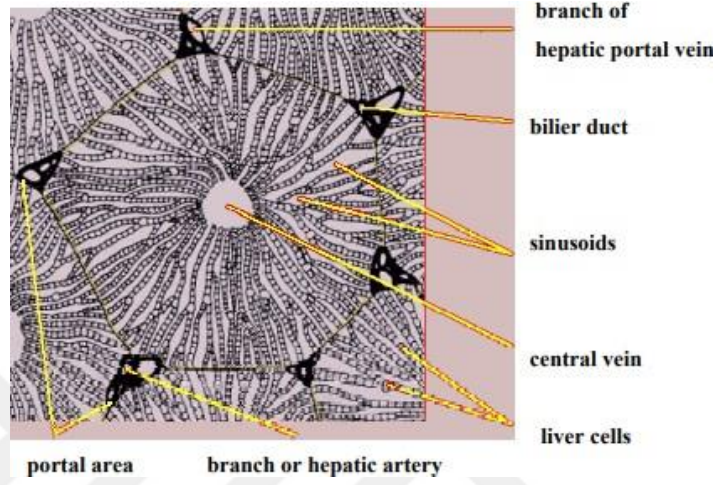
2.3. Karaciğer Histolojisi

Karaciğer, sentezlediği bazı maddeleri kana doğrudan verdiği için endokrin, ürettiği safrayı safra kanallarıyla duodenuma boşalttığı için de ekzokrin bir bezdir [1]. Karın boşluğundaki diyafragmanın altında yer alır [26]. Sindirim kanalından emilen besinler karaciğerde işlenip, vücudun diğer dokuları ve hücreleri tarafından kullanılmak üzere depolanır [26]. Karaciğere kanın çoğu portal venden, kalan az kısmı da hepatik arterden gelir. İnce bağırsaklardan emilenlerin çoğu portal venden karaciğere gelir, lenf yoluyla taşınanlar sadece kompleks lipitlerdir [26].

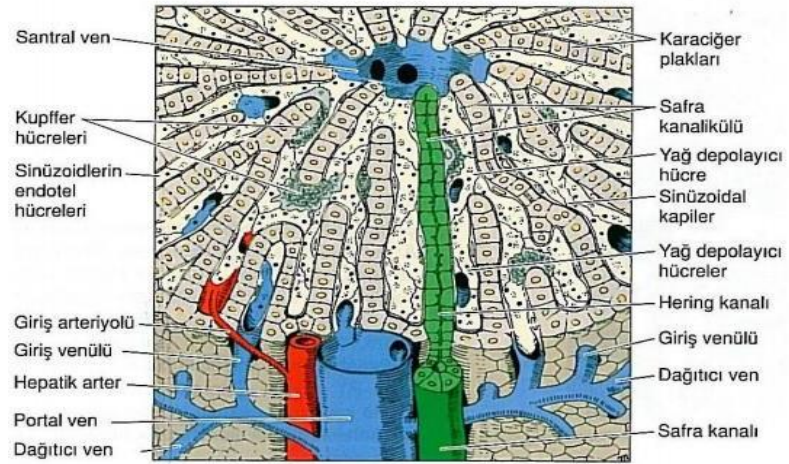
Karaciğer,

1. Karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında,
2. Vücuda alınan bazı maddelerin (ilaç, alkol) işlenmesinde ve detoksifikasyonunda,
3. Safranın (yağ sindirimi için gerekli) yapımı ve salgılanmasında görev almaktadır [1].

Karaciğer stroma ve parankima'dan oluşur. Organ fonksiyonlarını yerine getiren yapılar parankimadır. Parankimayı oluşturan hücre ve diğer yapıların iskeletini meydana getiren bağ doku kaynaklı yapılar ve organa giren damar ve sinirlerden oluşan destek yapıların hepsi de stromadır [1].



Şekil 2.6. Karaciğer histolojisi. [27]



Şekil 2.7. Üç boyutlu karaciğer görüntüsü. [26]

2.3.1. Stroma

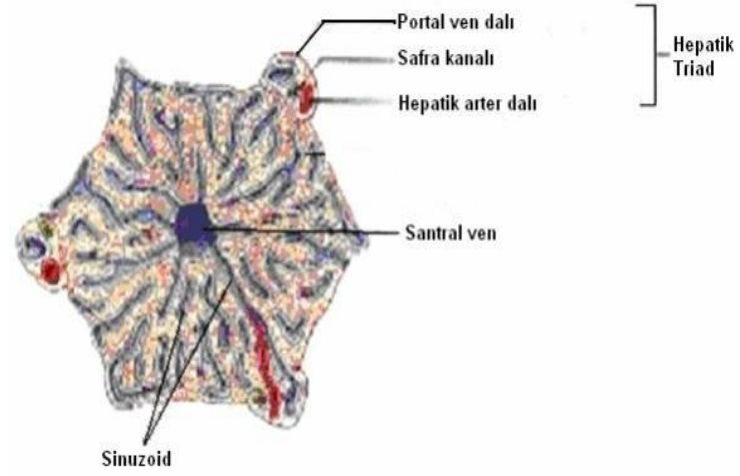
Karaciğeri saran visseral periton seröz bir zardır. Mezotelyum (tek katlı yassı epitelin bir türü) ve altında bulunan ince bir bağ dokusunun birleşiminden oluşmaktadır. Karaciğer visseral peritonla örtülmüştür (diyafragmatik yüzündeki 'area nuda' hariç) [1].

Glisson kapsülü (kapsüla fibroza), visseral peritonun altında bulunan kollajen ve elastik life sahip bir yapıdır [1, 28]. Bağ dokusu yapısında olan kapsül, hilumdan içeriye girer. Porta hepatisten başlayarak karaciğer içine doğru dallanır [21, 29]. Karaciğer böylelikle loblara ve lobüllere ayrılmış olur [1, 21].

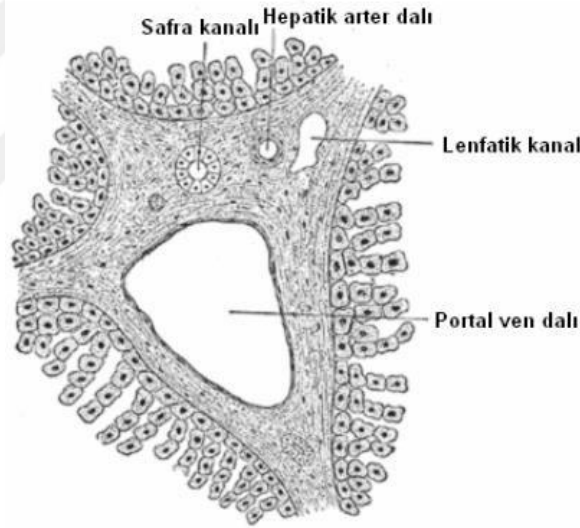
Lobüllerin birleştiği kısımlarda bağ dokusu arttığı için enine kesitlerde üçgenimsi alanlar oluşur. Bu bölgelere portal alan (Kiernan aralığı) adı verilir [1, 21]. Karaciğer lobülünde portal alan sayısı 3-6 kadardır (Bkz. Şekil 2.8.).

Her portal alanda 1 venül (portal venin bir dalı), 1 arteriyol (hepatik arterin dalı), lenfatik damarlar ve 1 safra kanalı bulunur [26]. Portal alandaki üç önemli yapı, portal triyattır (portal üçgen) (Bkz.Şekil 2.6). Bu üç yapının en büyüğü genelde venüldür. İnce duvarlı ve düzensiz lümenlidir. Arter, venülden küçüktür. Duvarı venülden kalındır. Safra kanal epiteli tek katlı kübiktir [1]. Safra yollarının başlangıcı hepatosit aralarındaki safra kanalikülleridir. Kanaliküllerin lobül çevresine değdiği nokta basit kübik epitelden oluşan Hering Kanallarına açılır. Hering Kanalları da portal alandaki safra kanallarına boşalır [29].

Lobülün bağ dokusunda yalnızca retiküler fibriller görülür. Stromadaki lobüllerin çevresindeki bu fibriller gümüşleme yöntemiyle gösterilebilir [1, 21].



Şekil 2.8. Karaciğer Lobülü 1. [30]



Şekil 2.9. Karaciğer Lobülü 2. [30]

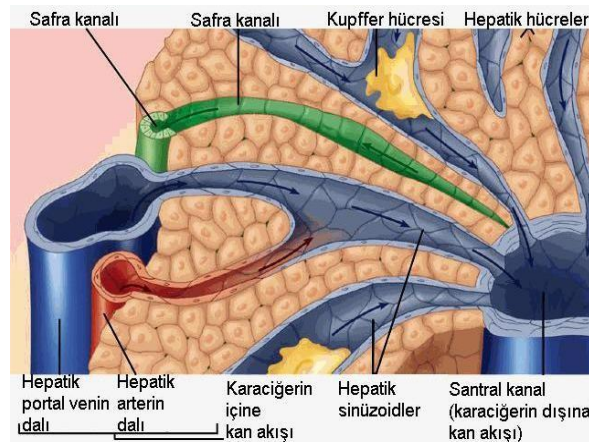
2.3.2. Karaciğerin Kan Dolaşımı

Karaciğere iki kaynaktan kan gelir; %80'i dalak, pankreas ve sindirim yolundan gelen kanı taşıyan portal venden, kalan kısmı da oksijenden zengin kanı taşıyan hepatik arterden [26, 28]. Hepatik arter çölyak hattın bir dalıdır.

Hepatik arter ve portal ven hilumdan karaciğere girerken bağ dokusu kılıfıyla sarılıdır. İlk olarak A.V. interlobarislere dallanırlar. Sonra giderek inceliportal alanlara gelince A.V. interlobularis adını alırlar. Lobül sınırını dolaşırken de daha da inceliportal dağıtıcı arteriyol ve venül adlarını alırlar [21]. Dağıtıcı damarlardan çıkan venöz ve arteriyel kan birbirine karışıp özelleşmiş kapiller tip sinüzoidlere akıp [28] oradan da lobülün ortasındaki santral vene geçerler [26, 28]. Santral ven lobüllerin tam ortasındadır. Buraya dökülen sinüzoidler de santral venden perifered doğru uzanır (Bkz. Şekil 2.9). Lobülde sinüzoidlere paralel olarak uzanan hepatositlerden oluşan plaklara ‘hücre kordonları’ adı verilir [21]. Lobüllerde kan çevreden merkeze aktığı için bağırsaklardan emilen bütün maddeler önce lobül çevresindeki, sonra da merkezdeki hücrelere ulaşır [26].

Lenfatik Sistem

Lobüllerde lenfatik damar görülmez. Sinüzoidler ile hepatositlerin endotel hücreleri arasındaki boşluk Disse aralığıdır. Burası lenfin oluşmaya başladığı yerdir. Karaciğerdeki lenfin protein miktarı diğer lenf sıvılarından fazladır. Albumin globülin miktarı da plazmadan daha yüksektir [21]. Bir miktar plazma buradan önce Mall aralığına (lobül periferine) akar. Daha sonra da portal alanda bulunan lenfatik damarlara boşalırlar. Disse aralığı retiküler fibrillere sahiptir. Karaciğer lenf damarları, portal alandan başlar, birleşir ve duktus torasikusa kavuşurlar. Duktus torasikustaki lenf çoğunlukla karaciğerden, küçük kısmı da mezenterik lenfatikler yardımı ile bağırsaklardan gelir [21].



Şekil 2.10. Karaciğerdeki kan ve safra akış yönleri. [17]

2.3.3. Parankima

Karaciğeri oluşturan hepatositler parankim hücreleridir. Hepatositler duvarın tuğlaları, sinüzoidler de duvar boşlukları gibidir. Parankimin organizasyonundan kaynaklanan üç karaciğer lobül tipi mevcuttur [29].

Klasik Karaciğer Lobülü

Santral ven çevresinde karaciğer hücreleri birbirleriyle anastomozlaşıp hücre kordonlarını oluştururlar. Bu kordonların diğer adı da Remark kordonlarıdır [21, 28] (Bkz. Şekil. 2.9).

Portal Lobül

Safra salgılanışına göre bu ayrım yapılmıştır. Klasik karaciğer lobülünün üç tanesinin santral venleri birleştirilerek portal lobülün sınırları çizilmiş olur [21, 31]. Merkezde portal triat bulunur [28]. Burda lobüllerin üçünde de oluşan safra, ortadaki portal alanda bulunan safra kanalına hep birlikte akarlar [31] (Bkz. Şekil. 2.11).

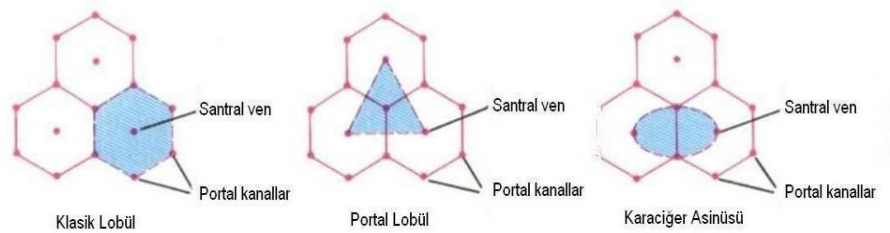
Karaciğer hücrelerinin sentezlediği safra, karaciğer hücreleri arasındaki safra kanaliküllerine (dar hücrelerarası boşluklar) salınır [28]. Kanaliküller tübüler boşluklardır ve çapları 1-2 µm kadardır. Bu alanların sınırını iki hepatositin plazma zarları belirler ve oldukça az mikrovillus içerirler. Safra kanaliküllerinin oluşturduğu ağ lobül plakları boyunca anastomoz yapar [26]. Alkalen fosfataz reaksiyonu ile ya da gümüşleme ile seçilebilirler [21].

Lobülün perifer kısmında, safra kanalikül duvarlarındaki karaciğer hücreleri, nükleusu koyu, soluk sitoplazmalı, kübik, organelden fakir, bazal membrana net oturan hücrelere dönüşür. Bu oturdukları bölge Hering kanalıdır. Hering kanalı portal alandaki loblar arasındaki safra kanalına akar. Safra, kan akışının tersine merkezden çevreye doğru akar [21, 26, 28] (Bkz. Şekil. 2.5, 2.6). Safra kanalları net bir bağ dokusu kılıfına sahiptir ve epiteli kübikten prizmatikçe geçiş gösterir [26].

Düz kas yapısına sahip lif yapısı elastiktir ve düz kas hücrelerine sahiptir. Ortak safra kanalı olan duktus hepaticus komminis karaciğerden çıkar ve safra kesesinden kaynaklanan sistik kanalla birleşir. Duodenuma boşalırken duktus koledokus adını alır [32]. Duktus koledokus'un epitelı tek katlı kübikten prizmatik epitel geçişindedir. Epitel hücrelerinin çekirdeği ovaldir. Golgi ve mitokondri bulunur. Sitoplazma da mikropinositik veziküller ve kolesterol kristalleri bulunur. Bazal lamina üzerinde epitelyum hücreleri bulunur ve apikal yüzeylerinde çok sayıda mikrovillus vardır [32].

Portal Asinüs (Hepatik Asinüs)

Komşu lobüller içinde aynı interlobüler venden beslenen hücreler hepatik asinüsdür. Karaciğer asinüsünün sınırları hepatik arterden ve portal venin uç dallarından beslenmesiyle netleşmiştir [28, 29]. Komşu iki lobül içindeki venülden kanlanan hücre grupları ve dağıtıcı arteriyoller tarafından oluşturulur. Komşu iki lobülün santral venleri ile portal alanlarının birleştirilmesiyle ortaya çıkan baklava dilimi şeklinde bir modeldir [32]. Karaciğer asinüsünün sınırları 1 hepatik arterin son dalıyla belirlenmektedir. Hepatositlerin periferik, santral ve ara zon olarak üç kısma ayrılması arterden gelen kanın, venöz sinüzoidlerden akarken oksijenlenme ve beslenmede oluşturduğu farklı içerik ve kanlanmadan dolayıdır [28].



Şekil 2.11. Karaciğer lobülünün histolojik sınıflandırılması. [33]

Periferik Bölge (Zon I)

Lobülde hepatik arteriyol ve portal venül, periferden merkeze doğru ilerler. Burası oksijen ve besin maddelerinin alındığı ilk yer olduğu için, hepatositler aktiftir. Glikojeni en çok depolayan ve plazma proteinini en fazla üreten bu zondaki

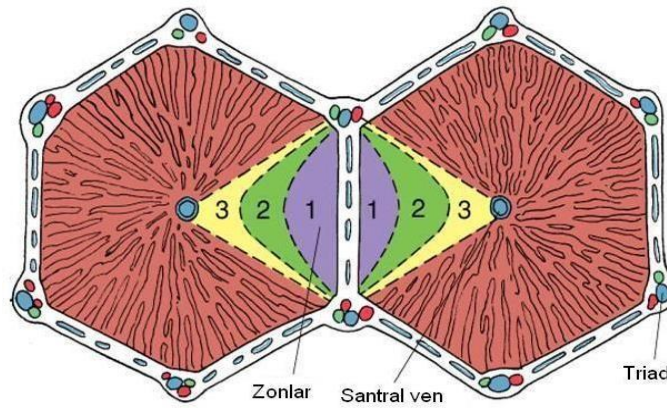
hücrelerdir [29]. Kandaki zararlı maddelerin ilk etkilediği hücrelerdir. Glikojenin en çok depolandığı hücrelerdir. Daha az biriktiği yer ise iç zonlardır. Açlık durumunda glikojeni ilk periferik hücreler boşaltırlar. Bu zondaki glikojen miktarı tükenmeden diğer zonlardaki hücreler glikojen vermez [21]. Bu zonda en çok gelişen organeller, granüllü endoplazmik retikulum ve bol kristal mitokondrilerdir. Dolaşım bozulunca en geç ölen ve ilk yenilenen hücreler bu zondaki hücrelerdir (Bkz. Şekil. 2.12).

Ara Bölge (Zon II)

Orta kısımdadır. Oksijenlenme ve beslenme bakımından aradadır. Sınırları kesin olarak ayırt edilemez [28] (Bkz. Şekil. 2.12).

Santral Bölge (Zon III)

Santral venin çevresinde bulunan en içteki hücrelerden oluşur. Periferik zondaki hücrelerden oldukça az aktiftirler ve az gelişmiş organellere sahiptirler. En çok bulunan organel ise düz endoplazmik retikulumdur [21, 31]. Perfüzyon azalınca hücrelerin ilk iskemik nekroza uğradığı ve ilk yağ birikiminin görüldüğü yerdir. İlaç metabolize eden enzimlerin en yoğun olduğu bölge santral bölgedir. Ayrıca viral ve toksik karaciğer hasarına daha çok uğrayan bölge de santral bölgedir [31] (Bkz. Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Karaciğer lobülünün fonksiyonel sınıflandırılması. [18]

2.3.4. Hepatositlerin Histolojik Özellikleri

Hepatositler, sinüzoidlerin arasında sıralanan hücrelerdir. Ortalama çapları 20-30 µm'dir. Karaciğerdeki hücrelerin %80'ini oluştururlar. Santral venden lobül periferine ışınal halde uzanan 1- 2 hücre kalınlığındaki hücre kordonlarını oluştururlar. Bu hücre kordonları arasındaki boşluklarda da sinüzoidal kapillerler yer alır. Çoğunlukla merkezde yerleşik tek çekirdekleri bulunur ama iki veya daha çok çekirdekli hücrelere de rastlanabilmektedir. Çoğunlukla rRNA yapımında görevli 1 ya da daha çok çekirdekçiklere sahiptir. Çok fazla mitokondri ve az miktar da düz endoplazmik retikulumunun bulunmasından dolayı hepatosit sitoplazması eozinofiliktir [26]. Karaciğer epitel hücresi işlevsel 3 yüzeye sahiptir. Bunlar; sinüzoidlere ve safra kanalikülüne bakan yüz, birde komşu hepatositlere temas eden yüzdür.

Hepatositlerin sinüzoidlere baktığı yüzünde, düzensiz ve büyük bol miktarda mikrovillus bulunur. Mikrovilluslar, hücredeki salgılama ve emilim ortamını ortalama altı kez artırır.

Hepatositlerle sinüzoidleri saran endotel hücreleri arasındaki boşluk disse aralığı yani subendotelyal boşluktur [28]. Disse aralığında hepatosit mikrovillusları bulunur [26]. Sinüzoidlerde bulunan kan endotel duvarından çok kolay geçer ve hepatosit yüzeyiyle temas eder. Ek olarak ta fibrinojen, protrombin, lipoprotein, albumin ve koagülasyon faktörleri V, VII, IX gibi hepatositte sentezlenen moleküller de disse yardımıyla sinüzoidlerdeki kana geçer. Bu karaciğerin endokrin özelliğidir [26, 28].

Disse aralığında mezenşimal kaynaklı İto hücreleri (yıldızlı hücreler) bulunur. Bu hücrelerde yağ mevcuttur. Ve bu hücreler A vitaminini lipid damlacıkları içinde depolarlar. İto hücrelerinin kollajen üreten hücrelere dönüşmesi patolojik durumlarda olur. Tip I kollajenin sentezi ve salınımının yanı sıra büyüme faktörlerini, laminini ve proteoglikanları da salgılamaktadırlar [28]. Organelleri çok azdır. Komşu hepatositlerle ilişki kuran uzantıları vardır.

Safranin ilk salgılandığı bölümün duvarları safra kanalikülünü oluşturan yüz tarafından yapılır. Komşu karaciğer hücre membranlarının kıvrılmasıyla kısa mikrovilluslara sahip safra kanalikülü meydana gelir. Mikrovillusların boyu safranin salgılanıp salgılanmamasına göre değişir. Salgı olmazsa mikrovillusların boyu artarak lümeni kapatır.

Safra kanalikülünün hemen altında komşu hücre ile sıkı bağlantıda olan tarafta ve üstünde kalan taraflarda hücreler arasında sıkı bağlantı olan zonula okludens birimleri bulunur. Bu da safranin kanalikül dışına sızmasını önler. Ayrıca hepatositlerde hücrelerin hücrelerarası iletişim bölgelerinde gap junctionlar da oldukça çoktur. Bunlar da fizyolojik aktivitelerinin koordinasyonunda önemlidir.

2.3.5. Hepatositlerin Sitolojik Özellikleri

Hepatositler; 1-2 çekirdek içeren [26], yüksek metabolik aktivitesi nedeniyle çok sayıda mitokondriye sahip olan [21], plazma proteinlerinin sentezinde görevli granüllü endoplazmik retikulumu ve glikojen sentezi, lipid sentezi ve detoksifikasyon gibi karaciğer fonksiyonlarının büyük kısmını gerçekleştiren düz endoplazmik retikulumu bünyesinde bulunduran multifonksiyonel hücrelerdir.

Hepatosit çekirdeklerinin bazıları polipoiddir. Yani haploid kromozom sayısı ne kadarsa onun çift katları şeklinde kromozom içerirler [26]. Erişkin bir insanın karaciğerinde mitoz çok nadir olmakla birlikte hasar sonrası onarım döneminde bol miktarda mitoz gözlenir [21].

Karaciğerde hepatositler, sferik veya oval şekilli, çok sayıda kristallara sahip, yaklaşık 2000 civarında mitokondri bulundurmak üzere özelleşmişlerdir. Yüksek metabolik aktivitesi mitokondriden zengin olmasıyla açıklanmaktadır [21].

Hepatositlerde, protein sentezinde görevli granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve glikojen sentezi, lipid sentezi ve detoksifikasyon ile ilişkili düz endoplazmik retikulum (AGER) bulunur (21). Bir karaciğer hücresi içerisinde en baskın organel AGER'dir. Bunun sebebi AGER'in ilaçlar, toksinler ve metabolik

uyaranlar nedeni ile oldukça yoğun fonksiyon göstermesidir. Karbon tetraklorür gibi hepatotoksik ajanların metabelize edilmesi AGER'de gerçekleşir [21]. Granüllü endoplazmik retikulum, bazofilik cisimler olarak adlandırılan sitoplazmik kümeleri oluştururlar. GER üzerinde bulunan bu poliribozomlarda albümin, fibrinojen ve protrombin gibi birkaç tip protein sentezi yapılır. Genellikle GER üzerindeki poliribozomlarda sentezlenen proteinler sitoplazmada depolanmazlar, doğrudan hücre dışına sekrete edilirler [26]. Hepatositler dolaşımdaki fazla glikozu alarak sitoplazmalarında glikojen olarak depo ederler. Bir polisakkarit olan glikojen, elektron mikroskopu ile gerçekleştirilen incelemelerde, GER kümelerinde birikmiş elektron yoğun granüller biçiminde görüntülenir. Glikojenin görülmesi Best Karmin ve PAS (Periodic Acid Schiff) boyaları ile sağlanır.

AGER aynı zamanda, hidrofobik karaktere sahip bilirubinin hidrofilik hale dönüştürülmesinde de görevlidir. Bu işlem hidrofilik olan bilirubinin, safra kesesine atılabilmesi için glukronik asit ile konjuge edilmesiyle gerçekleştirilir. Oluşan konjuge bilirubin (bilirubin glukronid /direk bilirubin) difüzyon yolu ile sitoplazmadan safra kanaliküline, buradan da safra içerisine atılır [26, 28].

Safra kanaliküllerine yakın yerleşimli olan golgi komplekside; lizozomların sentezlenmesi, plazmadaki proteinlerin ve protein türevlerinin (glikoproteinler ve lipoproteinler gibi) salgılanması gibi önemli rollerde görev almaktadır [26].

Hepatosit lizozomları, pigment granülleri, kısmi olarak sindirilmiş sitoplazmik organeller gibi yapıları bünyesinde bulundururken; ferritin yıkım ürünü ve erime özelliğine sahip ferritin ile erime özelliği olmayan hemosiderin şeklindeki demiri de depolar [28].

Hepatositler içerisinde dikkat çekici görevleri olan bir başka organel ise peroksizomlardır. Her hepatositte yaklaşık 200-300 peroksizom mevcuttur ve bu peroksizomlar içerisinde katalaz, alkol dehidrogenaz ve D-aminoasit oksidaz gibi çeşitli metabolik yollarda görevli yaklaşık 50 adet enzim bulunmaktadır [28].

Peroksizomlar sahip oldukları bu enzimler ile sitoplazmik metabolik aktivitenin toksik bir ürünü olan H_2O_2 'yi metabolize eder. Pürinlerin fazlasını ürik aside yıkar. Miyelin, kolesterol ve safra asitlerinin yapımında görevli lipidlerin sentezine de katılırlar [26].

2.3.6. Sinüzoid

Portal aralığın çevresinde hepatositler 1 hücre kalınlığı kadar periportal bağ dokusuna dayalı bir tabaka olarak bulunmaktadır. Portal aralıktaki portal ven ve hepatik arterin dalı, kanlarını sinüzoidlere boşaltır. Arteryel ve venöz kan içerirler. Lobüldeki sinüzoidler lobül ortasındaki santral vene akarlar. Sinüzoidler retiküler lif ağıyla sarılıdır [26].

Karaciğer sinüzoidlerinin çapları 9-15 μm 'dir. Duvarlarında aralarında 2 μm boşluklar bulunan yassılaştırmış endotel hücreleri yer alır. Bu hücrelerde çapı 100 nm olan diyaframsız ve geçirgen pencereler mevcuttur [29]. Endotel hücrelerindeki organellerin de sitoplazmaları az, çekirdekleri küçük, yassı ve koyu boyanmıştır. Sitoplazmalarında küçük pinositik veziküller mevcuttur.

Sinüzoidler ayrıca adı Kupffer hücreleri olan makrofajları da içerir. Kupffer hücreleri endotel hücrelerinin lümene bakan tarafındadır ve onlardan daha büyüktür. Bu hücrelerin yıldız şeklinde olma nedeni düzensiz sitoplazmik uzantılara sahip olmalarıdır [28]. Çekirdeği endotel hücreninkinden daha yuvarlak, daha büyük ve soluktur [29]. Kupffer hücreleri ne birbirleriyle ne de endotelle sitoplazmik bir bağlantı kurmaz. Bu yüzden göç yetenekleri (migrasyon) vardır. Madde alışverişini sitoplazmik uzantıları ile yaparlar. Kupffer hücrelerinde lizozomların çok olduğu, çok miktarda filopoda (yalancı hücre ayakcıkları) ve endositik vezikül içerdikleri elektron mikroskopunda görülmektedir [29]. Kupffer hücreleri mononükleer fagositik sistemin üyesidir. Hemoglobini sindirmek, eritrositlerin yaşlı olanlarını metabolize etmek, bakteri, virüs ve tümör hücrelerini etkisizleştirmek esas görevlerindendir [26, 29]. Ayrıca immünomodülatör görevleri olan çeşitli sitokinleri de salgırlar.

Plazma proteinlerini de az miktarda sentezleyip salgırlar. Diğer kupffer hücrelerinin mitotik bölünmesiyle oluşsalar da kökeni kemik iliğı de olabilir. İnvital boya (tripan mavisi) ya da çini mürekkebi gibi özel madde enjeksiyonlarıyla fagositoz özelliğı gösterilebilirler.

Çeşitli viral ajanlara karşı karaciğıeri koruyan, eski adı pit olan NK hücreleri de bu bölgede bulunmaktadır.

2.3.7. Karaciğıerin Yenilenmesi (Rejenerasyon)

Karaciğıerin rejenerasyon yeteneğı oldukça iyidir. Sebebi ne olursa olsun karaciğıerde oluşan hasar çok kısa sürede onarılır [26]. İnsanlarda sınırlı olsa da ratlarda karaciğıerin %75'i çıkarıldığında 1 ay da kaybedilen doku yerine konulabilir. Karaciğıerin bu yenilenme süreci, sağlam kalan hepatositlerin Chalon (mitoz inhibitörü) yardımıyla mitoz bölünme geçirmesi ile gerçekleşir. Chalon miktarı rejenerasyon işlemi azaldıkça düşer ve mitoz da giderek azalır (20). Karaciğıer hasarı tekrarladığında, hepatosit rejenerasyonu ile birlikte bağ dokusu da artar ve sonunda karaciğıer bağ dokusu artışı ile karakterize siroz meydana gelir.

2.4. Karaciğıer Fizyolojisi

2.4.1. Karaciğıer Fonksiyonları

Karaciğıer dolaşımla ilişkili konumu nedeniyle, kesintisiz olarak sürdürülen birçok faaliyetin merkezidir. Karaciğıer ana hatları itibari ile vasküler, metabolik ve salgılama fonksiyonlarına sahiptir [21]. Karaciğıerin organizmada üstlendiğı fonksiyonları anlaşılsın diye, kanlanmasına ve genel dolaşım içerisindeki konumuna bakılır. Özofagusun abdominal kısmından başlayarak, mide, bağırsakların tümü, dalak ve pankreasın venöz kanının tamamı, kalbe dönmeden önce işlenmek için karaciğıerden geçmek zorundadır. Böylece karaciğıer, organizmadaki metabolik faaliyetlerin merkezi konumuna getirilmiş olur. Karaciğıerin temel görevleri; kanın depolanması, filtrasyonu ve safra oluşumudur [21, 28].

Karaciğerin Depo Fonksiyonu

Karaciğer, kendi kan damarlarında büyük miktarda kan depolayabilir. Karaciğerdeki kan volümü 450 ml.'dir (vücudun kan hacminin %10'u kadar). Kan miktarı azaldığı zaman karaciğer fazladan kan sağlayabilir ve kan miktarı arttığıdaysa kan deposu şeklinde kullanılabilir. Venöz organdır [21]. Karaciğer iyi bir vitamin kaynağıdır. Özellikle A, D ve B₁₂ vitaminlerini depolar. A vitamini eksikliğini 10 ay, D vitamini eksikliğini 3-4 ay ve B₁₂ eksikliğini de en az 1 yıl idare edecek kadar depo edelebilir [21]. Demirin çoğu ferritin şeklinde karaciğerde depolanır. Karaciğer hücrelerinde bol bulunan apoferritin demirle birleşebilen bir proteindir ve bu birleşmeyle ferritin oluşur. Dolaşımdaki vücut sıvılarında demir miktarı azalırsa ferritin demiri serbestlenir. Yani apoferritin-ferritin sisteminin görevi demir deposu olmuş olur [21].

Karbonhidrat Metabolizması

Karaciğer kandaki glikoz miktarının devamını sağlar. Hipoglisemide, karaciğer glikojeni parçalayarak enerji gereksinimini karşılar (glikojenolizis).

Protein Metabolizması

Plazma proteinlerinin oluşumundan, aminoasitlerin yapımından, amonyağın vücut sıvılarından uzaklaştırılması için üre oluşumundan ve plazma proteinlerinin (albümin, globülin gibi...) sentezinden sorumludur.

Plazma proteinlerinin % 90'ı hepatitlerde yapılır (gama globulinlerin bir kısmı olan antikorlar hariç). Antikorlar plazma hücrelerinde yapılır [34].

Yağ Metabolizması

Karaciğer, lipoprotein sentezinde, kolesterol ve fosfolipit sentezinde, karbonhidrat ve proteinlerin lipitlere dönüştürülmesinde ve ince bağırsaklarda yağ emiliminde görevli safra tuzlarının yapımından sorumludur [34].

İlaç, Hormon ve Zararlı Diğer Maddelerin Karaciğer Tarafından Detoksifiye ile Atılması

Karaciğerin kimyasal ortamı, bazı ilaçları zehirsizleştirip safra ile vücuttan uzaklaştırır. İç salgı bezlerinden salgılanan steroid hormonlar (östrojen, kortizol, aldosteron) ve tiroksin de kimyasal olarak değiştirilir ya da dışarı atılır.

Kan Pıhtılaşmasında Karaciğerin Rolü

Fibrinojen, protrombin, globulin ve faktör V, VII, IX ve X, koagülasyon işleminde kullanılan maddelerdir ve karaciğerde yapılırlar. K vitamini yok olduğunda bu maddelerin konsantrasyonu düşer ve pıhtılaşma neredeyse tamamen ortadan kalkar [35].

Safra Sentezi ve Salgılanması

Safra salgılamak, karaciğerin önemli fonksiyonlarından. Safra, yağların sindiriminde ve emiliminde önemli bir rol oynadığı gibi aynı zamanda kandaki bazı yıkım ürünlerinin de (bilirubin, kolesterol gibi) atılmasında rol oynar [36]. Safra da su ve elektrolitlerin yanısıra safra tuzları ve pigmentleri, inorganik tuzlar, lesitin, kolesterol, yağ asitleri ve bilirubinde bulunmaktadır. Safranın yapısında en çok safra tuzları bulunmaktadır [34, 36].

Safra Asit ve Tuzları

Safra asitinin bulunduğu yapılar; kenodeoksikolik asit, deoksikolik asit, litokolik asit ve kolit asittir. Karaciğerde kolesterolden sentezlenen primer safra asitleri kenodeoksikolik asit ve kolit asittir.

Safra tuzlarının bağırsak kanalındaki etkilerinden en önemlisi, besinlerde bulunan yağ partikülleri üzerindeki deterjan etkileridir. Bu sayede partiküllerin yüzey gerilimi azalır ve yağ partikülleri daha küçük parçalara ayrılabilir (safra tuzlarının emülsifiye edici deterjan etkisi). İkinci etkisi ise yağ asitlerinin, monoglisidlerin, kolesterol ve tüm lipidlerin bağırsak kanalından emilmesine yardımcı olmasıdır. Bunu da lipidlerle kompleks (miçel) oluşturarak yaparlar [34, 36].

Bilirubin Oluşumu

Bilirubin, karaciğer ve dalakta yıkılan yaşlı kan hücrelerinden oluşur ve hem (demir) metabolizmasının son ürünüdür [28]. Hemoglobin, hem ve globuline ayrılır. Hem'den demir ayrılınca bilirubin % 80'i oluşur. Geri kalan kısmı ise henüz olgunlaşmayan kırmızı kan hücrelerinden (miyoglobulinler, sitokromlar gibi...) kaynaklanır.

Safra Taşları

Safra taşı, kalsiyum içermez. Ana bileşeni kolesteroldür. Safra taşlarını oluşturan etmenlerden biri safra stazıdır. Böylece safra taşları, kesede birikmiş safradan oluşur. İkincisi, safranin kolesterolle aşırı doymasından kaynaklanır [36]. Safra taşlarından dolayı safra akımı durursa ve safra kanallıklarının çevresindeki sıkı bağlantılar parçalanırsa sarılık (kanda artmış safra pigmentleri) oluşabilir [36].

2.5. Karaciğer Enzimleri

Karaciğer hasarının değerlendirilmesinde kullanılan enzimler:

1. Aminotransferazlar (ALT, AST)
2. Gama glutamil transferaz (GGT)
3. Alkalen fosfataz (ALP)
4. Laktat dehidrogenaz (LDH)
5. 5'Nükleotidaz

2.5.1. Aminotransferazlar (AST, ALT)

ALT (alanin aminotransferaz, eski adıyla SGPT) ve AST (aspartat aminotransferaz, eski adıyla SGOT), hepatosit hasarı sonucunda kana salınan intrasellüler enzimlerdir. Normal ALT seviyeleri erkeklerde 29–33 IU/L, kadınlarda 19–25 IU/L arasında değişir. Eşik değerleri cinsiyet ve vücut kitle indeksine göre ayarlanır [37, 38]. Bu seviyelerin üzerindeki değerler karaciğerde hasar olduğunu gösterir [39].

AST, karaciğer, kalp kası, böbrek, beyin ve diğer organlarda da bulunurken; ALT, öncelikle karaciğerde bulunmaktadır. Bu yüzden hepatosellüler hasara özel bir belirteçtir [40].

2.5.2. Alkalen fosfataz (ALP)

Biliyer epitel hasarını oluşturan intra-ekstrahepatik kolestaz oluşturan nedenler serumdaki ALP seviyesini artırır. ALP seviyeleri safra kanal obstrüksiyonu ile yükselir. Serum ALP seviyesi, daha çok karaciğer ve kemiklerden kaynaklanır. Gebelik sürecinde alkalen fosfataz plasentadan seruma salındığı için serumdaki ALP seviye artışı fizyolojik kabul edilir. O ve B kan grubuna sahip olanlarda, yağlı yedikten sonra serum ALP düzeylerinde bağırsaktan dolayı artış olabilir [40]. Diyabetes mellituslu hastalarda da ALP yükselmeleri gözlemlenmiştir. [41, 42].

2.5.3.Gama glutamil transferaz (GGT)

Hepatositlerde, biliyer epitel hücrelerinde ve böbrekte, vezikula seminaliste, pankreasta, dalakta, kalp ve beyinde bulunur. Bu organlarda patoloji meydana gelince serumdaki GGT miktarları artabilir. Fenitoin ve barbitürat kullanımı ise GGT'yi yükseltebilir. Alkol karaciğerden atılırken GGT kullanılır. Fazla alkol tüketiminde GGT artışı klasiktir. Normal yeni doğanlarda serum GGT miktarı yetişkin referans aralığının 6-7 katıdır [42].

2.5.4.Laktat Dehidrogenaz (LDH)

Serumda 5 izoenzim formunda bulunur [40]. Karaciğer kökenli izoenzimi ifade eden bant en yavaş göç edendir [43, 44]. Hepatitlerde artar. LDH değerlerinin artması akut miyokard enfarktüsünde geç dönemde bir belirteçtir [43].

2.5.5. 5'Nükleotidaz

Karaciğerde, beyinde, bağırsakta, kalpte, kan damarlarında ve pankreasta mevcuttur ama yalnızca hepatobiliyer doku tarafından seruma salınabilir [40].

2.6. Metotreksat (MTX)

Metotreksat (MTX), bir folik asit antagonistidir. İlk kez 1948'de Akut Lösemi'de kullanılmıştır [45]. İmmünomodülatör ve antiinflamatuvar etkileri mevcuttur. MTX, en çok lösemi, karsinoma ve osteosarkoma tedavisinde kullanılsa da romatoid artrit, psoriasis, sarkoidoz ve vaskulitte gibi hastalıkların tedavisinde de tercih edilen antineoplastik (sitotoksik) bir ilaçtır [35, 46]. Sitotoksik ilaçlar, kanser tedavisi dışında; sağlıklı hızlı bölünen hücreleri de etkilemektedirler. Bu nedenle toksiktirler. Toksik etkisi en çok karaciğer üzerine bilinse de, akciğer, böbrek, bağırsak, kemik iliği gibi organlarda da önemli hasarlara yol açmaktadır [47]. Haftada bir gün tek doz uygulanması tercih edilmektedir. Metotreksat kullananlarda

kusma, diyare, iştahsızlığa bağlı kilo kaybı, baş dönmesi ve davranış değişiklikleri görülebilmektedir. Hepatotoksisite dozdan bağımsız olarak oluşmaktadır. Tedavi başlangıcında karaciğer enzimleri hafif yükselse de birkaç haftada normale döner. Tedavi boyunca ilk altı ay ayda 1 kez daha sonra da üç ayda bir kan sayımı, kreatinin ve transaminaz takibi olmalıdır. Metotreksat kullanan hastalar mutlaka folik asit almalıdırlar. Folik asit metotreksatın etkisini düşürmediği gibi yan etkilerini de azaltmaktadır.

MTX, aktif olan folik asiti bloke eder ve mitoz bölünme durur. Otoimmün hastalıklarda hızlı mitoz bölünmeye uğrayan hücrelerin üremeleri durur ve bağışıklık sistemi azalır, kanser hücrelerinin çoğalması durur.

Folik asitin 4-amino, N₁₀-metil analogudur [48, 49]. Bağırsaklardan emilir. Sonrasında NADPH bağımlı dihidrofolat redüktaz yardımıyla tetrahidrofolat formuna indirgenir. MTX, yüksek konsantrasyonlar da difüzyonla hücreye girebilir [49]. Metotreksatın dihidrofolata karşı afinitesi yüksektir. MTX, yapı olarak folik asit gibidir. Dihidrofolatı (FH₂) tetrahidrofolata (FH₄) dönüştüren dihidrofolat redüktazı inhibe ederek tetrahidrofolat sentezini inhibe etmiş olur. Ve böylece de timidilat - purin nukleotidlerinin biyosentezi de durur. Tetrahidrofolat, deoksiuridilik asitin (dUMP) deoksitimidilik asite (dTMP) dönüşümünde de gereklidir. Bu dönüşüm olmazsa timidilat sentezlenemez. Hücre çoğalmasında görevli DNA ve RNA'nın sentezi ve enerji üretiminde gerekli ATP üretimi de inhibe olur. Böylece hücre ölümü gerçekleşir [45, 49, 50]. Tetrahidrofolat gibi MTX'da hücrede poliglutamatla birleşir. Çok büyük ve negatif elektrik yüklü olduğu için hücre dışına çıkamaz [51]. Engüçlü neoplastik etkisini de S fazında gösterir.



Şekil. 2.13. MTX'in Dihidrofolat redüktazı inhibe etmesi.

Metotreksat poliglutamat formuna metabolize edilir. Dihidrofolat redüktazı da durduran poliglutamatlar hücre dışında yeterli ilaç olmasa da hücre içinde kalabilirler. Ama MTX, hücre dışında ilaç miktarı azaldığı an hücreden çıkar. Bu yüzden idrarın pH'ının fazla olması, hastanın oldukça iyi hidrate edilmesi, en çok böbrek fonksiyonları için önemlidir [49]. MTX; psoriasis ve romatoid artrit benzer inflamatuvar hastalıklarda etki gösteren tek ilaçtır [35, 50]. Osteosarkoma, intrakranial lenfoma ve ALL gibi hastalıklarda tek ya da kombine tedavi şeklinde kullanılır. Dozların standart şekline direnç geliştirdiği için 1970'ten sonra hafif ($0.5 -1 \text{ gr/m}^2$) ve yüksek ($> 1 \text{ gr/m}^2$) dozları denenmeye başlanmıştır [46, 52]. Yüksek doz tedavisiyle birlikte kemik iliğinin baskılanması, mukozit, diyare ve ülser gibi yan etkileri görülse de en önemli yan etkisi hepatotoksistedir [35, 53]. Yüksek miktarda MTX uygulamasından sonra 1-2 günlük aralıklarla plazmada bulunan MTX miktarına bakılmalıdır. Folat seviyesi azalıyorsa artırmak için lökovorin verilmelidir [52].

2.7. B17 Vitamini (Amigdalın)

Amigdalın ilk 1830'da Pierre-Jean Robiquet ve Antoine Boutron-Charlard isimli Fransız biyokimyacılar sayesinde acı bademden elde edilmiştir [12]. Amigdalın, en yaygın nitrilositlerden biridir ve doğada en çok bulunan siyanojenik glikozittir. Kayısı, badem, erik ve şeftali gibi meyve çekirdeklerinde bulunur [11, 12]. Bazı laboratuvar çalışmalarında tümör gelişiminin engellenmesiyle ilgili olumlu sonuçlar elde edilse de hastalığı ileri boyutta olanlarda amigdalının tümör oluşumunu önlediğine dair net bilgiler bulunmamaktadır. Bu yüzden anti-kanserojen etkisi var mı yok mu, varsa da ne miktarda var bunun netleşebilmesi için detaylı bilimsel çalışmalar gerekmektedir [11]. Amigdalın analizi için spektrofotometre, kromatografi ve enzim bağlı immunosorbent analizi (ELISA) kullanılabilmektedir [54, 55]. Amigdalının içeriğini belirlemek için geliştirilen HPLC yöntemleri de mevcuttur [54, 56, 57]. Amigdalın ile bunun parçalanmasıyla oluşan hidrojen siyanür miktarı arasında doğru orantı olduğu için hidrojen siyanür miktarının belli olması bir bakıma amigdalın miktarının da belli olması anlamına gelmektedir [11, 13]. Amigdalın düzeyi mevsimsel farklılıklar ve işleme şekline göre ciddi boyutta değişkenlik göstermektedir [11, 57-60].

Tablo.2.1. Bazı gıda maddelerinin amigdalin içerikleri [57].

Çekirdek içi	Amigdalin İçeriği (mg/g)	İşlem Görmüş Gıdalar	Amigdalin İçeriği (mg/g)
Kayısı	14,37	Kavrulmuş badem	0,12
Vişne	2,68	Badem Sütü	0,05
Kiraz	3,89	Badem Unu	0,03
Nektarin	0,12	Elma Suyu (%100 sıkma)	0,09
Şeftali	6,81	UHT Elma Suyu	0,004
Yeşil Erik	17,49	Elma Püresi	0,02
Siyah Erik	10,00	Şeftali içeceği	0,04
Mor Erik	2,16	Kavrulmuş kabak çekirdeği	Tespit edilmemiş
Sarı Erik	1,54		
Kırmızı Erik	0,44		
Elma	2,96		
Armut	1,29		
Dolmalık Kabak	0,21		
Salatalık	0,07		
Sakız Kabağı	0,06		
Kavun	0,12		

Acı bademin tatlı türlerinde daha çok amigdalin bulunduğu gösterilmiştir [61]. Kayısının acı, yarı acı ve tatlı çeşitlerindeki amigdalin içeriği yaklaşık olarak 40,06 mg/g, 0,99 mg/g ve 0,06 mg/g şeklinde sıralanabilir [62]. İşlenmiş ürünlerin amigdalin içeriğinin (0,004-0,120 mg/g) daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden işlenmiş gıdalarda toksik etkinin olmadığı belirtilmiştir [63]. Amigdalinin parçalanması için ısıtma işlemi ve askorbik asit gerekmektedir [11, 64, 65]. Amigdalini parçalayan β -glikozidaz aktivitesi bitkilerde ve birtakım bağırsak bakterilerinde de bulunur [12]. Amigdalin sindirildikten sonra görülen zehirlenmenin asıl nedeni ince bağırsağın alt bölgesindeki mikroorganizmaların parçaladığı amigdalin ile oluşan hidrojen siyanürün emilimidir [66]. Antibiyotik uygulamasından dolayı bağırsak florasının çoğu imha edilir. Ve bundan dolayı amigdalin siyanüre ve benzaldehite tamamen parçalanmadığı için amigdalinin metabolize olmasında bağırsak bakterilerinden gelen enzimlerin ciddi katkı sağladığı belirtilmiştir [67].

Amigdalinin emilen kısmının %62- 96'sının sindirimden sonraki ilk 1 gün içerisinde idrarla atıldığı yapılan hayvan çalışmalarında gösterilmiştir [67]. Amigdalinin böbrekler ile atılma oranı karaciğerle atılma oranından oldukça yüksektir. Amigdalinin parçalanmamış formu zehirleyici etki göstermez. Amigdalin parçalanınca meydana gelen hidrojen siyanür zayıf asidik (pK_a : 9,22) özelliktedir ve bağırsaklar tarafından hızlıca emilir. Emilen hidrojen siyanür kanla vücudun tamamına yayılır ve ölüme neden olabilecek zehirlenmelere yol açabilir [64, 67].

Amigdalın, alyuvar azalmasından kaynaklanan anemi, diyabet, astım, hipertansiyon, ateroskleroz ve tümör tedavisi için alternatif tıpta kullanılmaktadır [68-71].

1845 yılına kadar amigdalın Rusya’da anti-kanserojen olarak kullanılmıştır [72]. Fakat 1953’de Kaliforniya Tıp Birliği Komisyonu bu kullanımla ilgili iddiaların yanlış olduğuna karar vermiştir ve 1959’da Kaliforniya’da kabul olan bir yasayla amigdalın kullanımı engellenmiştir. Çoğu ülkenin ilgili kurumları tarafından yasaklanmasına rağmen amigdalın hala kullanılmaktadır [73, 74]. 1970’lerin en çok tercih edilen alternatif tıp ilacı olan amigdalın bu yıllarda ortalama 70.000 Amerikalı kanser hastasının tedavisinde kullanılmıştır [75, 76].

Amigdalının insan prostat kanserinde apoptoza teşviki saptanmıştır [77]. Park ve ark.’nın [57] yaptığı çalışmada, amigdalının insan kolon kanseri hücre döngüsündeki DNA’yı bozduğu için anti-kanserojen etkisi olduğu ve bu yüzden kanser ilacı olarak tercih edilebileceği bildirilmiştir. Makarević ve ark.’nın [78] gerçekleştirdiği çalışmada da amigdalının prostat kanseri üzerinde önemli derecede anti-tümör etkisi olduğu için tedavide kullanımı üzerinde daha çok araştırma yapılması gerektiği belirtilmiştir.

Aghadavod’un yaptığı taramalarda, amigdalının damar rahatsızlığı ve şeker tedavisinde, kanser oluşumunun durdurulmasında olumlu etkisi olduğu söylenmiştir [71].

Amigdalının hastalığı ileri boyuttaki kişilerde net olarak tümör oluşumunu engellediğiyle ilgili kesin verilerin olmadığı, fakat tedavi etkisinin var olup olmadığının açıklığa kavuşturulmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir [74]. Konu henüz netlik kazanmasa da amigdalın tabletleri ticari olarak “laetril” veya vitamin “B17” isimleriyle takviye şeklinde satılmaktadır [79].

2.8. Borik Asit (BA)

Bor, metalle ametal arası yarı iletken özellikli, 5 atom numaralı, 10.81g atom ağırlıklı, 2.84g/cm³ yoğunluklu, periyodik sistemde üçüncü grubun başındaki elementtir. İki izotopa sahiptir. Ortalama 250 çeşit bor minerali mevcuttur ve doğada

serbest halde değil, diğer elementlerdeki oksitlerle birlikte B₂O₃ (boroksit) halinde bulunurlar [80]. Oksijenle bağ yapabilirler. Metal-bor oksijen bileşimine borat adı verilir. Bor daha çok Mg, Na, Ca gibi metallerle birleşik olarak bulunur [81]. Boroksit aynı zamanda sık görülen bir bor bileşiğidir. Okyanuslardan buharlaşıp havaya karışan BA, yağmurlarla toprağa inen Bor, canlılar için önemli bir elementtir. Bitkiler ile insanlara yayılmaktadır. Borun canlılara geçmesinin birçok yöntemi mevcuttur. Hava ve su teması, bor mineralleriyle temas, bordan zengin havzalardaki suların kullanımı, bol miktarda bor içeren gıdaları tüketmek, fabrikalarda çalışmak ve deterjan gibi temizleyicileri kullanmak örnek olarak verilebilir. Bor insan vücuduna, deri, ağız ve solunum yoluyla da girebilir.

Ancak, bor besin zinciri yoluyla biyolojik olarak birikemez. Meyve, sebze, baklagil ve çerezler oldukça çok bor içeren besinlere örneklerdir. Borca fakir olan besinler ise, balık, et ve süt ürünleridir. Erik kurusunun 100 gramında, günlük vücut ihtiyacına yatecek miktarda (2-3 mg) bor bulunmaktadır [81].

Tablo 2.2. Besin Türlerine göre Bor Konsantrasyonu (µg/g) [82]

Besin Türü	Bor Konsantrasyonu (µg/g)
Elma	2,73
Muz	3,72
Kiraz	1,47
Şeftali	1,87
Armut	1,22
Portakal Suyu	0,41
Kuru Erik	27
Kuru Üzüm	25
Taze Fasulye	0,46
Brokoli	1,85
Salatalık	0,015
Havuç	0,75
Fındık	16

Kaynaklardan alınan bor dozları, insan ve hayvanda akut toksisite oluşturacak boyutta değildir. Fakat bor iyonu, sudaki canlılara büyük zararlar verebilmektedir [83]. Kronik etkilerinin incelendiği çalışmalarda ağızdan verilen borun büyüme,

ölüm ve üreme oranlarına etkisinin pek olmadığı gösterilmiştir. İçme suyunda mevcut olan %0,25 bor büyümeyi yalnızca 30 günde durdurmuştur.

Borun hava yoluyla alındığında zararlı olmadığı gözlemlenmiştir [84]. Bor bileşiklerinin vücuda girme yolları solunum, sindirim veya mukoz membranlardır. Hangi yolla girerse girsün, %85-90 kadarı ilk 1 gün içinde idrarla vücuttan atılır [84]. Çözünmüş bor bileşikleri alındıktan sonra en fazla kemiklerde, tırnaklarda, kıllarda, karaciğerde ve dalakta birikir. Literatürde borun insanlar üzerindeki etkilerini belirlemek için yapılmış çalışmalarda gıdalarla normal alındığında bor ve bileşikleri insan sağlığını olumsuz etkilememiştir [83]. Hastalara beyin tümörlerinin nötron yakalama ile tedavisinde verilen boraks miktarı 20 g'dır. Öldürücü doz çocuklarda 5-6 g, yetişkinlerde ise 10-25 g'dır [84]. Borun insan vücuduna yararlı etkileri de vardır. Vücut minerallerinin (Kalsiyum, D vitamini gibi) düzenlenmesinde rol oynaması, kalsiyum ve magnezyum miktarını koruyarak kemik yapısını koruması örnek verilebilir. Ayrıca borun küçüklerin öğrenme yeteneklerine katkıda bulunduğu; sportif performans ve atletik yapılarını da geliştirdiği bilinmektedir [85, 86]. Kaynakların bazılarında bor tozlarıyla temasın sperm miktarında düşüklük yaptığı iddia edilse de dünyada ve ülkemizde yapılan araştırmalarda borun kısırlık yapmadığı sonucuna varılmıştır [82]. Kanseri tedavisinde kullanılan yöntem Bor Nötron Yakalama Terapisi (BNCT)'dir. Beyin kanseri tedavisinde hasta olan hücrelerin seçilerek yok edilmesinde işe yararken sağlıklı hücrelere de minimum düzeyde zarar vermektedir. Ayrıca göz iltihaplarında sterilizasyon amaçlı da kullanılmaktadır.

Yukarıdaki kullanım alanlarının dışında bor birde antibakteriyel olarak, tıpta, diş macununda, parfümde, şampuanlarda ve kimya sanayisinde çeşitli boya türlerinde de kullanılmaktadır.

Sonuç olarak bor sağlıkta, kanserden obeziteye kadar oldukça önemli bir yerdedir. Bunun yanı sıra petrol gibi önemli bir maden olan borun en büyük rezervine sahip ülke de Türkiye'dir. Doğal bir mineral olan bor, borik asit (BA) ile birlikte, geleneksel tıpta kullanılmasının yanı sıra endüstriyel, tarımsal ve kozmetik uygulamalarda da yaygın kullanılmaktadır. Çoğu çalışmada, BA'nın antioksidan [9], hepatoprotektif ve antijenotoksik etkileri olduğu gösterilmiştir. Bunun dışında,

BA'nın glutatyonun vücuttaki miktarını arttırdığı ve diğer reaktif oksijen türlerini inhibe edip oksidatif hasarı yok ettiği de öne sürülmektedir [10].

2.9. Oksidan ve Antioksidan Sistemler

2.9.1. Serbest Radikaller

Ana iskeletinde oksijen olan radikallere serbest oksijen radikalleri adı verilir [87]. Serbest radikaller tüm canlı hücrelerde eser miktarda üretilirler. Aşırı üretilirlerse hücre ve doku hasarı oluştururlar. Serbest radikallerin bu etkileri antioksidan adı verilen enzim veya moleküller tarafından ortadan kaldırılır. Organizmalardaki oksidan üretimi ve antioksidan defans arasında önemli bir denge bulunmaktadır. Üretilen oksidan ajanlar, antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılırken aralarında bir dengesizlik oluşur. İşte oksidatif stresin meydana gelme nedeni de budur. Oksidan ajanlar protein, lipid ve karbonhidratların yükseltgenmesine ve DNA hasarına yol açtıkları için önemli derecede toksik etki gösterirler [88].

Önemli serbest oksijen radikalleri;

- 1) H_2O_2 (Hidrojen peroksit)
- 2) O_2^- (Süperoksit radikali)
- 3) $HO\cdot$ (Hidroksil radikali)

Hidrojen peroksit serbest radikal değildir. Reaktif oksijen türlerine dâhil edilebilir. Metal iyonlarının varlığında hidroksil radikallerinin ana kaynağıdır. Organizmalarda hidrojen peroksit süperoksit radikallerinden oluşur [89]. Hidrojen peroksit proteinlerde hem grubundaki demirle tepkimeye girerek reaktif demir formlarını oluşturur. Süperoksit radikali, canlılarda oluşan ilk radikaldir. Süperoksit fazla hasara yol açmaz. Ancak süperoksit radikal anyonu (hidrojen peroksit) ölümcül hidroksil radikallerinin oluşumuna katkı sağlar. Aktive edilen fagositik lökositlerden çok sayıda süperoksit üretilir [89]. En reaktif radikal hidroksil radikali. Her biyolojik moleküle saldırarak oksidatif hasar oluşturabilir. Oluşturduğu en bilinen

biyolojik hasar lipid peroksidasyonu adı verilen serbest radikal reaksiyonudur. Hidroksil radikali fagositoz ve bazı enzimatik katalizlerde üretilmektedir [89].

Serbest Radikallerin Etkileri

Lipitlerin Oksidasyonu

Serbest radikallerin hücrelere en önemli etkisi hücre zarındaki lipidlerin peroksidasyonudur. Lipit peroksidasyonu radikallerin poliansatüre yağ asitlerine, hücre zarındaki kolesterole veya lipoproteinlere saldırdığı bir zincirleme reaksiyondur. Lipit peroksidasyonu kontrolsüz olduğunda hücresel disfonksiyona ve hasara neden olur [89, 90]. Lipit peroksidasyonu, hücre membran akışkanlığını ve geçirgenliğini bozar. Lipit peroksidasyonundan kaynaklanan membran hasarı geri dönüşümsüz olur [89, 91].

Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonu

Karbonhidrat molekülleri lipid ve proteinlerden daha az oksidatif hasara maruz kalırlar [89].

DNA Hasarı

Hidroksil radikali pürin ve pirimidin bazlarını okside ederek DNA hasarına yol açar. Hasara uğrayan DNA'nın tamiri sırasında mutasyonlar oluşabilir. Bu nedenle de bazı proteinlerin sentezi inhibe olur.

2.9.2. Antioksidan Sistemler

Vücutta meydana gelen serbest radikalleri metabolize eden, düzeylerini kontrol altına alan, serbest radikal oluşumunu yok edip temizlenmesini artıran ya da oluşabilecek hasarı durduran, onaran savunma mekanizmaları vardır. Savunmayı

yapan maddelere antioksidan maddeler denir. Aerobik hücrelerdeki antioksidan sistemler endojen ya da eksojen olabilir.

Endojen antioksidanlar; enzimatik (mitokondriyal oksidaz sistemi, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), glutatyon transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) gibi) ya da nonenzimatik (transferrin, ferritin, glutatyon, bilirubin, albumin, ürik asit, α - tokoferol, serüloplazmin gibi) olabilir [90-93].

Eksojen antioksidanlar; E vitamini, folik asit, C vitamini, asetilsistein, allopurinol, mannitol ve demir şelatörleri sayılabilir [89-93].

Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Oksijen radikalini substrat olarak kullanıp süperoksitin hidrojen peroksite çevrilmesini sağlayan bir metalloenzimdir. Bu reaksiyon oksidatif strese karşı ilk savunmadır [89, 90, 93].

Katalaz (CAT)

Katalaz hidrojen peroksiti su ve oksijene ayrıştıran bir enzimdir. Peroksizomda bulunur. Hücreyi oksidatif stresten korur. Daha çok kan, karaciğer ve böbrekte bulunur [89, 90, 93].

Glutatyon Peroksidaz (GPx)

GPx enzimi hücrelerin sitozolünde bulunur. SOD tarafından oluşan H_2O_2 ve yağ asiti peroksitlerini yok eder. GPx enziminin fagositik hücrelerdeki rolü önemlidir. Fagositoz sırasında meydana gelen serbest radikal peroksidasyonundan fagositik hücrelerin hasar görmesini önler. GPx, intraeritrosit oksidatif strese karşı etkili antioksidanlar arasındadır [89, 90].

Glutasyon-S-Transferaz (GST)

GST, organizmadaki ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda görevlidir. GST, lipid peroksidlerine karşı selenyumdan bağımsız olarak etki gösterir [89, 93].

Glutasyon redüktaz (GR)

Glutasyon peroksidaz sayesinde H_2O_2 gibi diğer lipid peroksidleri de yükseltgenirken GSH, okside glutatyona (GSSG) dönüşür. Bu durumu tersine çevirip tekrar redükte glutatyona (GSH) dönüşmesini sağlayan enzim ise glutasyon redüktazdır [89, 93].

Mitokondrial Sitokrom Oksidaz

Sitokrom oksidaz süperoksit radikalini suya çevirir [89].

Membranlarda Bulunan Antioksidanlar

Vitamin E, hücre membranındaki uzun zincirli poliansatüre yağ asitlerini oksidatif hasardan korur. E vitamini eksikliğinde serbest radikallerden kaynaklanan lipid peroksidasyonu daha sık görülür [90]. Vitamin C, süperoksit ve hidroksil radikali ile etkileşime girer. En çok lökositlerde olmak üzere oksidatif hasara karşı önemli bir rol oynar [94]. Vitamin A, pek çok hücrenin büyümesi ve farklılaşmasında regülatör rolü vardır. Solunum yolundaki epitel hücrelerinin bütünlüğünün devam etmesinde oldukça etkilidir [93].

Bilirubin Antioksidan Özelliği

Lipid peroksidasyonunda antioksidan olarak en az E vitamini kadar etkilidir. Serumda yüksek bilirubin toksiktir.

Bilirubin oksidatif stresle tetiklenir. Uzun süreli oksidanlardan kaynaklı hücre hasarında koruyucu bir rolü olduğu söylenir [95].

Tiyol-Disülfid Homeostazisi

Tiyoller, sülfidril grubu içeren organik bileşiklerdir. Antioksidan özellikleri en başta gelir. Enzim ve koenzimlerin aktif merkezlerinde bulunurlar. Disülfid köprüleriyle (S-S) proteinlerin tersiyer - quarterner yapılarını oluştururlar. Sinyal iletimi ve apoptozis gibi fonksiyonlara sahiptirler [96]. İntrasellüler ortamdaki en önemli tiyoller, glutatyon ve tiyoredoksindir. Okside formu (glutatyon disülfid) “GSSG”, redükte formu “GSH” şeklindedir [97]. Organizmada ki total tiyol havuzu, ya proteinlere bağlı formlarda bulunan intraselüler ve ekstraselüler tiyollerden ya da redükte/okside glutatyon gibi serbest formlardan oluşur. Sitoplazmada bulunan GSH/GSSG çiftinin görevi, protein-tiyol gruplarını oksidasyondan korumaktır [96]. Hücrelerden dolaşıma salınmış GSH’ın çoğunluğu eritrositlerde toplanır. Bu yüzden plazma düzeyleri düşüktür. Disülfid formu ağırlıkta olan sistin havuzu, serum ve ekstraselüler ortamdaki en önemli tiyol-disülfid kaynağıdır. Kanda indirgenmiş haldeki serbest tiyollere ek olarak GSH, homosistein, sistein ve sisteinilglisin de sayılabilir. Homosistin, sistin, sistinilglisin ve GSSG’de okside formdaki serbest tiyollerdir [96]. Tiyol bileşiklerinin hipokloröz asit (HOCl) ve kloraminleri yakaladığı bilinmektedir. Bu yüzden de tiyol plazmada HOCl’yi yakalayan en önemli antioksidandır [98]. Serbest tiyol grubu içeren bileşikler, radikallerle direkt veya indirekt reaksiyona girdiği için ya da protein üzerindeki serbest tiyol gruplarıyla geri dönüşümlü bağlar oluşturduğu için, proteinlerin oksidatif hasara uğramalarını önleyebilmektedirler. Aminoasitlerin çoğu, H₂O₂ varlığında, küçük değişiklikler geçirir. Tiyol grupları tüketilir ve protein üzerinde sülfid türevleri oluşur. Böylece proteinde yapısal değişiklikler meydana gelir [99]. Tiyol miktarlarının tayini, proteinlerin oksidasyondan ne kadar etkilendiklerini gösterdiği için önemlidir [99]. Diyabet, , böbrek yetmezliği, KVH, siroz, bazı nörolojik bozukluklar ve felç gibi hastalıklarda, tiyol miktarının düştüğü kanıtlanmıştır [96].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Histolojik Yöntemler

Histolojik çalışmalar için doku kesitleri alınır ve histo-patolojik değerlendirmeleri yapılır [100].

Histoloji canlıyı oluşturan elemanların yapılarını mikroskopik düzeyde inceler ve değerlendirir. Önce hücrenin temel yapısal özelliklerini daha sonra da dokuların, organların ve sistemlerin mikroskopik yapısını inceler.

3.2. Dokuları Histolojik İncelemeye Hazırlama

1. Tespit (Fiksasyon)
2. Suyunu alma (Dehidratasyon)
3. Saydamlaştırma
4. Parafinle muamele (Parafinizasyon)
5. Blok hazırlama
6. Kesit hazırlama
7. Boyama

1. Tespit (Fiksasyon)

Örneğin alındıktan sonra fiksasyona konma sürecidir. İlk hedef, dokuyu mümkün olduğunca en hızlı ve bozulmadan stabil hale getirmektir.

Bu işlemde amaca göre farklı solüsyonlar kullanılmaktadır. En yoğun tercih edilen solüsyon formalindir. %10'luk kullanılması yeterlidir.

Formalin dışında doku özelliğine bağlı olarak;
%2'lik gluteraldehit
%70–90 etanol

Bouin

Zenker solüsyonları’da kullanılabilmektedir.

Yağ bakımından zengin dokular da alkol kullanılmaz. Doku hacminin 10 katı kadar tespit solüsyonu kullanılmalıdır. Kullanılan kabın hacmi de buna göre seçilmelidir. Tespit olan dokular sertleşir. Kapların ağzı materyalin sertleştikten sonra, parçalanmadan çıkarılabilmesi için yeterince geniş olmalıdır. Tespit solüsyonu buharlaşmasın ve dökülmesin diye kaplar kapaklı olmalıdır. Materyallerin bütün yüzeyleri solüsyonla temas etmelidir. Gerekirse dokuya zarar vermeyecek şekilde doku üzerine ağırlık konularak bekletilebilir. Süresi bir gecedan az olmamalıdır.

2.Suyunu Alma (Dehidratasyon)

Doku içindeki su alınır ve yerine alkolün geçmesi sağlanır. Böylece dokular sertleşir ve mikrotomla daha kolay kesilebilir hale gelir. Sonra alkol uzaklaştırılarak yerine ksilol geçirilir. Son olarakta ksilol uzaklaştırılıp yerine parafin konulur. Her bir basamaktaki tutma süreleri dokuya ve boyama şekline göre 15 dakika ile 1 saat arasında değişmektedir.

3. Saydamlaştırma

Ksilolle yağlar eritilir ve doku saydamlaştırılır. Yine süre dokuya bağlı olarak değişmektedir.

4. Parafinizasyon

Dokular 58-65 °C parafinde en az 2 saat tutulur. Dokularda ki ksilol yerine parafin geçmiş olur. Eğer örnek kemikse ilk önce içlerinde bulunan kalsiyum alınır ve yumuşaması sağlanır. Bu işlemde özel hazırlanan %5’lik formik asit ya da %8’lik HCL + %10’luk formik asit kullanılmaktadır. Yöntemin adı dekalsifikasyondur.

5. Blok Hazırlama

Sertleşmiş dokular parafin içine gömülür ve bloklar hazırlanır. Bloklar soğuyunca artık kesilmeye hazırdır.



Şekil. 3.1. Blok hazırlama ve kesit alma. [100]

6. Kesit hazırlama

İçinde doku gömülü parafin blok, mikrotom adı verilen kesici alete yerleştirilerek kesilir. Kesitler 35–40°C su banyosuna bırakılır ve dokunun düzgün yayılması sağlanır. Lam yardımıyla alınır. Lamlar etüve konulur ve böylece doku içindeki parafin erir gider. Lamda sadece doku kesiti kalmış olur.

7. Boyama

Lamdaki dokunun boyanabilmesi için ilk olarak parafinden uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu yüzden en az 1,5 saat ksilolde bekletilir. Daha sonra alkol serilerinden geçirilir. Ardından boyama gerçekleştirilir.

Boyama, hücre ve dokuların boyaları farklı tutmalarına dayanır. Boyaların büyük kısmı suda, az kısmı ise alkol veya asetonda eritilip hazırlanır. Hangi boyanın seçileceğine dokunun özelliğine göre karar verilir. Boyamadan sonra

örnekler entellan ile kapatılır ve kuruması beklenir. Artık preparatlar mikroskopta incelenmeye hazırdır.

3.3. Histolojik Boyama Yöntemleri

Bazı örnekler;

- Hematoksilen-Eozin: Rutin boyamada kullanılır.
- Prusya mavisi: Boya değildir fakat demir birikimi sayesinde koyu boyar.
- Masson Trichrom: Kas, bağ ve sinir dokusu ayrımında kullanılır.
- Sudan Trichromi: Hücre içindeki lipitleri boyar.
- Gümüş Trichrom: Retikülin liflerini göstermede kullanılır.
- Giemsa ve Toluidin Blue: Mast hücrelerini metakromatik boyar.
- PTAH: Nöronal tümörlerde kullanılır. Çizgili kası, glial lifleri ve kollajeni histolojik olarak göstermek üzere tasarlanmıştır.
- PAS: Glikojen boyasıdır.

Işık mikroskopik incelemelerde boyanmamış preparatların dokularındaki kırma indisleri birbiriyle yakın olduğu için ayrıntılar gözlemlenemez. Ancak Farklı boyalar kullanılarak dokuların ve hücrelerin bileşenleri birbirinden ayırdedilebilir. Bu ayırt etme de kullanılan tekniklerde; renk değişikliği yapılır. Böylelikle boyanan doku içinden geçen ışığın dalga boyu değiştirilmiş olur.

Çalışmamızda; Hematoksilen & Eozin ve Masson Trichrom boyalarını kullandık.

3.3.1. Hematoksilen

Hematoksilen'in boyama özelliğini kazanabilmesi için oksidasyonla hematein'e dönüşmesi gerekmektedir. Hematoksilen tam olarak bazik bir boya değildir, amfoteriktir. Fakat özellikleri bazik bir boya gibidir ve asidofilik dokuları boyamaktadır. Mordant ile kullanılır ve böylece doku komponentleri ile boya arasındaki bağlanma kalıcı olur. Bu görev için genellikle demir tuzları tercih edilir. Değişik amaçlar ile kullanılan çeşitli tipleri bulunmaktadır. En çok kullanım amacı,

nukleer boyamadır. Bu şekilde kullanıldığı zaman hematoksilenden sonra asit boyaların sulu solüsyonları ile boyama yapılır [101].

3.3.2. Eozin

Floresan özelliğine sahip anyonik (asit) bir boyadır. Eozin, hematoksilen ile kombine edilebilen sitoplazmik bir boyadır. Alkolde de eriyebilir. Daha çok su ile hazırlanan %1'lik solüsyonları kullanılmaktadır. Hematoksilen ve eozin (H&E), çok yaygın ikili boyama yöntemidir. Çünkü çok miktarda farklı dokuları net gösterebilir. Hematoksilen nukleus DNA'sını ve asidik yapıları mavi-lacivert boyar. Çok iyi nukleer detay oluşturur. Eozin ise tam tersine sitoplazmayı ve bağ dokusu liflerini, pembe- kırmızı tonlarında boyar [101].

3.3.3. Masson Trikrom

Kollajenin arttığı hastalıklarda kullanılmaktadır.

Tespit için Bouin ya da %10 nötral formalin kullanılır.

4-5 um kalınlığında kesit alınır.

Weigert demir hematoksilen+Asit fuksin+Anilin mavisi kullanılarak çalıştırılan üçlü boyamadır.

Kollajen: Mavi

Çekirdekler: siyah

Sitoplazma: kırmızı

Kas lifleri: kırmızı

Kollajenin çok olduğu dokularda anilin mavisi yerine light green de kullanılabilir.

Kollajen lifler: Yeşil boyanır.

Çalışmamız Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı (karar no:2020-2-17) ile Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır. Tüm prosedürler etik kurallara ve Helsinki İlkeler Bildirgesi'ne bağlı kalınarak gerçekleştirilmiştir.

Wistar Albino cinsi, 54 adet 8 haftalık (150-300 gr) erkek rat kullanıldı. Hayvanlar rastgele seçildi ve 9 gruba ayrıldı. 10 gün boyunca 12 saat aydınlık/karanlık ışıktaki standart oda sıcaklığında ve nemde tutuldu. Klasik yem ve su ile beslendi. 1 gün arayla suları değiştirildi ve kafesleri temizlendi. Çalışmanın 11. gününde karaciğer dokuları alındı ve % 10'luk nötral tamponlu formalinle fikse edildi.

Deney Grupları

MTX, s.c. ; BA ve B17'de i.p. olarak uygulanmıştır.

Grup 1: (Sham Grubu): 10 gün boyunca salin enjeksiyonu yapıldı.

Grup 2: Wistar albino ratlara 1 gün MTX uygulandı. Sonraki 14 gün salin enjeksiyonu yapıldı. Buradaki amaç metotreksatın karaciğerde oluşturacağı olası hasarı ölçmektir.

Grup 3: Wistar albino ratlara 7 gün boyunca BA, 8 gün de salin enjeksiyonu uygulandı. Buradaki amaç ise borun karaciğerde tek başına nasıl bir etki göstereceğini görmektir.

Grup 4: Wistar albino ratlara 7 gün boyunca B17 vitamini uygulandı. Sonraki 8 gün ise salin enjeksiyonu yapıldı. Buradaki amaç B17 vitaminin karaciğerde tek başına nasıl bir etki göstereceğini görmektir.

Grup 5: Wistar albino ratlara 7 gün boyunca BA, sonraki 7 gün B17 vitamini uygulandı. Sonraki 1 gün ise salin enjeksiyonu yapıldı. Buradaki amaç ise BA ve B17 vitaminin karaciğerde birlikte nasıl bir etki göstereceğini görmektir.

Grup 6: Wistar albino ratlara 1 gün MTX verildi. Ardından da 7 gün boyunca B17 vitamini uygulandı. 7 gün de salin enjeksiyonu yapıldı. Buradaki amaç ise MTX hepatotoksisite hasarında B17 vitamininin iyileştirici gücüne bakmaktır.

Grup 7: Wistar albino ratlara 1 gün MTX verildi. Ardından 7 gün boyunca da BA uygulandı. 7 gün de salin enjeksiyonu yapıldı. Buradaki amaç ise metotreksatın hepatotoksisite hasarında BA'nın iyileştirici gücüne bakmaktır.

Grup 8: Wistar albino ratlara 7 gün boyunca BA verildi. Ardından 1 gün MTX uygulandı. 7 günde salin enjeksiyonu yapıldı. Buradaki amaç ise BA'nın koruyucu etkisini incelemektir.

Grup 9: Wistar albino ratlara 1 gün MTX verildi. Ardından 7 gün boyunca BA sonraki 7 gün de B17 vitamini uygulandı. Buradaki amaç ise metotreksatın

hepatotoksisite hasarında hem BA'in hem de kanser koruyucu etkisi olduğu literatürde geçen B17 vitamininin ikili kombine şekilde iyileştirici gücüne bakmaktır.

Sırasıyla enjeksiyonlar yukarıda belirtilen günlerde yapıldı. Her grupta ratlar uygun anestezi ile sakrifiye edildi. Sonra karaciğer dokularının birer parçası formol fiksatifine konularak histolojik doku takibi yapıldı (doku morfolojisi incelenmek için). Hematoksilen Eozin ve Masson Trikrom ile boyandı. Masson Trikrom boyası uygulanarak portal alan fibrozis artışı, santral ven çapları karşılaştırıldı. Aynı zamanda biyokimya analizleri için, jelli ve pıhtılaşma aktivatörlü tüp içerisine direkt kalpen kan boşaltılarak alındı. Biyokimyasal olarak karaciğer hasarının spesifik göstergeleri olan ALT (Alanin Aminotransferaz), AST (Aspartat Aminotransferaz) ve ALP (Alkalen Fosfataz), enzimlerinin serum seviyelerine; TDH (Tiyol Disülfid Dengesi), MPO (Miyeloperoksit), Katalaz, Albümin, İMA (İskemi modifiye albümin), HDL (Yüksek yoğunluklu lipoprotein), GGT (Gama Glutamil Transferaz) ve LDH (Laktat Dehidrogenaz) değerlerine bakıldı.

Çalışmamızda tüm gruplardaki ratların karaciğerleri, i.p uygulanarak oluşturulan anestezi (75mg/kg ketamin + 10mg/kg xylazine) altında yapılan dekapitasyondan sonra midsagittal insizyonla hızlıca çıkarıldı.

- %10'luk formaldehit ile tespit edildi.
- Histolojideki doku hazırlama prosedürü uygulanarak parafin bloklar hazırlandı.
- Hazırlanan bloklardan 4µm kalınlığında kesitler alındı.
- Kesitler Hematoksilen & Eozin (H&E) ve Masson Trikrom ile boyandı.
- Hazırlanan preperatlar Olympus BX43 fotomikroskop ile incelenip fotoğraflandı.
- Skorlama yapıldı.

Tablo 3.1. Çalışma grupları

	1.günde	2.günde	3.günde	4.günde	5.günde	6.günde	7.günde	8.günde	9.günde	10.günde
1.grup	Salin enj.	Salin enj.	Salin enj.	Salin enj.	Salin enj.	Salin enj.	Salin enj.	Salin enj.	Salin enj.	Salin enj.
2.grup	Sub. MTX	Salin enj.	Salin enj.	Salin enj.	Salin enj.	Salin enj.	Salin enj.	Salin enj.	Salin enj.	Salin enj.
3.grup	Ip. Bonik A.	Ip. Bonik A.	Ip. Bonik A.	Ip. Bonik A.	Ip. Bonik A.	Ip. Bonik A.	Ip. Bonik A.	Salin enj.	Salin enj.	Salin enj.
4.grup	Ip. B17	Ip. B17	Ip. B17	Ip. B17	Ip. B17	Ip. B17	Ip. B17	Salin enj.	Salin enj.	Salin enj.
5.grup	Ip. Bonik A. +B17	Ip. Bonik A. +B17	Ip. Bonik A. +B17	Ip. Bonik A. +B17	Ip. Bonik A. +B17	Ip. Bonik A. +B17	Ip. Bonik A. +B17	Salin enj.	Salin enj.	Salin enj.
6.grup	Sub. MTX	Ip. B17	Ip. B17	Ip. B17	Ip. B17	Ip. B17	Ip. B17	Ip. B17	Salin enj.	Salin enj.
7.grup	Sub. MTX	Ip. Bonik A.	Ip. Bonik A.	Ip. Bonik A.	Ip. Bonik A.	Ip. Bonik A.	Ip. Bonik A.	Ip. Bonik A.	Salin enj.	Salin enj.
8.grup	Ip. Bonik A.	Ip. Bonik A.	Ip. Bonik A.	Ip. Bonik A.	Ip. Bonik A.	Ip. Bonik A.	Ip. Bonik A.	Sub. MTX	Salin enj.	Salin enj.
9.grup	Sub. MTX	Ip. Bonik A.+ Ip. B17	Ip. Bonik A.+ Ip. B17	Ip. Bonik A.+ Ip. B17	Ip. Bonik A.+ Ip. B17	Ip. Bonik A.+ Ip. B17	Ip. Bonik A.+ Ip. B17	Ip. Bonik A.+ Ip. B17	Salin enj.	Salin enj.

Çıkarılan dokular % 10'luk nötral tamponlu formaldehit solüsyonunda 24 saat tespit edildi. İlk uygulama doku fiksasyonu (tespiti) metoduna göre sağlandı.

Tablo 3.2. Doku takibi metodu

Formaldehit	24-48 saat
Çeşme suyu	2 saat
% 75 Alkol	1 gece oda sıcaklığında
% 96 Alkol	2 saat
%100 Alkol	2 saat
Ksilen	15 dk.-30 dk.
Ksilen miktarı kadar parafin eklendi	1 saat, 65 C
Sadece Parafin	2 saat, 65C

Dokular parafine gömüldü, mikrotomla 4µm inceliğinde kesitler alındı.
Alınan kesitler preparat haline getirildi.

Tablo 3.3. Hematoksilen-Eozin boya prosedürü

Etüvde deparafinizasyon	2 saat-1 gece
Ksilol	30 dakika
% 100 (Absolü) Alkol	2 dakika
% 96 Alkol	2 dakika
% 75 Alkol	2 dakika
Suda Çalkala	15-30 saniye
Hematoksilen	2-5 dakika
Suda yıkama	Boya gidene kadar
Eozin	1dk.-3dk
Suda yıkama	Boya gidene kadar
% 75 Alkol	Daldır çıkar
% 96 Alkol	2 dakika
% 100 Alkol	2 dakika
Ksilen	En az 30 dakika
Entellan ile kapatıldı	

Sonuç: Nükleuslar hematoksilen ile mor-mavi, sitoplazma ise eozinle pembe boyanır.

Tablo 3.4. Masson Trichrom boya prosedürü

Etüvde deparafinizasyon	2 saat-1 gece 65 C
Ksilen	30 dk.
%100 Alkol	2 dk.
%96 Alkol	2 dk.
% 75 Alkol	2 dk.
Distile suda çalkala	15 sn.
Eşit miktarda A ve B solüsyon karışımı damlat	10 dk.
C solüsyonundan damlat	4 dk.
D solüsyonundan damlat	4 dk.
E solüsyonundan damlat	10 dk.
F solüsyonundan damlat	5 dk.
Distile sudan geçir	10 sn.
%96 Alkol	2 sn
% 100 Alkol	2 sn.
Ksilen	2 dk.
Ksilen	2 dk.
Mounting medium ile lam kapama	

A Solüsyonu: Weigert İron Hematoxylin A

B Solüsyonu: Weigert İron Hematoxylin B

C Solüsyonu: Picric Acid Alcoholic Solüsyonu

D Solüsyonu: Ponceau Acid Fuchsin Solüsyonu

E Solüsyonu: Phosphomolybdic Acid Solüsyonu

F Solüsyonu: Light Green Solüsyonu

Sonuç: Sitoplazma, kırmızı

Eritrositler, sarı

Kolajen, yeşil

Çekirdekler, koyu kahve-siyah

3.6. Biyokimyasal Yöntemler

3.6.1. Çalışılan Parametreler

Tiyol Disülfid Homeostazisi (nativ tiyol, total tiyol, disülfid)

LOOH

MPO

Katalaz

Albumin

ALT

AST

ALP

3.6.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

DTNB, Trizma base, EDTA, sodyum borohidrat, metanol, formaldehit Triton X-100, sodyum klorür, sülfürik asit, xsylenol orange tetrasodyum, -O-dianisidin dihidroklorür, hidrobenzoik asit, amonyum demir (2) sülfat hekzahidrat , fosfat tamponu, sodyum asetat, sülfürik asit, fosfat tampon, hidrojen peroksit, amonyum molibddad .(Tüm malzemeler Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir.)

Albümin, ALT, AST ve ALP testleri ise Siemens ADVIA 1800 Automatic Analyzer (siemens healthycare GmbH, Erlangen, Almanya) cihazının ticari kitleri ile çalışılmıştır.

3.6.3. Cihazlar

Vortex (Labnet/VX100)

Santrifüj (Nüve/NF 800-R)

-80 °C derin dondurucu (Sanyo/MDF-U5386S)

Otomatik pipet (Socorex/Acura 825)

Otomatik analizör (Siemens Advia 1800)

Spektrofotometre (Hitachi)

3.6.4. Yöntemler

10 gün süre ile enjeksiyonları yapılan Wistar Albino ratlar 11. günde kanlar toplanarak Ankara Şehir Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda LOOH, MPO ve düzeyleri Roche Cobas 501 otomatik analizörü ile Nativ Tiyol, Total Tiyol, Tiyol Disülfid parametreleri ise Siemens Advia 1800 otomatik analizöründe ölçüldü.

Serum Tiyol Disülfid Homeostazis Düzeylerinin Ölçümü

Tiyol disülfid homeostaz testleri, Erel ve Neşelioğlu tarafından tanımlanan yöntem kullanılarak Siemens Advia 1800 otomatik analizöründe kolorimetrik yöntem ile ölçüldü (102).

Çalışmamızda otomatik analizörde yöntem iki kit ile çalışıldı. Birinci kit doğal tiyol reaktifi ve DTNB'den oluşan iki reaktifli bir kitti. İkinci kit ise sodyum borahidrat, total tiyol reaktifi ve DTNB'yi kapsayan bir kitti. Birinci kit ile numunelerdeki doğal tiyol içeriği, İkinci kit ile doğal tiyol ve indirgenmiş tiyollerden oluşan toplam tiyol içeriğinin ölçümü gerçekleştirildi.

Serum LOOH Düzeylerinin Ölçümü

Lipid hidroperoksit, ksilenol turuncusu yöntemi ile ölçüldü. Yöntem, ilk olarak Jiang ve ark. tarafından tarif edilen asidik bir ortam içerisinde, Fe^{+2} 'nin LOOH ile Fe^{+3} 'e oksidize olması ilkesine dayanır (79,83). Oluşan Fe^{+3} , ksilenol turuncusu (o-cresosulfonephthalein-ksilenol 3,30-bismethylimino-diasetik asit; XOF) ile kompleks oluşturarak, 550-570 nm'de maksimum absorbans veren mor bir boya spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Spektrofotometrik ölçümlerde roche marka Cobas C 501 model otomatik analizör kullanılmıştır.

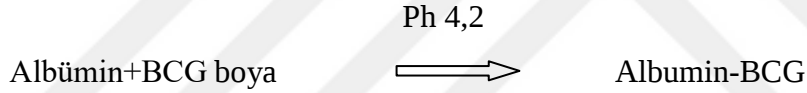
Serum MPO Düzeylerinin Ölçümü

Serum MPO Düzeylerinin Ölçümü 0,1 ml numune ile 2,9ml pH: 6 olan 0,167 mg/ml 0-dianisidine ve 0,0005% H₂O₂ içeren 50 mM fosfat tamponu karıştırılır. Serum MPO aktivitesi ortamda H₂O₂ varken O- dianisidinin MPO ile oksidasyonu prensibine dayanır (143). Ortamdaki enzim aktivitesine bağlı olarak, zamanla oluşan sarı renkli ürünün şiddeti, 460 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Albümin Ölçüm Yöntemi

Albümin testinde serum albümini BCG'ye bağlanarak 596/694nm'de bir son nokta reaksiyonu olarak ölçülen bir albümin-BCG kompleksi oluşturur.

Laboratuvar analizleri Ankara Şehir Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında ADVIA Chemistry cihazıyla gerçekleştirildi.



ALT, AST, ALP Ölçüm Yöntemi

ALT, AST ve ALP testleri, Siemens ADVIA 1800 Automatic Analyzer (siemens healthycare GmbH, Erlangen, Almanya) cihazının ticari kitleri ile çalışıldı.

Katalaz Ölçüm Yöntemi

Katalaz enzimi hidrojen peroksidi tüketerek ortaya su ve oksijen çıkartır [102]. Geriye kalan hidrojen peroksit sonradan eklenen amonyum molibdat ile birleşerek bir kompleks oluşturur. Sarı renkli bu kompleksin absorpsansı 412 nm'de ölçülerek sonuçlar kU/L olarak ifade edilir.

İstatistiksel Yöntemler

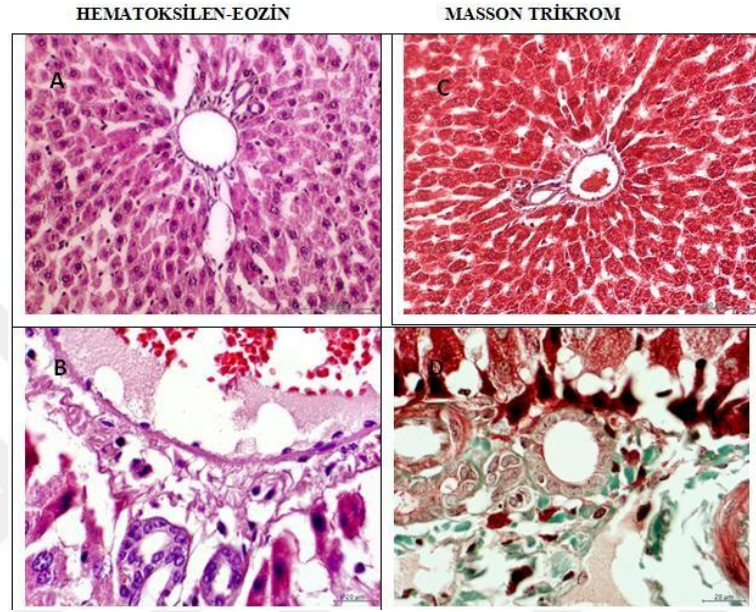
Veriler, verilerin normal dağılıp dağılmadığını belirlemek için görsel (histogramlar, olasılık grafikleri) ve istatistiksel yöntemler (Kolmogorov-Smirnov testi ve Shapiro-Wilktest) kullanılarak değerlendirildi. Tanımlayıcı analizler, normal dağılım göstermiş değişkenler için ortalama ve standart sapma (ortalama $\pm$ SD) kullanılarak sunuldu. Veriler normal olarak dağıtıldığından, parametreleri gruplar arasında karşılaştırmak için tek yönlü ANOVA yapıldı. İstatistiksel anlamlılık sonucunu çıkarmak için genel% 5 tip 1 hata kullanıldı. İstatistiksel analizler ve rakamlar SPSS yazılım versiyonu 20 (SPSS Inc. Chicago, IL, ABD) kullanılarak yapıldı.



4. BULGULAR

4.1. Gruplar

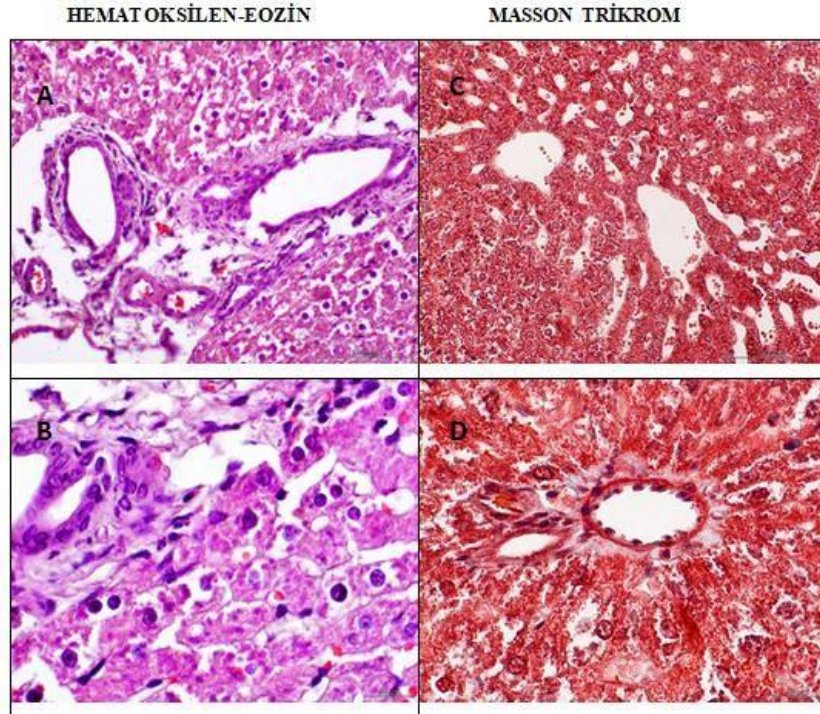
4.1.1. Grup 1 (Kontrol Grubu)



Şekil 4.1. Grup1 ışık mikroskopik görüntüleme; A,C: 40X, B,D: 100X.

Grup 1’de sinüzoidler, hepatositler, sinüzoidal hücreler ve portal alanlar normal gözlemlendi, fibrozis görülmedi. Parankim hücrelerinin (hepatositler) santral ven etrafına düzenli olarak yerleşip hepatosit kordonlarını oluşturduğu gözlemlendi. Bu kordonlar arasında sinüzoidlerin düzgün bir şekilde dizildiği izlendi. Hepatositlerde veziküler nükleuslar ve asidofilik stoplazma mevcuttu. Hepatik lobüllerin etrafındaki portal alanlarda portal ven dalı, safra duktusu ve arteriyol gözlemlendi. İnflamatuar infiltrasyon, vasküler konjesyon-tromboz, sinüzoidal dilatasyon ve hepatosit dejenerasyonu bulguları görülmedi.

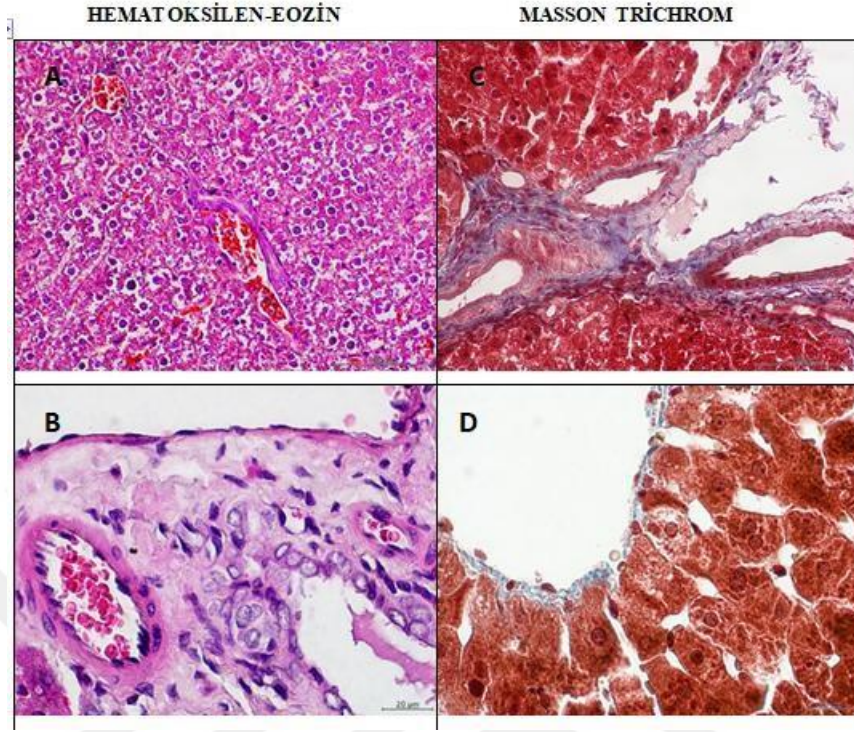
4.1.2. Grup 2 (MTX)



Şekil 4.2. Grup2 ışık mikroskopik görüntüleme; A,B,C,D: 40X.

Tek doz MTX uygulanan grup 2'de vasküler konjesyon, sinüzoidal dilatasyon, inflamatuvar infiltrasyon, hepatosit dejenerasyonu ve hepatositlerde hidropik değişiklikler saptandı. Bundan dolayı grup 2'deki hayvanlar kontrol ile kıyaslandığında tüm parametreler bakımından hasarın artmış olduğu gözlemlendi ($P<0.001$). Kolajen lif artışı yok, kılcal dilatasyon var, vasküler yapılar korundu. Hücre içi vakualizasyon, kapiller vazodilatasyon, sitoplazmik bulgular ayırt edilmekte.

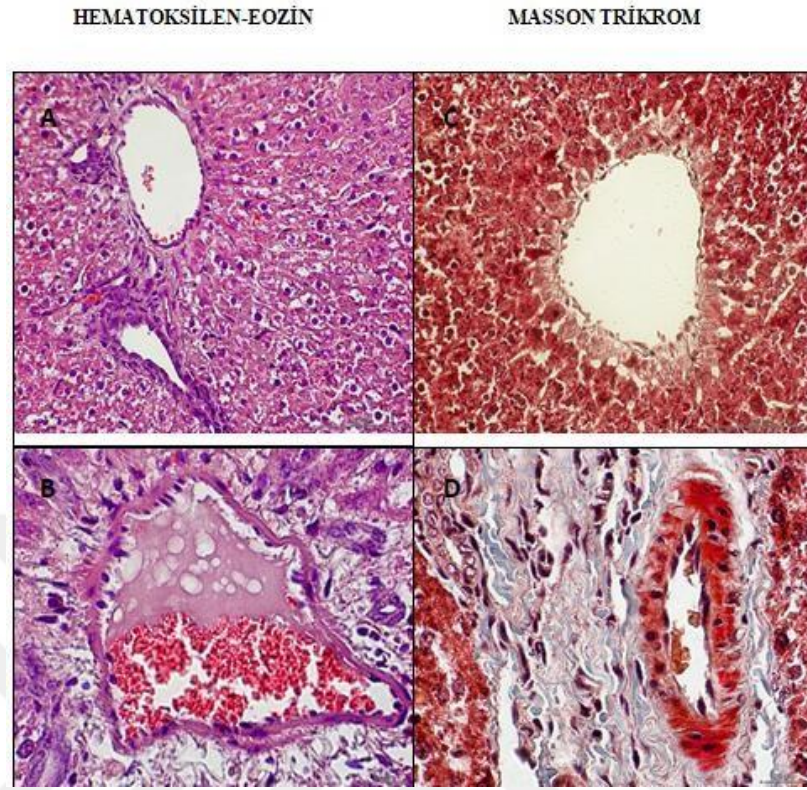
4.1.3. Grup 3 (BA)



Şekil 4.3. Grup3 ışık mikroskopik görüntüleme; A,C: 40X./ B,D: 100X.

Bu grupta BA'ın ratlara verilme amacı BA'ten beklenen etkilere daha sağlıklı bir yorum yapabilmek için önce tek başına karaciğere nasıl bir etkide bulunacağına bakmaktır. Yapılan histolojik incelemelerde kontrol grubuna yakın ışık mikroskopik görüntüler elde edildi. Grup 3'te uygulanan BA'ya bağlı olarak lobül çevresinde tıkanıklık ve hepatositlerin çekirdeği etrafında sitoplazmik vakuoller görüldü. Vasküler yapılarda patolojik değişiklik saptanmadı ve hepatosit hücre zarı da korundu. Vasküler bölgede sorun yok, sitoplazmik değişiklikler belirgindir, dokuda tıkanıklık belirtileri var, hidropik dejenerasyon ayırt ediliyor. Vasküler bölgede kollajen lifleri belirgindir, vasküler yapı korunmuştur ve endotel hasarı tespit edilmemiştir.

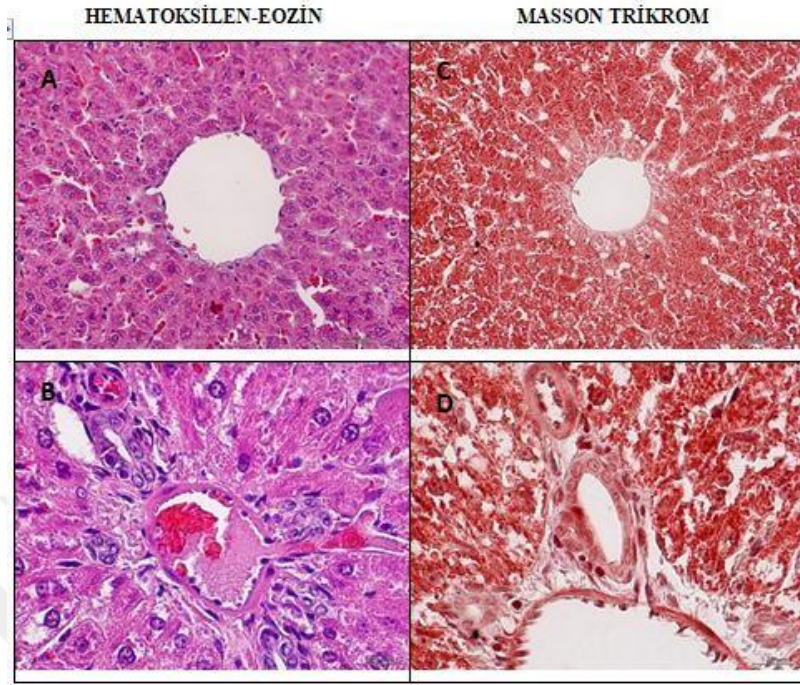
4.1.4. Grup 4 (B17)



Şekil 4.4. Grup 4 ışık mikroskopik görüntüleme ; A,C: 40X / B,D:100X.

Hepatosit dejenerasyonu oldukça belirgindir. Damar içinde kolloid benzeri birikimler vardır.

4.1.5. Grup 5 (BA+B17)

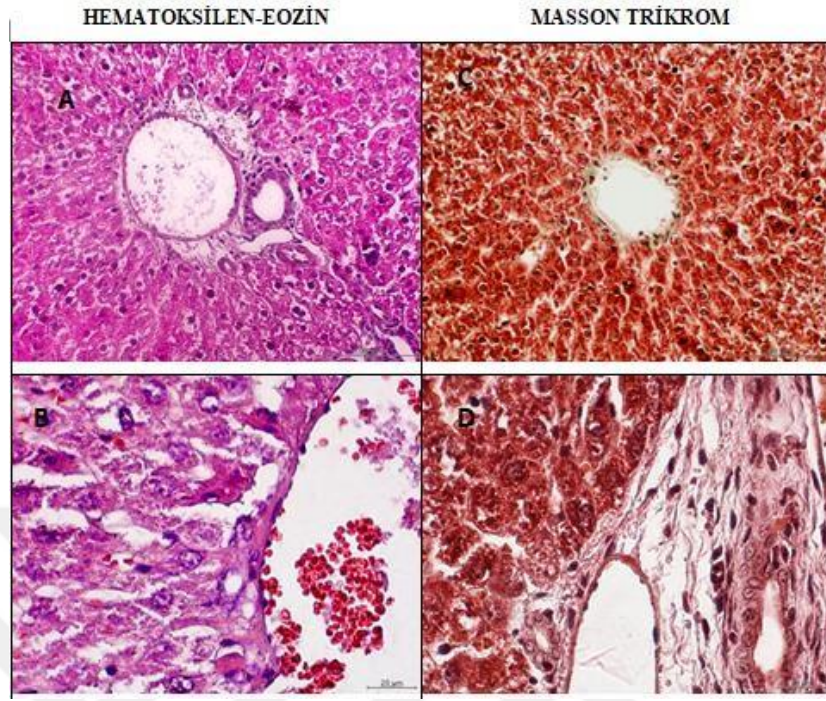


Şekil 4.5. Grup 5 ışık mikroskopik görüntüleme ; A,C: 20X / B,D:100X.

Bu gruba ait karaciğerler histolojik olarak incelendiğinde hepatosit dejenerasyonu, sinüzoidal dilatasyon, vasküler konjesyon-tromboz açısından görülen değişikliklerin sadece grup 2'ye göre net ve istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) azalma gösterdiği gözlemlendi. İnflamatuvar infiltrasyon bakımından 2 grup arasındaki farkın istatistiksel bakımdan anlamsız olduğu gözlemlendi.

Sadece B17 verilen 4.gruba göre bu gruptaki dejenerasyon alanları daha azdır. Konjesyon yoktur. BA dejenerasyonu az da olsa engellese de koloidi engelleyememiştir. Kolloid birikimi hala mevcuttur.

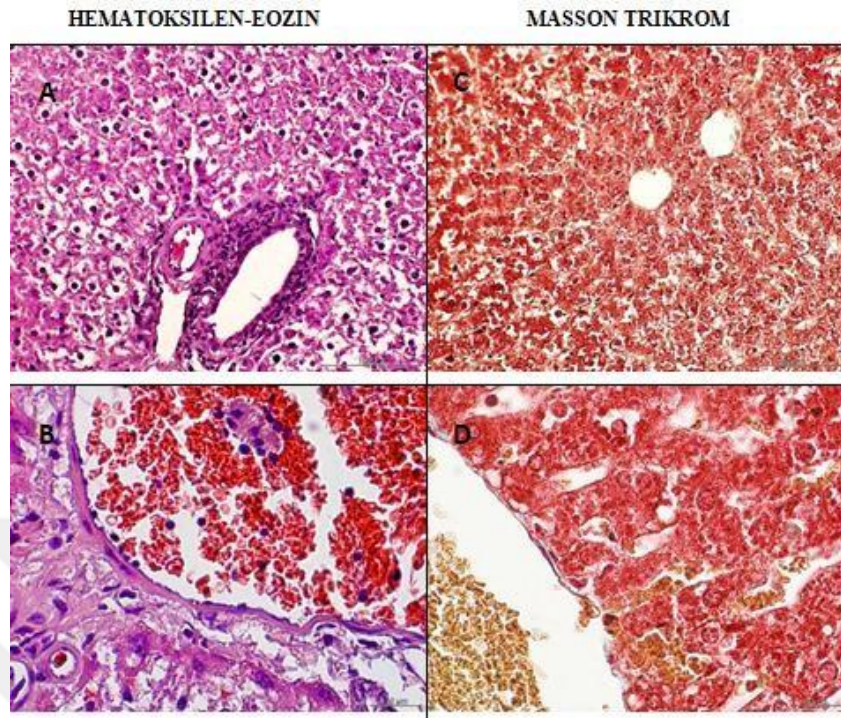
4.1.6. Grup 6 (MTX+B17)



Şekil 4.6. Grup 6 ışık mikroskopik görüntüleme A,C: 20X / B,D:100X.

Sadece MTX verilen grup 2'ye göre sonuçların daha kötü olduğu gözlemlendi. Sitoplazmik dejenerasyon yoktur. Vasküler dilatasyon mevcuttur. Çalışmadaki parametrelere göre grup 2-6 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

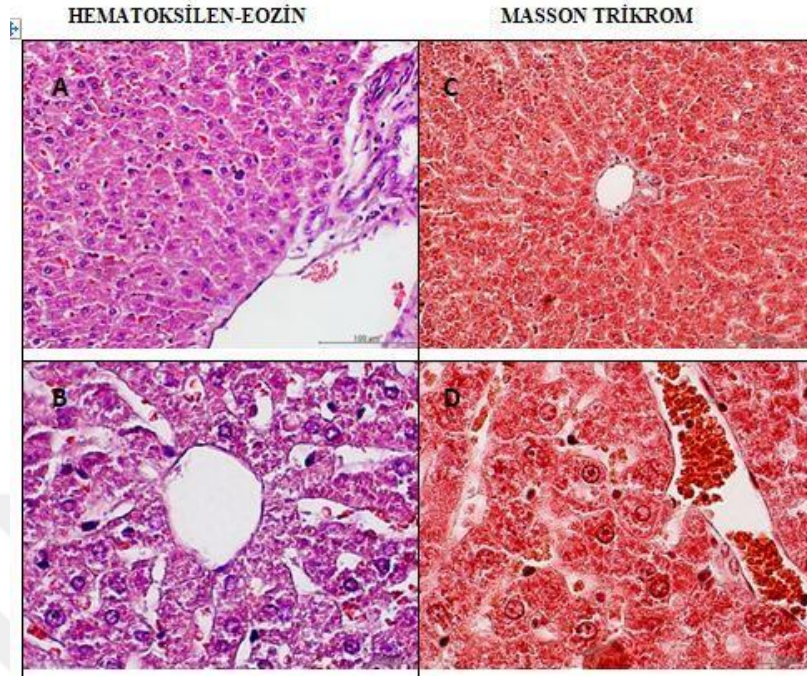
4.1.7. GRUP 7 (MTX+BA)



Şekil 4.7. Grup 7 ışık mikroskopik görüntüleme A,C:40X / B,D:100X.

Önce MTX sonra BA uygulanan ve BA'nın terapötik etkisini gözlemlemeyi amaçlayan 7. grupta damar tıkanıklığı bulguları vardır. İnterstisyel alandaki yerlerde mononükleer hücre infiltrasyonu bulundu. Portal alan etrafındaki (lobülün çevresinde) hepatositlerde hidropik dejenerasyon gözlemlendi. Vasküler konjesyon bulguları hala mevcut. Merkeze doğru hepatosit yapısı korunmuş gibi görünmektedir. Kolajen lifte artış saptanmamıştır.

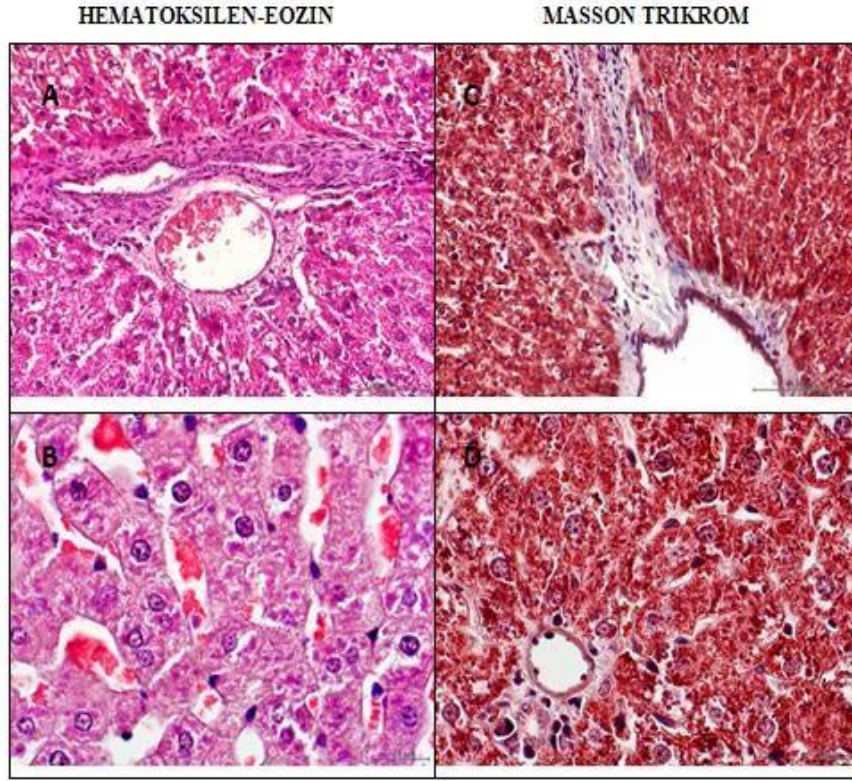
4.1.8. GRUP 8 (BA+MTX)



Şekil 4.8. Grup 8 ışık mikroskopik görüntüleme A,C:40X / B,D:100X.

Portal alan etrafı az dejeneredir. Önce BA uygulanıp ardından MTX uygulanan ve BA'nın koruyucu etkisinin gözlenmesinin amaçlandığı grup 8'deki hepatosit dejenerasyonunun MTX verilen grup 2'ye göre çok daha az olduğu belirlendi. Hepatik lobül yapısının korunduğu ve kontrol grubuna benzer olduğu, hepatosit sitoplazmalarında vakuolizasyonun daha az olduğu görüldü. Fibrozis yoktur. BA'nın koruyucu etkisinin tedavi edici özelliğinden daha etkili olduğu gözlemlenmiştir.

4.1.9. Grup 9 (MTX+BA+B17)

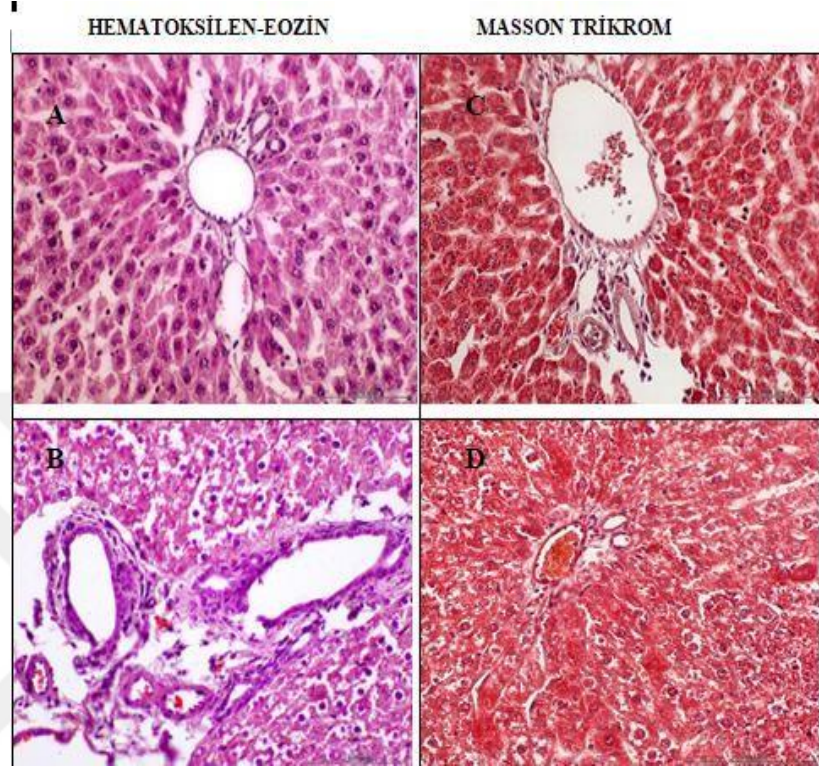


Şekil 4.9. Grup 9 ışık mikroskopik görüntüleme 40X,100X.

BA ve B17'nin kombine etkisi tek başlarına olan etkilerine kıyasla MTX tedavisinde daha çok etkili olmuştur Portal alan etrafı az dejeneredir. Vakuolizasyon daha azdır.

4.2. Gruplararası Kıyaslama

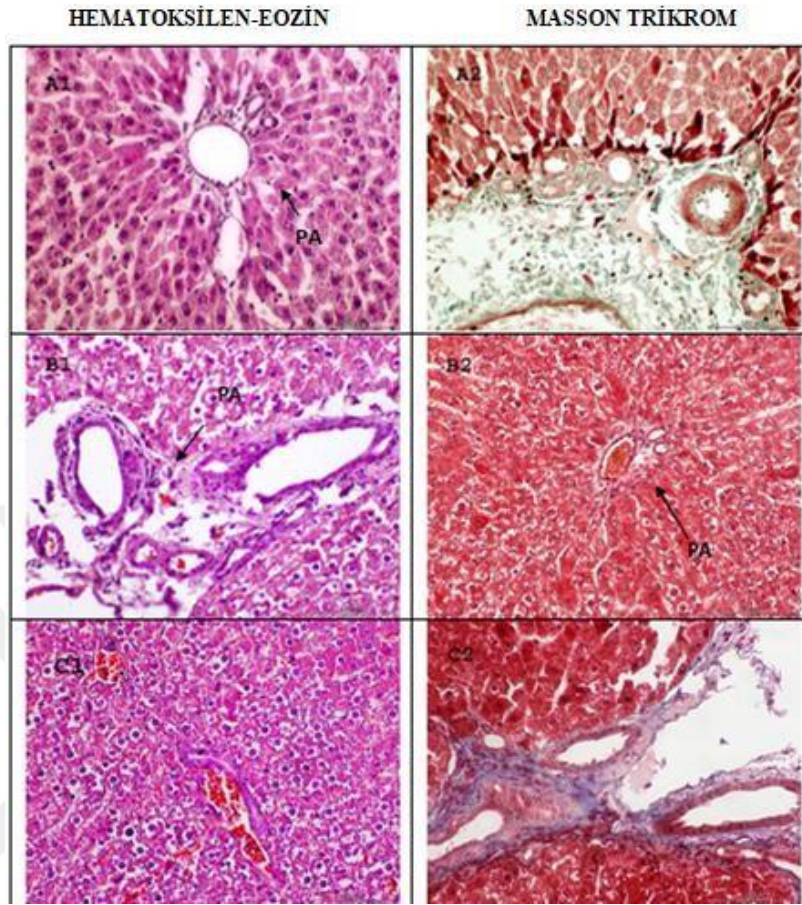
4.2.1. Kontrol-MTX



Şekil 4.10. grup 1(A, C)- grup 2(B, D) / 40 x.

Kontrol grubunda sinüzoidler, hepatositler, sinüzoidal hücreler ve portal alanlar normal olarak gözlenirken tek doz MTX uygulanan grup 2’de inflamatuvar infiltrasyon, vasküler konjesyon, sinüzoidal dilatasyon ve hepatosit dejenerasyonu periportal alanda mononükleer hücre infiltrasyonu ve hepatositlerde hidropik değişiklikler saptanmıştır. MTX verilen gruptaki hayvanlar grup 1 ile kıyaslandığında her parametre bakımından hasarın fazlalaşmış olduğu gözlemlendi. Yani sonuçlarda anlamlı bir fark görülmektedir. ($P<0.001$)

4.2.2. Kontrol-MTX-BA

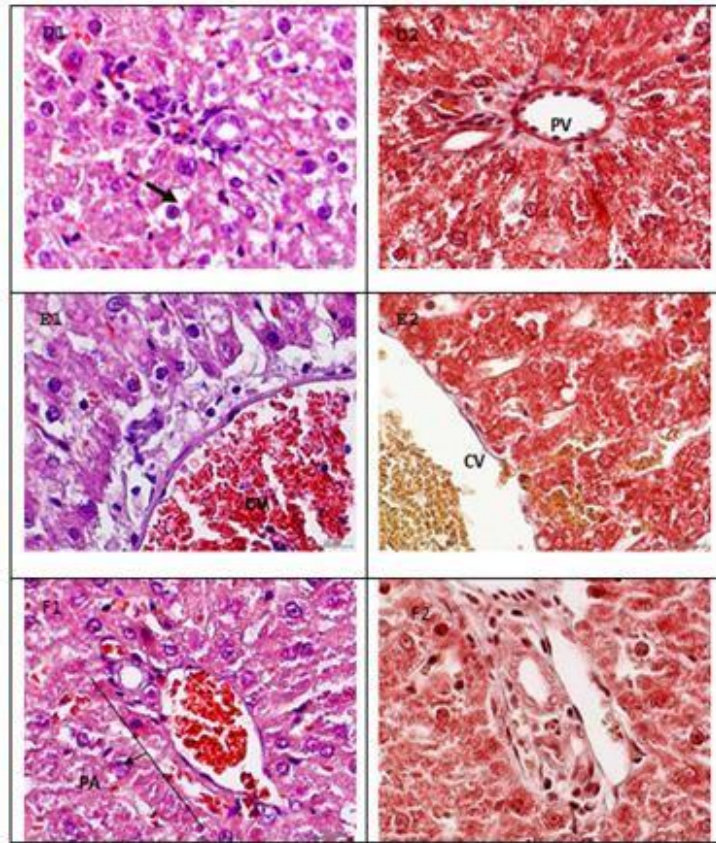


Şekil 4.11. Grup1: A1, A2; Grup 2: B1, B2; Grup 3: C1, C2 / 40X, PA: Portal Alan.

Grup 1 (kontrol), grup 2 (MTX) ve grup 3(BA) karşılaştırıldığında grup 3'te lobül çevresinde tıkanıklık ve hepatositlerin çekirdeği etrafında sitoplazmik vakuoller görüldü. Vasküler yapılarda patolojik değişiklik saptanmadı ve hepatosit hücre zarı da korundu. Sitoplazmik değişiklikler belirgin, dokuda tıkanıklık belirtileri var, hidropik dejenerasyon ayırt ediliyor. Vasküler bölgede kollajen lifleri belirgindir ve endotel hasarı tespit edilmemiştir.

4.2.3. MTX-(MTX+BA)-(BA+MTX)

HEMATOKSİLEN – EOZİN MASSON TRİKROM



Şekil 4.12. Grup2: D1, D2; Grup7:E1, E2; Grup8: F1, F2, Portal Area (PA), Portal Ven (PV), Central Ven (CV).

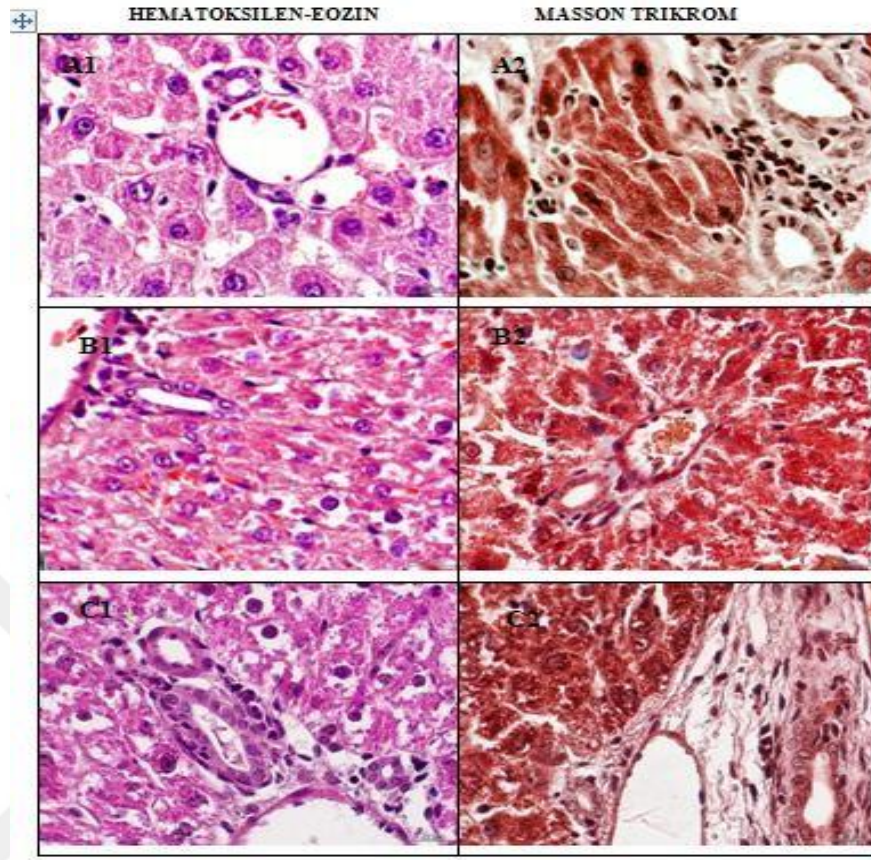
Parametrelere göre grup 2 ve 7’de, karaciğer fonksiyon testleri (ALT, AST, ALP) ve oksidasyonu yansıtan testlerin (disülfid,% disülfid / doğal tiyol, MPO, LOOH) arttığı, antioksidan parametre (doğal tiyol, toplam tiyol, katalaz, albümin) seviyelerinin de önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). BA’nın terapötik ve koruyucu etkisini değerlendirmek için 7. ve 8. gruplar grup 2 ile karşılaştırıldı; Grup 7’de tüm oksidan parametre düzeylerinin arttığı ve tüm antioksidan parametre düzeylerinin azaldığı belirlendi. Grup 8’de tüm oksidan parametre düzeylerinin azaldığı ve tüm antioksidan parametre düzeylerinin arttığı belirlendi. Önce BA uygulanıp ardından MTX uygulanan ve BA’nın koruyucu etkisinin gözlenmesinin amaçlandığı grup 8’deki hepatosit dejenerasyonunun MTX verilen grup 2’ye göre çok daha az olduğu belirlendi. Hepatik lobül yapısının korunduğu ve kontrol grubuna benzer olduğu, hepatosit sitoplazmalarında vakuolizasyonun daha az olduğu görüldü.

Fibrozis bulunmadı. Borun koruyucu etkisinin tedavi edici özelliğinden daha etkili olduğu gözlemlendi.

MTX'tan dolayı oluşan hepatotoksik doku hasarları Şekil. 4.2'de gösterilmiştir. Karaciğer dokusunda ortaya çıkan inflamatuvar infiltrasyon, hepatosit dejenerasyonu sinüzoidal dilatasyon ve vasküler konjesyon-tromboz; MTX ve MTX+borik asit gruplarında kontrol grubuna göre artmış bulunmaktadır.



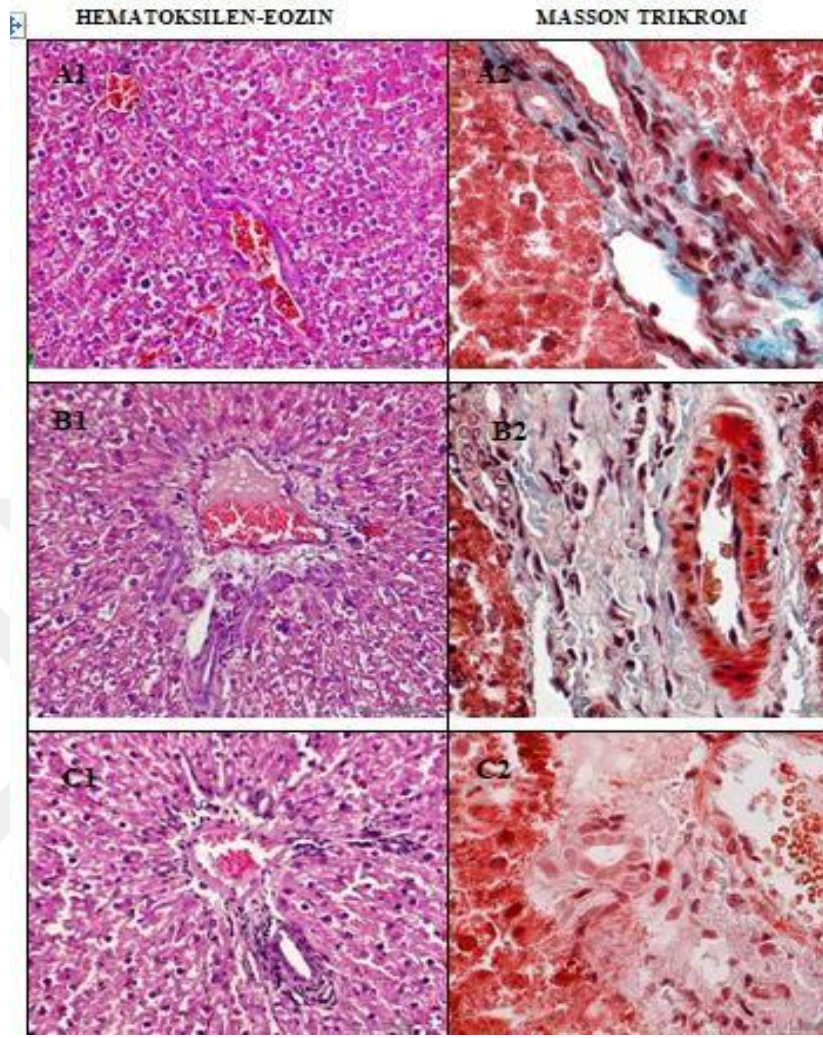
4.2.4. Kontrol-MTX-(MTX+B17)



Şekil 4.13. Grup1:A1,A2 / Grup2:B1,B2 / Grup6:C1,C2/100X.

MTX+B17 grubunda sonuçlar MTX verilen gruptan çok farklı değildir. Sitoplazmik dejenerasyon yoktur. Vasküler dilatasyon mevcuttur. Çalışmadaki parametrelere göre grup 2 ve 6 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

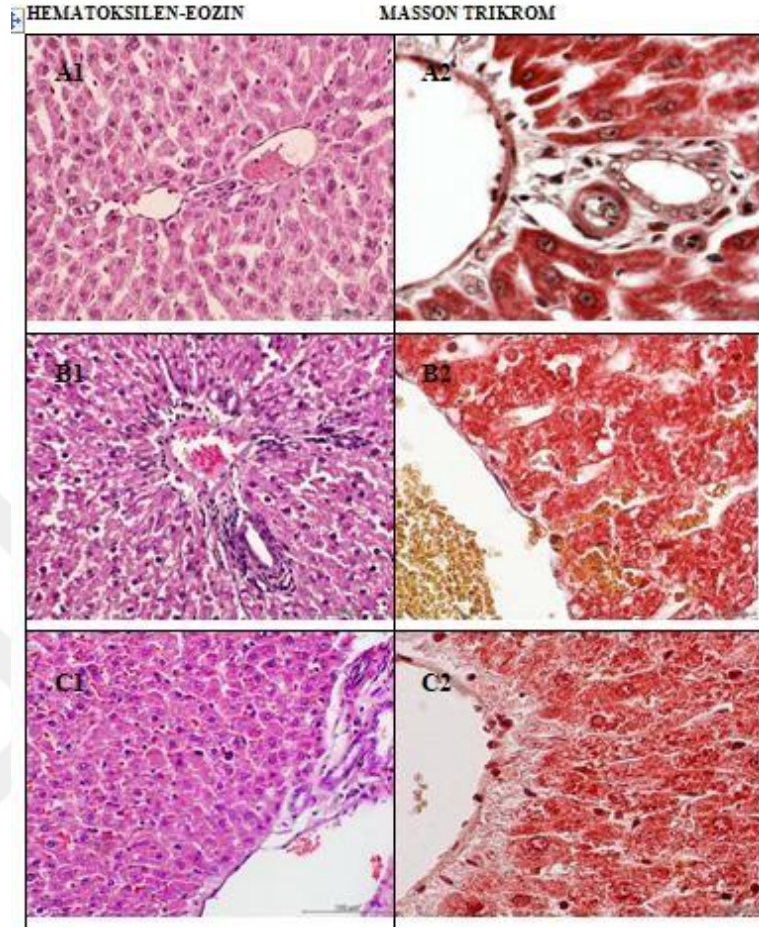
4.2.5. BA-B17-(BA+B17)



Şekil 4.14. Grup 3:A1,A2 / Grup 4:B1,B2 / Grup 5:C1,C2 /Hematoksilen:40X, Masson:100X.

B17 Wistar Albino ratlara tek başına uygulandığında hepatosit hasarının oldukça çok olduğu görüldü. Fakat BA ile birlikte verildiğinde sonuçların olumlu olduğu gözlemlendi.

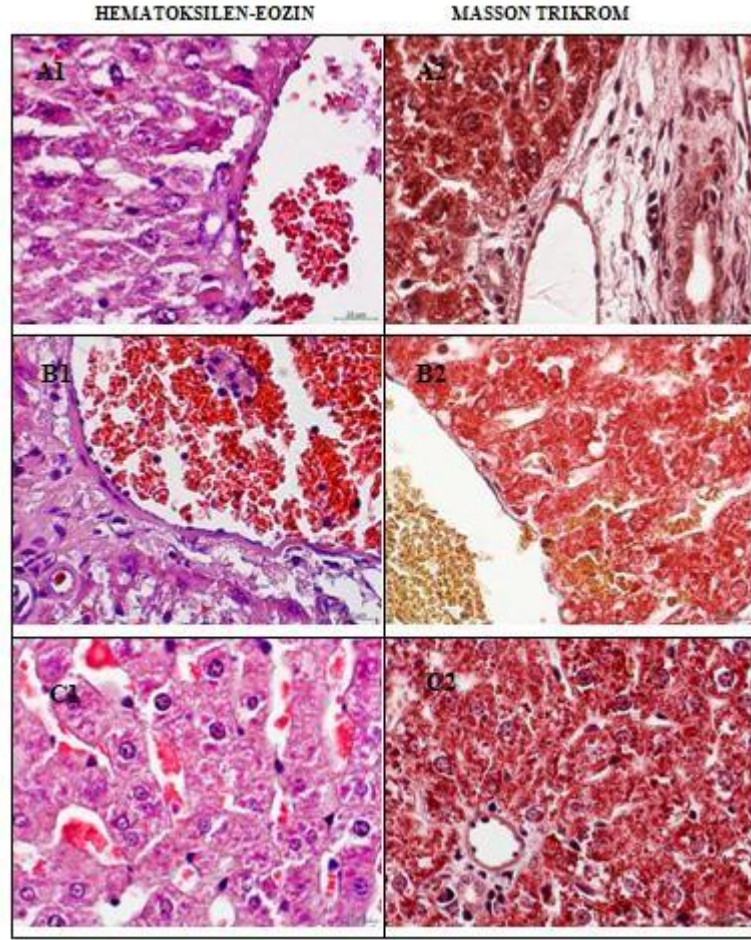
4.2.6. Kontrol-(MTX+BA)-(BA+MTX)



Şekil 4.15. Grup1: A1,A2/ Grup7: B1,B2/ Grup8: C1,C2/ Hematoksilen:40X, Masson:100X.

BA'nın profilaktik kullanımının tedavi edici etkisinden çok daha etkili olduğu ve hepatotoksiteyi önlediği gözlemlendi.

4.2.7. (MTX+B17)- (MTX+BA)- (MTX+BA+B17)



Şekil 4.16. Grup 6: A1,A2/ Grup7:B1,B2/ Grup 9:C1,C2/ 100X.

B17'nin MTX hasarına pek etkisi olmamıştır. Ama BA ile birlikte uygulandığında hepatotoksisiteye olumlu etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 4.1. BA'in ve B17'nin MTX'a Etkileri.

Grup 2 (MTX)	Sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu ve hepatositlerde hidropik değişiklikler saptandı. Kolajen lif artışı yok, kılcal dilatasyon var, vasküler yapılar korundu.
Grup 6 (MTX+B17)	Sadece MTX verilen grup 2'ye göre sonuçların daha kötü olduğu gözlemlendi. Sitoplazmik dejenerasyon yoktur. Vasküler dilatasyon mevcuttur. Çalışmadaki parametrelere göre grup 2-6 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.
Grup 7 (MTX+BA)	Önce MTX sonra BA uygulanan ve BA'nın terapötik etkisini gözlemlemeyi amaçlayan 7. grupta damar tıkanıklığı bulguları vardır. Interstiyel alandaki yerlerde mononükleer hücre infiltrasyonu bulundu. Portal alan etrafındaki (lobülün çevresinde) hepatositlerde hidropik dejenerasyon gözlemlendi. Vasküler konjesyon bulguları hala mevcut. Merkeze doğru hepatosit yapısı korunmuş gibi görünmektedir. Kolajen lifte artış saptanmamıştır.
Grup 8 (BA+MTX)	Portal alan etrafı az dejenere dir. Önce BA uygulanıp ardından MTX uygulanan ve BA'nın koruyucu etkisinin gözlenmesinin amaçlandığı grup 8'deki hepatosit dejenerasyonunun MTX verilen grup 2'ye göre çok daha az olduğu belirlendi. Hepatik lobül yapısının korunduğu ve kontrol grubuna benzer olduğu, hepatosit sitoplazmalarında vakuolizasyonun daha az olduğu görüldü. Fibrozis görülmedi. BA'nın koruyucu etkisinin tedavi edici özelliğinden daha etkili olduğu gözlemlenmiştir.
Grup 9 (MTX+BA+B17)	BA ve B17'nin kombine etkisi tek başlarına olan etkilerine kıyasla MTX tedavisinde daha çok etkili olmuştur. Portal alan etrafı az dejenere dir. Vakuolizasyon daha azdır.

3.5. Skarlama

Her gruptaki kesitler histolojik açıdan, hepatosit dejenerasyonu ve sinüzoidal dilatasyon göz önünde tutularak incelendi. Kesitlerin herbiri 0-3 arasında (sırayla hasarsız, az miktarda hasar, orta hasar ve şiddetli hasar) skarlama yöntemiyle skorlandı.

Tablo 4.2 Skarlama.

Karaciğer Normal	0
Hasar Az	1
Hasar Orta	2
Hasar şiddetli	3

Hepatosit Dejenerasyonu ve Sinüzoidal Dilatasyon Skorlaması

1.GRUP

	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Rat 6
Zon 1	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
Zon 2	0	0	0	1	0	0
	1	0	1	1	0	1
	0	0	0	0	0	0
Zon 3	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0

2.GRUP

	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Rat 6
Zon 1	1	1	1	1	0	1
	1	2	2	2	1	1
	2	1	2	1	1	1
Zon 2	2	2	2	2	1	1
	2	1	3	0	1	1
	2	2	2	2	1	1
Zon 3	2	3	3	1	2	2
	3	2	1	1	2	2
	2	3	2	0	3	2

3.GRUP

	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Rat 6
Zon 1	1	1	0	0	1	1
	1	0	0	0	1	0
	1	0	0	0	1	1
Zon 2	1	2	0	0	1	0
	1	1	0	0	1	1
	2	2	0	0	1	0
Zon 3	0	0	1	0	1	0
	0	1	0	0	1	0
	0	1	0	0	1	0

4.GRUP

	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Rat 6
Zon 1	2	0	1	2	1	1
	2	1	1	2	1	1
	2	2	1	1	1	1
Zon 2	2	1	2	3	1	2
	2	2	2	3	1	2
	2	3	2	2	1	2
Zon 3	1	1	2	1	2	1
	1	1	1	2	2	1
	0	2	2	1	2	1

5.GRUP

	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Rat 6
Zon 1	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
Zon 2	1	2	1	1	0	0
	2	1	1	0	0	0
	1	1	1	0	0	0
Zon 3	0	1	1	0	0	0
	1	1	1	0	0	0
	2	0	1	0	0	0

6.GRUP

	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Rat 6
Zon 1	1	0	3	0	3	1
	1	0	3	1	3	1
	3	0	3	1	3	2
Zon 2	2	2	3	2	3	2
	1	1	3	1	3	2
	3	1	3	1	3	2
Zon 3	1	1	3	2	3	2
	0	2	3	2	3	1
	3	2	3	2	3	2

7.GRUP

	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Rat 6
Zon 1	1	2	0	2	2	2
	1	2	2	1	2	2
	1	2	2	2	2	1
Zon 2	2	2	1	1	0	1
	2	2	1	1	1	1
	2	1	1	1	0	2
Zon 3	1	0	1	1	0	2
	2	2	2	2	1	2
	1	0	0	0	0	1

8.GRUP

	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Rat 6
Zon 1	0	1	0	0	0	0
	0	0	0	1	0	0
	0	0	0	0	0	0
Zon 2	0	0	1	0	0	0
	0	0	0	0	0	1
	0	1	0	0	1	0
Zon 3	0	0	0	1	0	0
	0	0	1	0	0	0
	0	0	0	0	0	0

9.GRUP

	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Rat 6
Zon 1	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
Zon 2	1	1	1	0	1	1
	1	0	1	0	0	1
	1	1	1	1	0	1
Zon 3	2	0	2	1	0	2
	1	0	1	0	1	1
	0	0	2	0	0	1

Tablo 4.3. Skorlama istatistiği

	Kontrol (a)	BA (b)	BA+MTX (c)	MTX+BA (d)	MTX (e)
Skorlama	0,11±0,09 ^{d,e,f,h}	0,51±0,42 ^{d,e,f,h}	0,14±0,09 ^{d,e,f,h}	1,27±0,25 ^{a,b,c,g,i}	1,59±0,37 ^{a,b,c,g,i}

	B17 (f)	BA+B17 (g)	MTX+B17 (h)	MTX+BA+B17 (i)	p-değeri
Skorlama	1,51±0,20 ^{a,b,c,g,i}	0,38±0,39 ^{d,e,f,h}	1,94±0,85 ^{a,b,c,g,i}	0,49±0,31 ^{d,e,f,h}	< 0,001

a Kontrol grubu ile 2,4,6,7 (d,e,f,h) grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark;

b BA grubu ile 2,4,6,7 (d,e,f,h) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

c (BA + Mtx) grubu ile 2,4,6,7 (d,e,f,h) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

d Mtx + BA grubu ile 1,3,5,8,9 (a,b,c,g,i) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

e Mtx grubu ile 1,3,5,8,9 (a,b,c,g,i) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

f B17 grubu ile 1,3,5,8,9 (a,b,c,g,i) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

g (BA + B17) grubu ile 2,4,6,7 (d,e,f,h) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

h (Mtx + B17) grubu ile 1,3,5,8,9 (a,b,c,g,i) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

ı (Mtx + BA + B17) grubu ile 2,4,6,7 (d,e,f,h) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

4.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

Çalışılan biyokimyasal testler; karaciğer fonksiyon testleri (ALT, AST, ALP), oksidasyonu yansıtan testler (disülfide, %disülfide/native thiol, MPO, LOOH) ve antioksidan parametre (native thiol, total thiol, katalaz, albümin) testleri şeklinde 3 gruba ayrıldı.

Laboratuvar parametrelerine göre; grup 2, 4, 6 ve 7' de diğer grupların tam tersine karaciğer fonksiyon (ALT, AST, ALP) ve oksidasyonu yansıtan test (disülfide, %disülfide/native thiol, MPO, LOOH) düzeylerinin yükseldiği ($p<0,05$), antioksidan parametre (native thiol, total thiol, katalaz, albümin) düzeylerinin ise anlamlı bir şekilde azaldığı ($p<0,05$) saptanmıştır.

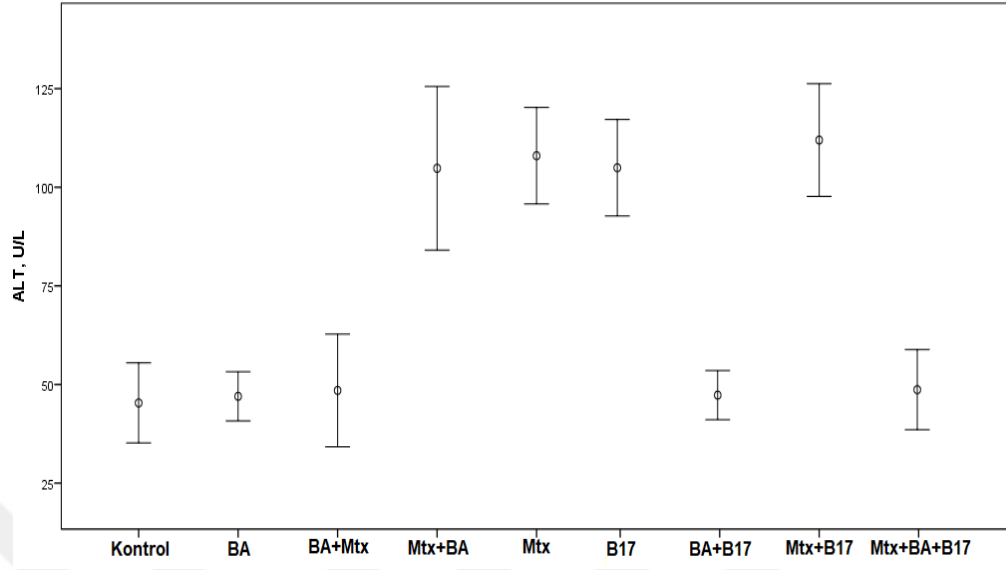
Biyokimyasal parametrelere göre deney gruplarımız ikiye ayrılmıştır;

A) Grup 1(kontrol), 3(BA), 5(BA+B17), 8(BA+MTX), 9(MTX+BA+B17)

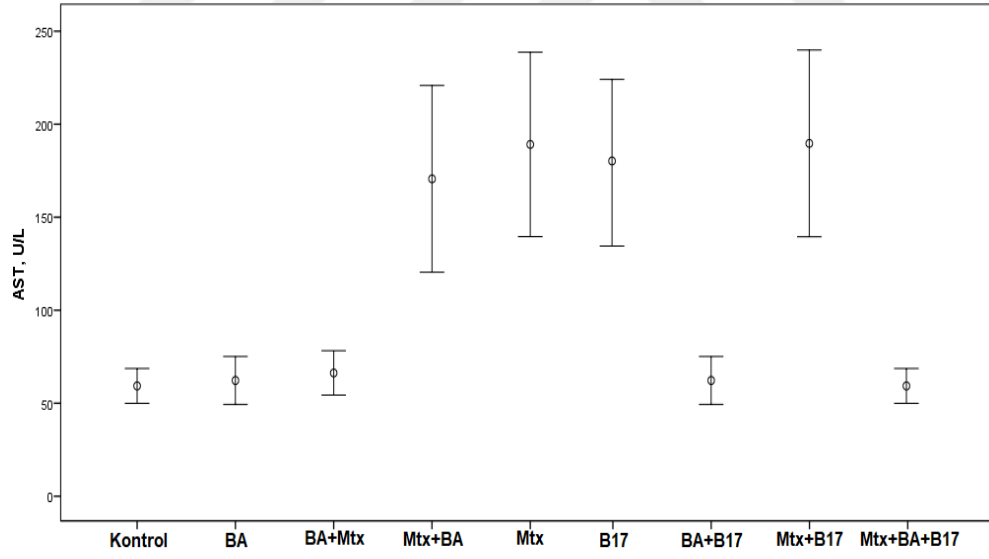
B) Grup 2(mtx), 4(B17), 6(MTX+B17), 7(MTX+BA)

A ve B grupları arasında anlamlı fark vardır. Fakat grupların kendi içlerinde birbirleriyle anlamlı farklar bulunmamaktadır (Bkz. Tablo 9).

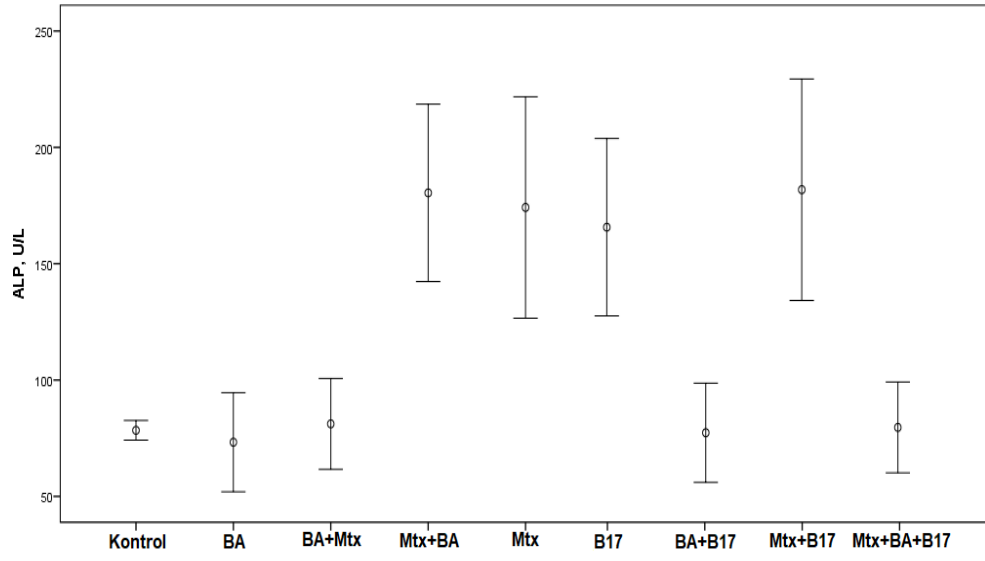
4.3.1. Karaciğer Fonksiyon Testleri



Şekil 4.17. ALT sonuçları.

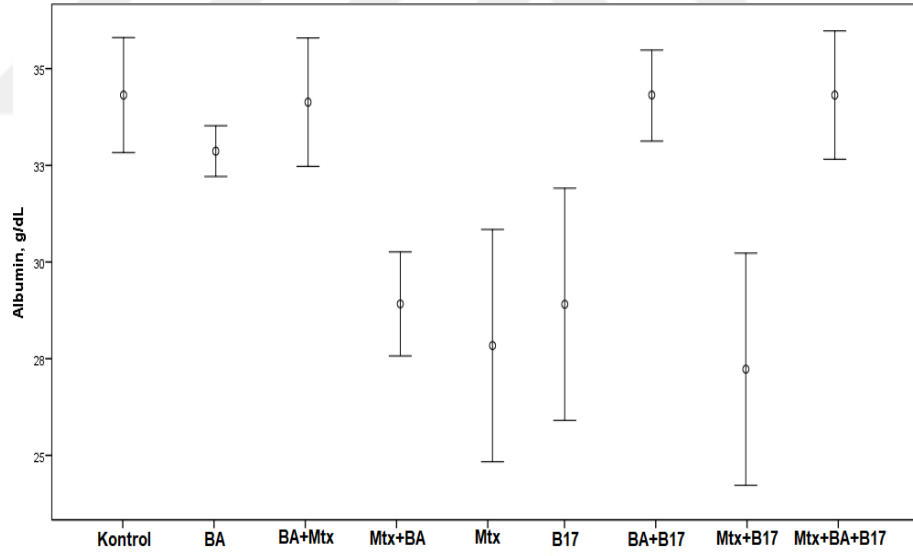


Şekil 4.18. AST sonuçları.

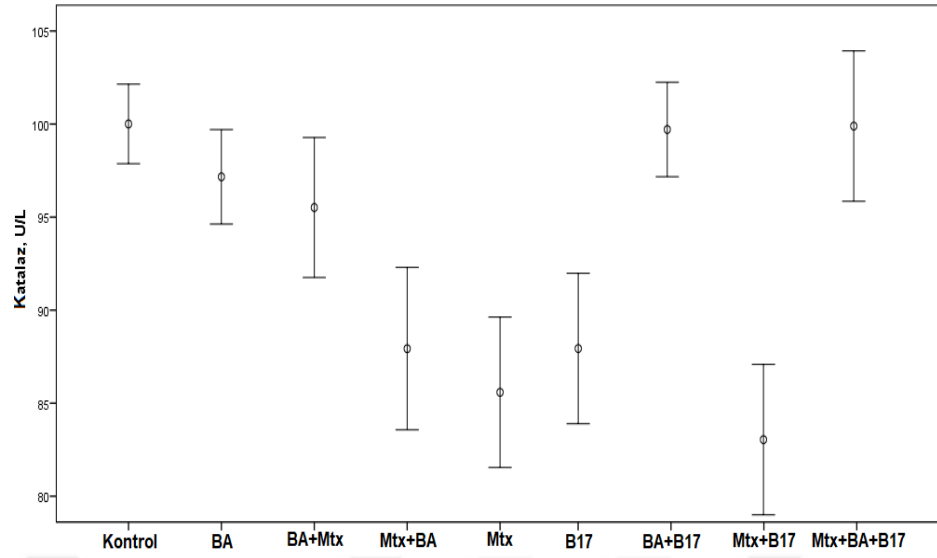


Şekil 4.19. ALP sonuçları.

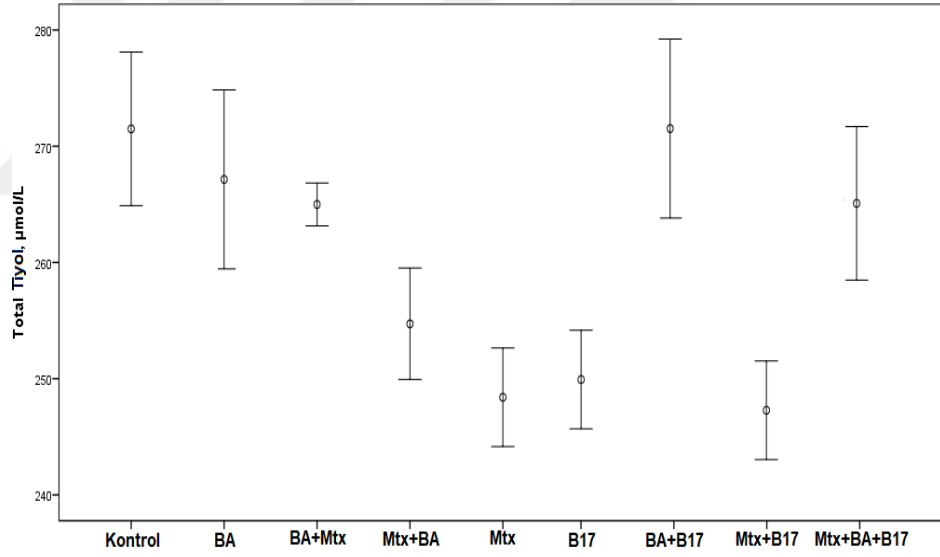
4.3.2. Antioksidan Parametreler



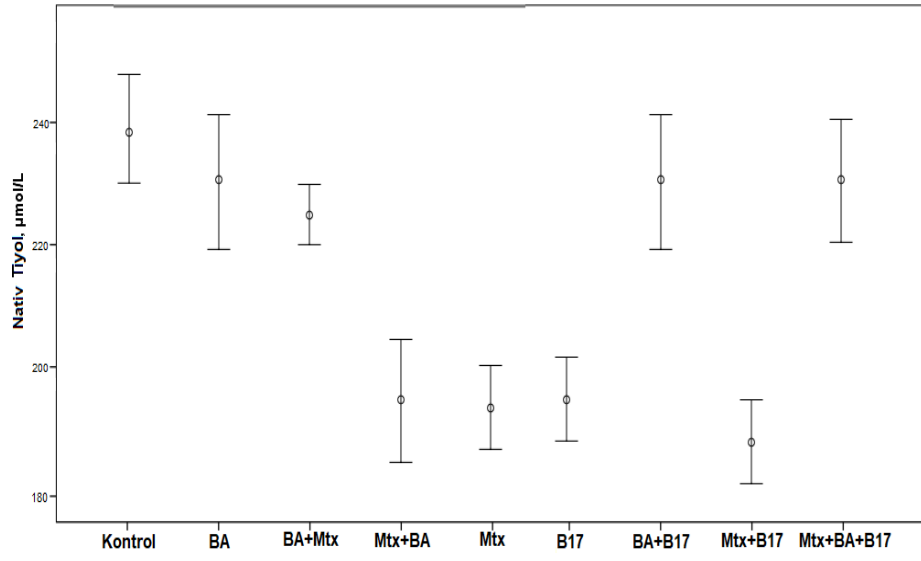
Şekil 4.20. Albumin sonuçları.



Şekil.4.21. Katalaz sonuçları.

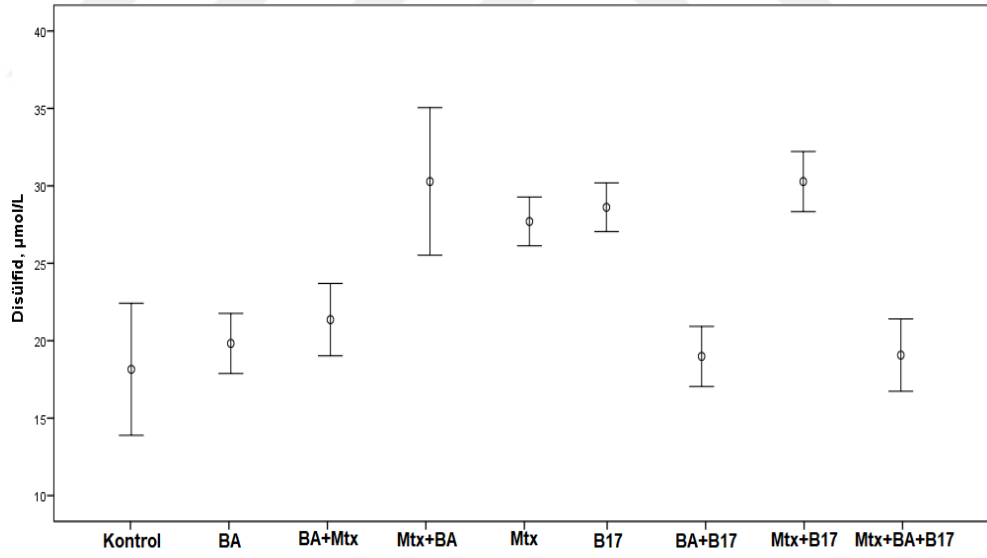


Şekil 4.22. Total tiyoL sonuçları.

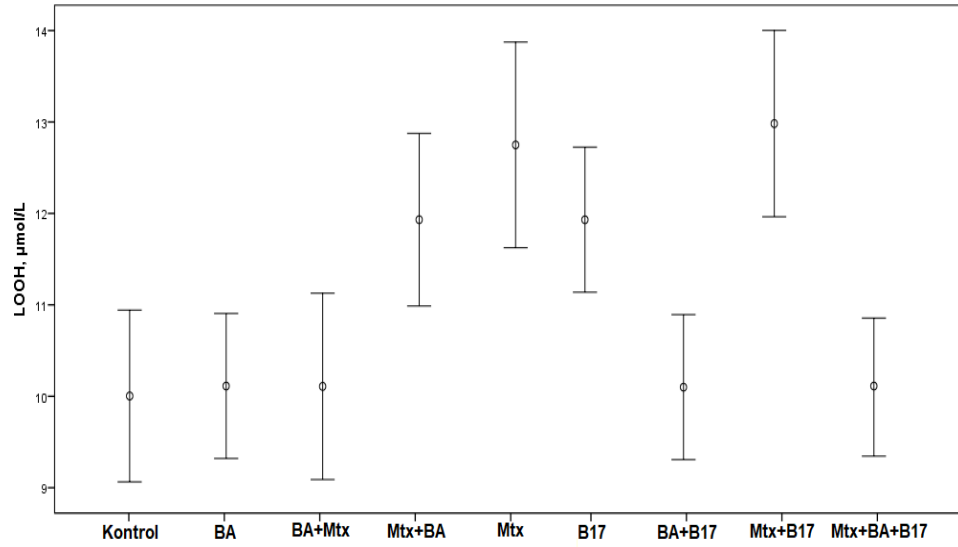


Şekil 4.23. Nativ tiyoL sonuçları.

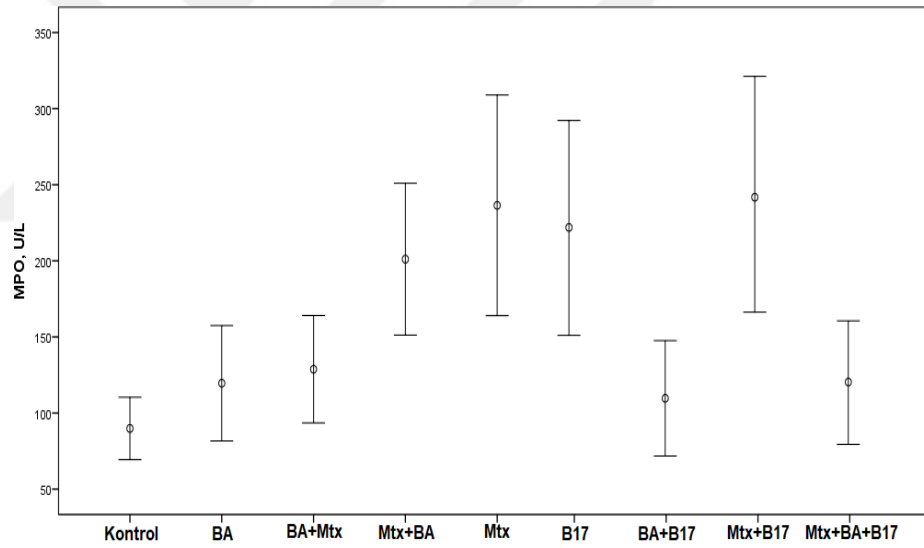
4.3.3. Oksidan Parametreler



Şekil 4.24. Disülfid sonuçları



Şekil.4.25. LOOH sonuçları.



Şekil 4.26. MPO sonuçları

Tüm gruplarda çalışılan rat sayısı altışar (6) adettir. Uygulanan biyokimyasal testler;MPO, miyeloperoksidaz; LOOH, lipid hidroperoksit; ALT, AST, alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz; alkalın fosfataz ve ALP'dir. (Bkz. Tablo 9)

Tablo 4.4. Çalışma gruplarındaki ratların laboratuvar bulguları...Değerler, ortalama $\pm$ SD olarak ifade edilir. p değeri, Tek yönlü varyans analizi [ANOVA];

Variable	Control (a)	BA (b)	BA+Mtx (c)	Mtx+BA (d)	Mtx (e)	B17 (f)	BA+B17 (g)	MTX+B17 (h)	MTX+BA+B17 (i)	p-value
Natif Tiyol ($\mu\text{mol/L}$)	235 $\pm$ 7,9 ^{d,e,f,h}	228 $\pm$ 9,6 ^{d,e,f,h}	222 $\pm$ 4,2 ^{d,e,f,h}	194 $\pm$ 9,1 ^{a,b,c,g,i}	193 $\pm$ 5,2 ^{a,b,c,g,i}	197 $\pm$ 5,1 ^{a,b,c,g,i}	232 $\pm$ 9,9 ^{d,e,f,h}	186 $\pm$ 4,9 ^{a,b,c,g,i}	227 $\pm$ 9,3 ^{d,e,f,h}	<0.001
Total Tiyol ($\mu\text{mol/L}$)	271 $\pm$ 6,3 ^{d,e,f,h}	267 $\pm$ 7,3 ^{d,e,f,h}	265 $\pm$ 1,8 ^{d,e,f,h}	255 $\pm$ 4,6 ^{a,b,c,g,i}	248 $\pm$ 3,4 ^{a,b,c,g,i}	250 $\pm$ 3,5 ^{a,b,c,g,i}	270 $\pm$ 7,3 ^{d,e,f,h}	246 $\pm$ 3,1 ^{a,b,c,g,i}	265 $\pm$ 6,9 ^{d,e,f,h}	<0.001
Disülfid ($\mu\text{mol/L}$)	18 $\pm$ 4,1 ^{d,e,f,h}	20 $\pm$ 1,8 ^{d,e,f,h}	21 $\pm$ 2,2 ^{d,e,f,h}	30 $\pm$ 4,5 ^{a,b,c,g,i}	28 $\pm$ 1,3 ^{a,b,c,g,i}	29 $\pm$ 1,2 ^{a,b,c,g,i}	19 $\pm$ 1,8 ^{d,e,f,h}	30 $\pm$ 1,6 ^{a,b,c,g,i}	19 $\pm$ 2,2 ^{d,e,f,h}	<0.001
MPO (U/L)	90 $\pm$ 19,5 ^{d,e,f,h}	120 $\pm$ 36,1 ^{d,e,f,h}	129 $\pm$ 33,6 ^{d,e,f,h}	201 $\pm$ 47,5 ^{a,b,c,g,i}	236 $\pm$ 58,4 ^{a,b,c,g,i}	222 $\pm$ 53,1 ^{a,b,c,g,i}	111 $\pm$ 36,3 ^{d,e,f,h}	242 $\pm$ 62,4 ^{a,b,c,g,i}	122 $\pm$ 39,7 ^{d,e,f,h}	<0.001
LOOH ($\mu\text{mol/L}$)	10 $\pm$ 0,9 ^{d,e,f,h}	10 $\pm$ 0,8 ^{d,e,f,h}	10 $\pm$ 1,0 ^{d,e,f,h}	12 $\pm$ 0,9 ^{a,b,c,g,i}	13 $\pm$ 0,9 ^{a,b,c,g,i}	12 $\pm$ 0,8 ^{a,b,c,g,i}	10 $\pm$ 0,8 ^{d,e,f,h}	13 $\pm$ 1,0 ^{a,b,c,g,i}	10 $\pm$ 0,6 ^{d,e,f,h}	<0.001
Katalaz (U/L)	100 $\pm$ 2,0 ^{d,e,f,h}	97 $\pm$ 2,4 ^{d,e,f,h}	96 $\pm$ 3,6 ^{d,e,f,h}	88 $\pm$ 4,2 ^{a,b,c,g,i}	86 $\pm$ 3,3 ^{a,b,c,g,i}	88 $\pm$ 3,4 ^{a,b,c,g,i}	99 $\pm$ 2,4 ^{d,e,f,h}	83 $\pm$ 3,2 ^{a,b,c,g,i}	99 $\pm$ 3,2 ^{d,e,f,h}	<0.001
Albumin (g/dL)	34 $\pm$ 1,4 ^{d,e,f,h}	33 $\pm$ 0,6 ^{d,e,f,h}	34 $\pm$ 1,6 ^{d,e,f,h}	29 $\pm$ 1,3 ^{a,b,c,g,i}	28 $\pm$ 2,4 ^{a,b,c,g,i}	29 $\pm$ 2,3 ^{a,b,c,g,i}	34 $\pm$ 1,0 ^{d,e,f,h}	27 $\pm$ 2,3 ^{a,b,c,g,i}	34 $\pm$ 1,6 ^{d,e,f,h}	<0.001
ALT (U/L)	45 $\pm$ 9,7 ^{d,e,f,h}	47 $\pm$ 6,0 ^{d,e,f,h}	49 $\pm$ 13,6 ^{d,e,f,h}	105 $\pm$ 19,8 ^{a,b,c,g,i}	108 $\pm$ 9,8 ^{a,b,c,g,i}	103 $\pm$ 9,1 ^{a,b,c,g,i}	46 $\pm$ 6,0 ^{d,e,f,h}	112 $\pm$ 13,2 ^{a,b,c,g,i}	51 $\pm$ 10,1 ^{d,e,f,h}	<0.001
AST (U/L)	59 $\pm$ 8,9 ^{d,e,f,h}	62 $\pm$ 12,2 ^{d,e,f,h}	66 $\pm$ 11,4 ^{d,e,f,h}	171 $\pm$ 47,8 ^{a,b,c,g,i}	189 $\pm$ 39,9 ^{a,b,c,g,i}	177 $\pm$ 36,8 ^{a,b,c,g,i}	62 $\pm$ 12,3 ^{d,e,f,h}	188 $\pm$ 42,9 ^{a,b,c,g,i}	58 $\pm$ 9,2 ^{d,e,f,h}	<0.001
ALP (U/L)	78 $\pm$ 4,0 ^{d,e,f,h}	73 $\pm$ 20,3 ^{d,e,f,h}	81 $\pm$ 18,6 ^{d,e,f,h}	180 $\pm$ 36,3 ^{a,b,c,g,i}	174 $\pm$ 38,3 ^{a,b,c,g,i}	169 $\pm$ 36,2 ^{a,b,c,g,i}	76 $\pm$ 20,3 ^{d,e,f,h}	181 $\pm$ 39,8 ^{a,b,c,g,i}	79 $\pm$ 17,3 ^{d,e,f,h}	<0.001

a Kontrol grubu ile 2,4,6,7 (d,e,f,h) grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark;

b BA (Borik asit) grubu ile 2,4,6,7 (d,e,f,h) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

c BA + Mtx (Borik asit + Metotreksat) grubu ile 2,4,6,7 (d,e,f,h) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

d Mtx + BA (Metotreksat + Borik asit) grubu ile 1,3,5,8,9 (a,b,c,g,i) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

e Mtx (Methotrexate) grubu ile 1,3,5,8,9 (a,b,c,g,i) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

f B17 (Vitamin B17) grubu ile 1,3,5,8,9 (a,b,c,g,i) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

g BA + B17 (Borik asit + Vitamin B17) grubu ile 2,4,6,7 (d,e,f,h) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

h Mtx + B17 (Methotrexate + Vitamin B17) grubu ile 1,3,5,8,9 (a,b,c,g,i) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark;

1 Mtx + BA + B17 (Mtx + Borik asit + Vitamin B17) grubu ile 2,4,6,7 (d,e,f,h) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. (Bkz. Tablo 9)



5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Borik Asitin (BA) ve B17 vitamininin Metotreksat (MTX) kaynaklı hepatotoksik yan etkisine karşı koruyucu özelliğini ve bu hepatotoksisiteyi tedavi edici etkisini değerlendirmeyi amaçladık. Bununla birlikte bu etkilerin tiyol-disülfid homeostazisi ile olan ilişkisini bir diğer primer amaç olarak belirledik [103, 104].

MTX; antimetabolit, antiproliferatif, antiinflamatuvar ve immünsüpresif özellikleri nedeniyle birçok hematolojik, romatizmal, dermatolojik, otoimmün hastalıkların ve kanser türlerinin tedavisinde kullanılmaktadır [35, 103-110]. Bununla birlikte, hepatotoksisite, ince bağırsak hasarı, akut böbrek yetmezliği, akciğer infiltrasyonu, kolestazis (safra akımının kesilmesi), steatozis (vücutta aşırı yağ toplanması), fibrozis (bağ dokusunun çoğalması) ve siroz gibi yan etkilere yol açtığı da bildirilmiştir [16, 17, 105, 111]. Hepatobiliyer sistem, metabolit atılımında böbrekler ile birlikte çalıştığı için yüksek doz MTX kullanımı renal tübüllerde çökme yaratarak akut renal yetmezliğe de neden olabilmektedir [111, 112]. MTX eliminasyonundaki gecikmeyle nefrotoksisite, MTX'ın yüksek doz kullanımı ile de akut böbrek yetmezliğinin olduğu raporlanmıştır [113]. MTX'ın birikmesi böbreklerden sonra en çok karaciğerde olduğundan dolayı yüksek doz uygulandığında hepatotoksisiteye de sebep olabilmektedir [106, 114]. En sık görülen yan etkisi olan hepatotoksisite sadece malign hücrelerin değil sağlam hücrelerin de etkileneşinden dolayı meydana gelmektedir. Özellikle kendini yenileyebilen kemik iliğı hücrelerinde toksik etki gösterirler. Toksisiteye eşlik eden diğer faktörler de; diyabet, yaşlılık, renal yetersizlik ve alkol tüketimidir. Çeşitli çalışmalarda MTX'in oksidatif parametrelerin düzeyini artırdığı ve antioksidan parametrelerin düzeyini düşürdüğü belirlenmiş ve hepatotoksisitenin serbest oksijen radikallerinin yükselmesinden dolayı artan oksidatif streşten kaynaklandığı rapor edilmiştir [40, 105, 107]. Literatürde kanser tedavisinde tercih edilen MTX'in hepatotoksisite etkisini azaltmak için melatonin, L-Karnitin [108], metionin [115], nikotinamid [115] ve folik asit [116] gibi antioksidan yapıların koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir [12, 106-108, 115-117]. MTX, folik asitten poliglutamata türevleri oluşturarak hepatositlerde depolanır [118]. Böylece folat antagonisti gibi davranmış

olur. MTX kullanımından dolayı hücre içinde poliglutamat formu birikir ve folik asit seviyesi azalır [119]. Poliglutamat türevleri toksiktir ve bu yüzden de hepatosit nekrozunu oluşturur. Bu bilgiler ışığında araştırmacıların bazıları ise, hepatotoksisitenin nedeni olarak; NADPH'nin azalmasıyla hepatositlerde oksidatif strese karşı hassasiyet oluşması ya da MTX'in hepatositlerde birikiminden dolayı MTX-poliglutamat formunun ortaya çıkması şeklinde bahsetmişlerdir [120]. Poliglutamat türevleri hücre içinde tutulur ve dihidrofolat redüktaz enzimine (DHFR) bağlanarak dihidrofolat (DHF) ile yer değiştirir [18, 19]. MTX, DHFR enzimini inhibe eder ve böylece DHF'nin Tetrahidrofolat (THF)'a dönüşümünü durdurmuş olur. THF'a dönüşemeyen DHF ise hücrede birikir [118, 121]. THF sentezi inhibe olunca pirimidin timidilat ve pürin nükleotidlerinin sentezi durur. Bu yüzden DNA, RNA sentezi ve ATP yapımı inhibe olur [118]. MTX, pürin ve pirimidin inhibitörü olduğu için immünsupresif ve antineoplastik olarak kullanılır [122]. MTX, proliferen hücrelerde NADPH'nin ana kaynağını oluşturan enzimleri inhibe eder [123]. Bu yüzden MTX kullanımı hücre içi NADPH seviyelerini azaltabilir. Bu durum da redükte glutatyon seviyelerini düşürür. Böylece hepatosit hasarı meydana gelir [47]. ROS (reaktif oksijen türleri)'a karşı glutatyon seviyesini koruyan glutatyon redüktazda NADPH'ı kullanılır. Böylelikle, azalan NADPH miktarı, hepatositleri reaktif oksijen radikallerine karşı duyarlılaştıran glutatyon seviyelerinin düşmesine sebep olur. Böylece hücreler ROS'un neden olduğu strese karşı koyamazlar. Bu da hepatosit hasarına neden olur. Sonuçta; MTX'in karaciğer ve böbrekte meydana getirdiği doku hasarında rolün çoğunun ROS'un meydana getirdiği oksidatif stres olduğu ortaya konmuştur [103, 120]. Bu bilgiler ışığında MTX'in neden olduğu karaciğer hasarının esas olarak oksidatif stresten kaynaklandığı gösterilmiştir [107, 124]. MTX'e bağlı hepatotoksisitenin nedeni birkaç olası mekanizma ile açıklanmaya çalışılmışsa da asıl nedeni henüz tam olarak bilinmemektedir.

Doğal bir mineral olan BA'nın birçok çalışmada antioksidan [9] ve hepatoprotektif [125] etkileri olduğu gösterilmiştir. BA'nın vücuttaki glutatyon miktarını artırdığı, diğer reaktif oksijen türlerini inhibe ettiği ve oksidatif hasarı önlediği de öne sürülmüştür [10]. Borik asitin koruyucu olduğunu tespit etmemiz ve oksidatif stres oluşumu sonrası gerçekleşen hücre hasarının esas olarak tiyol-disülfid dengesinin bozulmasından kaynaklandığını öngörmemiz MTX uygulamasının oluşturacağı yan etkilerin önüne geçmek için yol gösterici olmuştur. MTX'in yan

etkilerini önlemek için antioksidan özelliğe sahip tiyol donörü ilaçlar veya takviye edici ajanların kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda, MTX kaynaklı karaciğer harabiyetinin mekanizmasının anlaşılması ve bu toksikasyona karşı BA'nın etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Vitamin B17 tamamen toksik olmasa da Beta-glikosidaz tarafından şekere, hidrojen siyanüre, benzaldehite ya da asetona hidrolize edilebilmektedir. Diyetle az alımı sonucu spesifik ve patolojik eksiklik durumları gelişmesi onun vitamin olma durumunu doğrular. Yapılan bazı bilimsel araştırmaların ışığında, B17 vitamini'nin kanserli hücrelerin oluşumunu engellediği ve bulunan kanserli hücreleri de yok ettiği sonuçları elde edilmiştir. Fakat net olarak kanıtlanamamıştır. Yine de anti-kanser vitamini adı da bilinmektedir. B17 vitamininin vücuda alınınca hidrojen siyanür oluşturarak kanser hücrelerini ortadan kaldırmaktadır. Fakat enzimler salgılandıktan sonra dokulara ulaşırken sadece B17 vitamini yeterli olmamaktadır. Beslenme düzeninin anti-kanserojen olması ve egzersizle desteklenmesi tavsiye edilmektedir. Klinik testlerde B17 vitamini diğer vitaminlerle birlikte alındığında kanserde daha fazla etkisi olabilmektedir. Fakat B17 vitamininin kanser hücrelerini ortadan kaldırması ve yayılımını durdurması üzerindeki etkisi için daha çok bilimsel araştırma gerekmektedir. Ulusal Tıp Enstitüsü ve Amerikan Gıda İlaç Dairesi B17 vitaminini kanser önleyici olarak tanımlamıştır. Amerikan Kanser Derneği raporunda ise B17 vitamininin kanser tedavisi ile ilgili herhangi bir somut kanıtın bulunmadığı öne sürülmektedir. B17 vitaminiyle ilgili yapılan araştırmalarda bu vitamin ağızdan alındığında siyanür zehirlenmesine yol açabilmektedir. Şiddetli zehirlenme de ise nöbet, koma ve nefes durması görülmektedir. B17 vitamini hakkında 2 çeşit görüş bulunmaktadır. B17'yi destekleyen kısım bu vitaminin kanser tedavilerinde etkili olduğunu savunsa da Amerika ve çeşitli sağlık kuruluşlarında ki açıklamalarda B17'nin kanser tedavisine etki etmediğini, aksine zehirlenmelere sebep olabileceğini belirtmektedir. Türkiye'de bu konuyla ilgili yapılan bilimsel araştırma veya Sağlık Bakanlığı'nın bir önerisi yoktur. Biz sonuçlarımızda B17 vitamininin siyanür zehirlenmesi gibi yan etkilerinden dolayı hasar oluşturmuş olabileceğini düşünmekteyiz (Bkz. Şekil. 4.4, 4.6).

Bu çalışmada iki önemli sonuç dikkat çekmektedir:

1. MTX ve MTX+BA verilen gruplar histolojik olarak değerlendirildiğinde, her iki grupta da sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu ve hücre içi vakuolizasyon gibi hepatotoksik hasarların meydana geldiği görülmektedir (Bkz. Şekil 4.12). Laboratuvar parametreleri değerlendirildiğinde, hepatosit hasarını yansıtan test düzeylerinin (ALT, AST ve ALP) arttığı ($p < 0.05$), oksidan parametre düzeylerinin (lipid hidroperoksit, MPO, disülfid ve % disülfid / doğal tiyol oranı) arttığı ($p < 0.05$) ve antioksidan parametrelerin (doğal tiyol, toplam tiyol, albümin ve katalaz) düzeylerinin azaldığı ($p < 0.05$) görülmektedir. Yani tespit edilen bu sonuçlar MTX'in hepatosit hasarına ve oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir. Oksidan-antioksidan dengesinin bozulmasının ana sebebinin tiyol-disülfid homeostazının bozulması olabileceğini düşünmekteyiz. Tiyol disülfid homeostazı, antioksidan ve oksidan kısımlardan oluşur ve fizyolojik koşullar altında denge halindedir. Doğal tiyol seviyesi bu dengenin antioksidan tarafını yansıtırken, disülfid seviyesi oksidan tarafı yansıtır. Tiyol grupları çeşitli nedenlerle oksitlenebilir ve bu nedenle disülfid bağları oluşur. Disülfid bağları ayrıca indirgeme yoluyla tiyol gruplarına geri dönüştürülebilir. Başka bir deyişle, tiyol-disülfid homeostazı tersine çevrilebilir bir dengededir. Bu denge birçok hastalık durumunda bozulur [16]. Çalışmamızda MTX uygulanan gruplarda doğal tiyol düzeyindeki azalma, ve disülfid düzeyindeki artış, tiyol-disülfid dengesinin oksidasyon lehine bozulduğunu göstermektedir. Ayrıca önceki çalışmalar metotreksatın neden olduğu oksidatif stresi kantitatif olarak ölçmek için birçok oksidan ve antioksidan parametrenin değerlendirilmesini gerektirmiştir [36, 47]. Ancak bu çalışmada gerçekleştirilen tiyol-disülfid dengesinin ölçümüyle hem antioksidan hem de oksidan düzeyler eş zamanlı olarak tek bir test profiliyle belirlenebilmektedir. Çalışmamız bu açıdan eşsizdir.

2. Çalışmamızda, MTX enjeksiyonundan önce verilen BA 'nın (Grup 8) MTX'in neden olduğu oksidatif hasarı önleyerek koruyucu bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca MTX uygulamasından sonra verilen BA'nın MTX'in neden olduğu oksidatif hasarı ortadan kaldırmadığı ve terapötik etkisinin olmadığı da açıkça görülmüştür (Bkz. Şekil 4.15). BA'nın koruyucu olduğunu belirlemek ve oksidatif stres sonrası hücre hasarının esas olarak tiyol-disülfid homeostazının bozulmasından kaynaklandığını tahmin etmek, metotreksat uygulamasının yan etkilerini önlemek için yol gösterici olmuştur.

MTX'in yan etkilerini önlemek için tiyol içeren ilaçların veya antioksidan özelliği olan takviye ajanlarının kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Glutasyon ve N-asetil sistein antioksidan ve hidrofilik özellikleri nedeniyle pek çok hastalıkta sıklıkla tercih edilmektedir [35, 49]. Histolojik görüntülemeler ve laboratuvar parametreleri incelendiğinde MTX uygulaması, hem kanda hem de karaciğer hücrelerinde oksidatif strese bağlı hasara neden olmaktadır. Bu nedenle hem hidrofilik hem de hepatosit hücre zarından geçebilmesi için lipofilik özelliğe sahip bir tiyol dönörü ajan olan α -lipoik asit kullanılmasının daha etkin olabileceğini öngörmekteyiz.

Laboratuvar verileri daha detaylı olarak incelendiğinde oksidatif stresin esas olarak tiyol disülfid homeostazisinin bozulmasından kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz. Tiyol disülfid homeostazisi antioksidan ve oksidan kısımlardan oluşan bir denge durumudur. Bu denge durumunun antioksidan tarafını native tiyol düzeyi yansıtırken oksidan tarafını disülfid düzeyi yansıtır. Tiyol grupları çeşitli nedenlerle okside olabilir ve böylece disülfid bağları oluşur. Disülfid bağları ise redüksiyon ile tekrar tiyol gruplarına dönüşebilir. Yani tiyol-disülfid dönüşümü reversibledir ve denge halindedir. Bu denge pek çok hastalık durumunda bozulur [126]. Bizim çalışmamızda da MTX uygulanan gruplarda (Grup MTX ve MTX +BA) native tiyol düzeyinin azalması, disülfid düzeyinin ve % disülfid / native thiol oranının artması tiyol-disülfid dengesinin oksidasyon lehine bozulduğunu göstermektedir. Ayrıca önceki çalışmalarda, metotreksatın oluşturduğu oksidatif stresin kantitatif olarak ölçülebilmesi için oksidan ve antioksidan birçok parametrenin değerlendirilmesine gereksinim duyulmuştur [103, 127, 128]. Fakat bizim çalışmamız sadece tiyol-disülfid dengesi ölçülerek hem antioksidan hem de oksidan düzeyinin aynı anda saptanabileceğini ortaya koyması itibari ile özgün bir çalışmadır.

Serbest radikallerin zararlarını bazı maddeler azaltır veya tamamen yok eder. Bunlardan biri de BA'dır [129]. Periyodik Tablonun 13. grubunda yer alır. Hidroksil grupları yardımıyla biyomoleküller ile etkileşebilmektedir. Borik asit, enzim reaksiyonlarında, hücre membran fonksiyonlarında, mineral ve hormonal metabolizmalarda önemli rol oynamaktadır. BA'nın, oksidatif hasara karşı DNA için koruyucu olduğu öne sürülmektedir [129]. Ek olarak, hipolipidemik, antikoagülan, antiosteoporotik, antiinflamatuvar ve antineoplastik etkilere de sahip olduğu

gösterilmiştir. Borik asit'in koruyucu ve antioksidan etkilere sahip olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir.

Şener ve ark.nın çalışmasında [130], metotreksat tek doz 20 mg/kg/i.p olarak uygulandıktan sonra 5 gün boyunca L-Karnitin 500 mg/kg verilmiş ve çalışmanın sonunda da dokular histolojik olarak incelenmiştir. MTX grubunda hepatositlerde dejenerasyon, sinüzoid dilatasyonu, vasküler konjesyon bulguları gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer bulgular oluşmuştur.

Uraz ve ark.nın yaptığı çalışmada [5] MTX'in karaciğerde ki hasarına karşı UDCA (Urseloksikolik asit)'nin koruyucu etkisi araştırılmıştır; MTX tek doz 20 mg/kg/i.p şeklinde uygulanmıştır. MTX verilen grupta sadece hepatosit nekrozu oluşmuştur. Bizim çalışmamızda ise sinüzoidal dilatasyon, vasküler konjesyon-trombozis, hepatosit dejenerasyonu, inflamatuvar infiltrasyon gözlemlenmiştir.

Al-Motabagani'nin yaptığı çalışmada [110], iki hafta boyunca MTX 0.5 mg/kg/i.p (düşük doz) uygulanmıştır ve dokular histolojik olarak değerlendirilmiştir. MTX grubunun portal alanlarında hücre infiltrasyonu, hepatosit stoplazmasında vakuolizasyon görülmüştür. Çalışmamızda ise bu sonuçların yanısıra sinüzoidal dilatasyon, vasküler konjesyon ve trombozis meydana gelmiştir.

Reaktif oksijen metabolitleri organ yetmezliklerinde ve bazı ksenobiyotiklerin hepatik ve renal toksisitesinde rol oynadığından dolayı MTX'nda hepatik toksisiteye etki ettiği düşünülmüştür [131]. MTX, dihidrofolat redüktaz enzimini bağlar. Bu enzim de dihidrofolatın tetrahidrafolata redüksiyonunu katalizler, DNA sentezinde ve hücre bölünmesinde gerekli pürin, pirimidin ve timidilat sentezi için gerekli bir enzimdir. MTX yüksek doz uygulandığında hepatositlerde DNA sentezi inhibe olur ve hücre nekrozu meydana getirilir.

Jahovic ve ark.nın çalışmasında [132] 20 mg/kg MTX tek doz uygulanmış ve 5 gün 10 mg/kg melatonin verilmiştir. Böbrek ve karaciğer dokularıyla alakalı oksidan ve antioksidan parametrelere bakılmıştır. MTX uygulanınca Malondialdehit (MDA) seviyesi artmış, GSH seviyesi de azalmıştır. MDA seviyesindeki artma nötrofil infiltrasyonunu gösterir.

Serbest radikaller kısa ömürlü, paylaşılmamış elektron içeren reaktif moleküllerdir. Bunlar yan ürün olarak oluşabildikleri gibi ayrıca ilaçların ve kimyasal maddelerin etkisiyle de ortaya çıkabilmektedirler. Bu radikaller serbest aminoasitle, nükleik asitle, proteinle, lipoproteinle, lipitle, karbonhidratla ve bağ dokusu makromolekülü ile de, canlı organizmada bulunan tüm biyomoleküllerle reaksiyona girip geri dönüşümlü ya da dönüşümsüz etkiler oluşturabilmektedirler [133]. Bu radikallerin oluşma hızı, bunları yokeden savunma sistemlerinin hızlarıyla dengede olduğu sürece, organizmayı etkileyemezler. Fakat bu denge bozulduğu zaman, bu radikaller zararlıdır. Ve oksidatif stres olarak etki gösterirler. Hücreleri, reaktif oksijen türlerinden koruyan antioksidan savunma sistemleridir. Bu sistemler enzimatik ve nonenzimatik olmak üzere ikiye ayrılırlar. Enzimatik olanlar; Katalaz, Süperoksit dismutaz, Glutasyon peroksidaz, Glutasyon redüktaz, Methemoglobin redüktaz, Glutasyon S-transferaz'dır. Nonenzimatik olanlar ise; vitamin E, redükte nikotinamid adenin dinükleotit-NADH⁻, Glutasyon, vitamin C ve redükte nikotinamid adenin dinükleotit fosfat-NADPH⁻ dir. Glutasyon (GSH), non-enzimatik antioksidanların en önemlisi'dir [134].

MTX ile alakalı başka organlarda ve başka antioksidan maddelerle yapılan çalışmalar da mevcuttur. Yüncü ve ark.nın çalışmasında, MTX'ın ince barsak mukozasını bozduğu ve E vitamini verilmiş grupta da bu zararın azaldığını görmüşlerdir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmadaki sonuçlarımız;

1. Metotreksat (MTX) ile meydana gelen karaciğer hasarında, Borik Asit'in (BA) koruyucu etkisinin tedavi edici etkisinden daha fazla olduğu gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.15).

2. Histolojik ve biyokimyasal parametreler değerlendirilerek elde edilen sonuçlar, MTX'e bağlı olarak gelişen hepatotoksik hasarın oksidatif stresle ilişkili olduğunu desteklemektedir.

3. MTX uygulaması sonucu oluşan oksidatif hepatotoksisitenin, tiyol disülfid dengesini bozarak oksidasyon lehine (disülfid oluşumu) kaymasına sebep olduğu gözlemlendi (Bkz. Tablo 9).

4. Bu çalışmada B17 vitamininin (amigdalın) tek başına oluşturduğu etki ve MTX'a bağlı hepatotoksik hasarın ortadan kaldırılmasına yönelik etkisi araştırıldı. Fakat histolojik ve biyokimyasal parametreler incelendiğinde beklenenin aksine hepatotoksik yan etkileri ortadan kaldırmadığı hatta doğrudan kendisinin karaciğer hasarı oluşturduğu gözlemlendi.

Bu bilgiler ışığındaki önerilerimiz;

1. MTX'in oksidatif stresle ilişkili yan etkilerini önlemek için antioksidan özelliğe sahip tiyol donörü ilaçlar veya takviye edici ajanların kullanılabileceğini düşünmekteyiz (alfa lipoik asit, glutatyon ve N-asetil sistein gibi).

2. MTX'ın tek ve yüksek doz şeklinde uygulanması sinüzoidal dilatasyon, inflamatuvar infiltrasyon, hepatosit dejenerasyonu ve vasküler konjesyon-tromboz gibi hasarları oluşturmaktadır. BA'nın MTX'ten önce uygulanması, MTX'in karaciğerde neden olduğu hasarı azaltmıştır MTX'in neden olduğu toksik etkilerin

azaltılmasında BA'nın koruyuculuğunun alternatif bir tedavi olabileceği düşüncesindeyiz.

3. Amigdalinin (B17 vitamini) ince bağırsakta bakteriler tarafından parçalanmasıyla ortaya çıkan hidrojen siyanürün intoksikasyona sebep olduğu bilinmektedir [67]. Çalışmamızda kullanılan amigdalinin oluşturduğu hepatotoksisitenin hidrojen siyanür intoksikasyonu sebebiyle gerçekleşmiş olabileceğini öngörmekteyiz. Buna göre amigdaline birlikte bağırsak bakterilerini etkisizleştirecek antibiyotiklerin kullanımının hidrojen siyanür oluşumunu önleyerek amigdalinin zararlı etkilerinin oluşmasını engelleyebileceğini düşünmekteyiz.



7. KAYNAKLAR

1. Ross MH, Pawlina W. *Histology*, 5nd ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2006:100.
2. Aydın S. *İnsan Anatomisi ve Fizyolojisi*, 5. Baskı. Anadolu Üniversitesi, 2000:252.
3. Bilal Ç. Renal hücrelerde metotreksat kaynaklı sitotoksosite: kurkumin'in koruyucu rolü, *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi*, 2020, 281-292.
4. Şeyma K. Protective effects of vitamin e against methotrexate-induced testicular damage in rats: histopathologic and flow cytometric study, *Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2020, 278-284.
5. Uraz S. Role of Ursodeoxycholic Acid in Prevention of Methotrexate induced Liver Toxicity, *Digestive Diseases and Sciences*, 2008, 1071-1077.
6. Ince S. Protective effect of boric acid against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice, *Drug and Chemical Toxicology*, 2012, 35(3):285 292.
7. Abolmaali S. Stealth nanogels of histinyated poly ethyleneimine for sustained delivery of methotrexate in collagen-induced arthritis model, *Pharmaceutical research*, 2015, 32(10):3309-3323.
8. Yiğit P. Tavşanlarda borik asidin kan kimyasına etkisi, *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2013, 10(2).
9. Sogut I, et al. The antioxidant and antiapoptotic effect of boric acid on hepatotoxicity in chronic alcohol-fed rats, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2018, 96(4):404-411.
10. Cengiz M. Boric acid protects against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats, *Cellular and Molecular Biology*, 2018, 64(12):11-14.

11. Çelik M, Yıldırım M. Amigdalın ve Özellikleri, *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 2017, 6(1):28-37.
12. Barceloux DG, Donald G. Cyanogenic foods (cassava, fruit kernels, and cycad seeds), *Disease-a-month*, 2009, 55(6):336-352.
13. Simeonova FP. Hydrogen cyanide and cyanides: human health aspects, *World Health Organization*, 2004.
14. Moore KL, Dalley A.F. *Kliniğe yönelik anatomi*, 4.baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, 2007:54.
15. Sancak B, Cumhur M. *Fonksiyonel anatomi: baş-boyun ve iç organlar*, 1.baskı, ODTÜ Geliştirme Vakfı, 2002:150.
16. Aktümsek A. *Anatomi ve Fizyoloji (İnsan Biyolojisi)*, 1. Baskı, Ankara Nobel Tıp Kitabevleri, 2001:444-490.
17. Bala F. Metotreksat'ın Karaciğerdeki Hasarına Karşı Nac'ın (n-asetilsistein) Koruyucu Etkisinin Işık Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar: Afyon Kocatepe Üniversitesi 2009.
18. Efdal A. Siklofosfamid ile Oluşturulmuş Karaciğer Hasarı Üzerine Vitamin D3'ün Etkileri, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi 2014.
19. Netter FH. *İnsan Anatomi Atlası*, 5. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2011:38.
20. Dinç N. Sağ Lob Karaciğer Nakli Yapılan Hastalarda Donörün Safra Yollarındaki Anatomik Varyasyonlarının Alıcıda Görülen Safra Yolları Komplikasyonları Üzerine Etkisi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara: Başkent Üniversitesi, 2014.

21. Şentürk M, Karabıyık TN. *Hepatektomi ve Karaciğer Rejenerasyonu*,1.Baskı. Rating Academy Ar-Ge Yazılım Yayıncılık Eğitim Danışmanlık ve Organizasyon, 2019:30.
22. Genel ŞA. *Özel İnsan Embriyolojisi*, 3. Baskı. Ankara, Tıp ve Teknik Yayıncılık Ltd. Şti, 1998:57.
23. Sadler TW. *Langman's Medikal Embriyoloji*, 9.Baskı. Başaklar AC (çeviri editörü), 2005, 9:235-64.
24. Sweeney LJ. *Basic concepts in embryology*,1 st ed. McGraw Hill Professional,1998.
25. Özdaşçı Ş.A. Sıçanlarda Gentamisin'le Oluşturulan Nefrotoksisite Üzerine Origanum Majorana (Mercanköşk) Yağının Koruyucu Etkisinin İncelenmesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri: Erciyes Üniversitesi, 2017.
26. Junqueira LCU. *Temel histoloji: text & atlas*, 14.Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, 2009:70.
27. Başak M. İntrakranyal Yer Kaplayıcı Lezyonların Saptanmasında 0.5M ve 1M Gadolinyum Şelatlarının İntraindividüel Karşılaştırılması, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Radyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul: Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi,2008.
28. Kierszenbaum AL., Demir R. *Histoloji Ve Hücrebiyolojisi: Patolojiye Giriş*, 2.Baskı. Palme Yayıncılık, 2006:100.
29. Kuzu B. Geraniolun ıshikawa hücrelerine potansiyel antikanser etkilerinin değerlendirilmesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Emriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi, Konya: Necmettin Erbakan Üniversitesi, 2019.
30. Unal B. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Radyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale,. *Tanısıl ve Girişimsel Radyoloji: Tibbi Görüntüleme ve Girişimsel Radyoloji Derneği Yayın Organı*, 2004, 10(4):304-308.

31. Karaöz E. *Sindirim Sistemi Histolojisi*, 2.Baskı. Isparta, Süleyman Demirel Üniversitesi Basımevi, 2002:67.
32. Karagöz A. Manda böbreğinin pelvis renalis' inin korozyon kast yöntemi ile incelenmesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anatomi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir: Balıkesir Üniversitesi, 2019.
33. Samancı T.Ç. Kateşin ve gallik asitin sıçan karaciğer yağlanmasına etkisi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi, 2015.
34. John E. Guyton & Hall-Tıbbi Fizyoloji, 13.Baskı.Güneş Tıp Kitabevleri,2017:157.
35. Sendur N, Karaman G, Savk H. Akut Metotreksat Toksisitesinin Erken Belirtisi; Deri Ulserleri, *Klinik Tıp Bilimleri*, 2002, 22:593-596.
36. Ganong W. *Tıbbi Fizyoloji*, 25. Baskı. Nobel Tıp Kitapevleri, 2002:80.
37. Prati D, et al., Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels, *Annals of internal medicine*, 2002, 137(1):1-10.
38. Piton A, et al., Factors associated with serum alanine transaminase activity in healthy subjects: consequences for the definition of normal values, for selection of blood donors, and for patients with chronic hepatitis C, *Hepatology*, 1998, 27(5):1213-1219.
39. Kwo PY, Cohen SM, Lim JK, ACG clinical guideline: evaluation of abnormal liver chemistries, *Official journal of the American College of Gastroenterology*, 2017, 112(1):18-35.
40. Friedman LS, Chopra S, Travis A. Approach to the patient with abnormal liver biochemical and function tests, *Turkish Family Physician*, 2014,5-3.
41. Nannipieri M, et al., Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes: the Mexico City diabetes study, *Diabetes care*, 2005, 28(7):1757 1762.

42. Cabrera-Abreu JC. γ -Glutamyltransferase: value of its measurement in paediatrics, *Annals of clinical biochemistry*, 2002, 39(1):2225.
43. Marshall, T, Williams J, Williams KM. Electrophoresis of serum isoenzymes and proteins following acute myocardial infarction, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1991, 569(1-2):323-345.
44. Smit MJ. Receptor-mediated endocytosis of lactate dehydrogenase M4 by liver macrophages: a mechanism for elimination of enzymes from plasma. Evidence for competition by creatine kinase MM, adenylate kinase, malate, and alcohol dehydrogenase, *Journal of biological chemistry*, 1987, 262(27):13020-13026.
45. Naude PJW. An evaluation of the anti-inflammatory properties of a brown coal derived potassium humate, *University of Pretoria*, 2008, 24(12):651-4.
46. Totan M, Albayrak D. Yüksek doz metotreksat tedavisine bağlı karaciğer ve böbrek toksisitesi, *Türkiye Klinikleri Pediatri Dergisi*, 1999, 8(4):185-188.
47. Uraz, S. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate induced liver toxicity, *Digestive diseases and sciences*, 2008, 53(4):1071-1077.
48. Kayaalp SO. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 11.Baskı. Ankara, Hacettepe Taş Kitapçılık Limited Şti., 2005: 300.
49. Mycek M. *Obat-obat Antiinflamasi dan Autakoid. Dalam: Harvey RA, Champe PC*, 2nd ed. Farmakologi Ulasan Bergambar, 2016: 55.
50. Tuncay B. Romatoid artritli hastalarda ikinci basamak ilaç kullanım sürelerinin toplam hastalık sürelerine oranları ve ilaçların kesilme nedenleri, *Türkiye Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Dergisi*, 2006, 52(4):158-162.
51. Allison AC. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward, *Immunopharmacology*, 2000, 47(2-3):63-83.
52. Treon S, Chabner B. Concepts in use of high-dose methotrexate therapy, *Clinical chemistry*, 1996, 42(8):1322-1329.

53. Goto E. Methotrexate poisoning with acute hepatorenal dysfunction. *Journal of Toxicology, Clinical Toxicology*, 2001, 39(1):101-104.
54. Miao X. Comparison of second-derivative spectrophotometry and HPLC for determination of amygdalin in wild apricot kernels, *ScienceAsia*, 2013, 39(4):p. 444-447.
55. Badr JM, Tawfik MK. Analytical and pharmacological investigation of amygdalin in *Prunus armeniaca* L. kernels, *Journal of Current Pharmaceutical Research*, 2010, 3(9):2134-2137.
56. Ding Y, Zheng R. Isolation and quantitation of amygdalin in Apricot-kernel and *Prunus Tomentosa* Thunb. by HPLC with solid-phase extraction, *Journal of Chromatographic Science*, 2005, 43(7):383-387.
57. Bolarinwa IF, Orfila C, Morgan MR. Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially-available in the UK, *Food chemistry*, 2014, 152:133-139.
58. Chang J, Zhang Y. Catalytic degradation of amygdalin by extracellular enzymes from *Aspergillus niger*, *Process Biochemistry*, 2012, 47(2):195-200.
59. Moertel CG. A pharmacologic and toxicological study of amygdalin, *Jama*, 1981, 245(6):591-594.
60. Vetter J. Plant cyanogenic glycosides, *Toxicon*, 2000, 38(1):11-36.
61. Yıldırım, FA, Askin MA. Variability of amygdalin content in seeds of sweet and bitter apricot cultivars in Turkey, *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9(39):6522-6524.
62. Sadoff L, Fuchs K, Hollander J. Rapid death associated with laetrile ingestion, *Jama*, 1978, 239(15):1532-1532.
63. Koo J. Quantitative determination of amygdalin epimers from *armeniaceae* semen by liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 2005, 814(1):69-73.

64. Herbert V. Laetrile: The cult of cyanide promoting poison for profit, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1979, 32(5):1121-1158.
65. Bromley J. Life-threatening interaction between complementary medicines: cyanide toxicity following ingestion of amygdalin and vitamin C, *Annals of Pharmacotherapy*, 2005, 39(9):1566-1569.
66. Shim S, Kwon H. Metabolites of amygdalin under simulated human digestive fluids, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2010, 61(8):770-779.
67. Song, Z. and X. Xu, *Advanced research on anti-tumor effects of amygdalin*, Journal of cancer research and therapeutics, 2014, 10(5):3.
68. Yan J, et al. Preparative isolation and purification of amygdalin from *Prunus armeniaca* L. with high recovery by high-speed countercurrent chromatography, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2006, 29(9):1271-1279.
69. Wang T, et al. Separation and purification of amygdalin from thinned bayberry kernels by macroporous adsorption resins, *Journal of Chromatography B*, 2015, 975:52-58.
70. Chen J, et al. Metabolic pharmacokinetics in rats: differences between pure amygdalin and amygdalin in a decoction of peach seeds, *Bulletin Of the Korean Chemical Society*, 2012, 33(5):1470-1474.
71. Aghadavod E. Amygdalin; is it an anticancer and antitumor agent?, *Immunopathologia Persa*, 2016, 2(2):e22.
72. Moss R. *The laetrile controversy*, *The Cancer Industry: The Classic Expose on the Cancer Establishment*, 1996, p. 131-152.
73. Greenberg DM. The vitamin fraud in cancer quackery, *Western Journal of Medicine*, 1975, 122(4):345.
74. Blaheta RA, et al. Amygdalin, quackery or cure? *Phytomedicine*, 2016, 23(4):367-376.

75. Kolesár E, et al. Natural plant toxicant–cyanogenic glycoside amygdalin: characteristic, metabolism and the effect on animal reproduction. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 2020, 9(5):49-50.
76. Moss RW. Patient perspectives: Tijuana cancer clinics in the post-NAFTA era, *Integrative cancer therapies*, 2005, 4(1):65-86.
77. Chang H, et al. Amygdalin induces apoptosis through regulation of Bax and Bcl-2 expressions in human DU145 and LNCaP prostate cancer cells, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 29(8):1597-1602.
78. Makarević J, et al. Amygdalin delays cell cycle progression and blocks growth of prostate cancer cells in vitro, *Life sciences*, 2016, 147:137-142.
79. Wahab MF, et al. Problems and pitfalls in the analysis of amygdalin and its epimer, *Journal of agricultural and food chemistry*, 2015, 63(40):8966-8973.
80. Yılmaz A. Her derde deva hazinemiz bor, *Bilim ve Teknik*, 2002, 414:38-48.
81. Boncukçuoğlu R, et al. Bor elementinin çevresel açıdan değerlendirilmesi, *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Dergisi*, 2006, 37 (1), 111-115.
82. Uygan D, Çetin Ö. Bor'un Tarımsal ve Çevresel Etkileri: Seydisuyu Su Toplama Havzası Agricultural and Environmental Effects of Boron: Seydisuyu Water Deposit, Uluslararası Bor Sempozyumu, Eskişehir, 2004, *Bildiri Özetleri Kitabı*: 23-25.
83. Basketter D, et al. Enzymes in cleaning products: an overview of toxicological properties and risk assessment/management, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2012, 64(1):117-123.
84. Yakıncı ZD, Kök M, Borun sağlık alanında kullanımı, *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu dergisi*, 2016, 4(1):36-44.
85. Uygan D, Çetin Ö. Bor'un Tarımsal ve Çevresel Etkileri: Seydisuyu Su Toplama Havzası Agricultural and Environmental Effects of Boron: Seydisuyu Water Deposit, Uluslararası Bor Sempozyumu, Eskişehir, 2004, *Bildiri Özetleri Kitabı*: 23-25.

86. Şaylı B, İnsan Sağlığı ve Bor Mineralleri, *AÜ Tıp Fakültesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2010, 41 (1), 75-80, 2010.
87. Cheeseman, K. and T. Slater, *An introduction to free radical biochemistry*. British medical bulletin, 1993, 49(3):481-493.
88. Saugstad, O., *Mechanisms of tissue injury by oxygen radicals: implications for neonatal disease*. Acta Paediatrica, 1996, 85(1):1-4.
89. Altunhan H. Preeklampsik anne bebeklerinde total oksidan seviye, total antioksidan seviye ve paraoksonaz düzeyleri, *Eastern Anatolian Journal of Science Volume V, Issue I*, 2019, 23-29.
90. Naito Y, et al. Oxidative stress markers, *Anti-Aging Medicine*, 2010, 7(5):36-44.
91. Biri A, et al. Role of oxidative stress in intrauterine growth restriction, *Gynecologic and obstetric investigation*, 2007, 64(4):187-192.
92. Hung J. Oxidative stress and antioxidants in preeclampsia, *Journal of the Chinese Medical Association*, 2007, 70(10):430-432.
93. Gitto E, et al. Oxidative stress of the newborn in the pre-and postnatal period and the clinical utility of melatonin, *Journal of Pineal Research*, 2009, 46(2):128-139.
94. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1, *Clinical Science*, 2004, 107(5):435-447.
95. Gathwala G, Sharma S. Oxidative stress, phototherapy and the neonate, *The Indian Journal of Pediatrics*, 2000, 67(11):805-808.
96. Mungli P, et al. Total thiols: biomedical importance and their alteration in various disorder, *Online Journal of Health and Allied Sciences*, 2009, 8(2).

97. Valko M, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer, *Chemico-biological interactions*, 2006, 160(1):1-40.
98. Hu M, et al. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma, *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 1993, 121(2):257-262.
99. Dean RT, et al. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation, *Biochemical Journal*, 1997, 324(1):1-18.
100. Firidin S. Histolojik çalışmalar için doku örnekleri alma ve işlem e projesi, *Yunus Araştırma Bülteni*, 2004, 4:15-17.
101. Akbaş A. Farklı Boyamaların Çeşitli Dokuların Parafin ve Yarı İnce Epon Kesitlerine Uygulanmasının Işık Mikroskopik Düzeyde Karşılaştırılması, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi, 2021.
102. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range, *Clinica chimica acta*, 1991, 196(2-3):143-151.
103. Devrim E. Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. *Renal failure*, 2005, 27(6):771-773.
104. Tilling L, Townsend S, David J. Methotrexate and hepatic toxicity in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis, *Clinical Drug Investigation*, 2006, 26(2):55-62.
105. Elsayy H. Naringin alleviates methotrexate-induced liver injury in male albino rats and enhances its antitumor efficacy in HepG2 cells, *Bioscience Reports*, 2020, 40(6).
106. Ulukaya, S. Hepatobiliyer Hastalıklarda Anestezi, *Genel Tıp Derg.*, 2003, 13(1):389-399.
107. Armağan, İ., *Metotreksat'ın Karaciğer ve Böbrekte Neden Olduğu Hasarda Oksidatif Stresin Rolü*. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 2015, 22(4):151-155.

108. Surai, P. Carnitine enigma: from antioxidant action to vitagene regulation part 2, transcription factors and practical applications, *J. Veter Sci Med*, 2015, 3(2):17.
109. Leeb BF, Weber K, Smolen JS. Rheumatoid Arthritis, *Disease Management and Health Outcomes*, 1998, 4(6):315-324.
110. Motabagani AL. Histological and histochemical studies on the effects of methotrexate on the liver of adult male albino rat, *Int J Morphol*, 2006, 24(3):417-22.
111. Erboğa M, et al. Quercetin ameliorates methotrexate-induced renal damage, apoptosis and oxidative stress in rats, *Renal failure*, 2015, 37(9):1492-1497.
112. Heidari R, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress are involved in the mechanism of methotrexate-induced renal injury and electrolytes imbalance, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 107:834-840.
113. Kabakcı B, et al. Metotreksat ile İndüklenmiş Sıçanlarda Böbrek Hasarı Üzerine Eritropoetinin Etkisi: Biyokimyasal ve Histopatolojik Çalışma, *Cukurova Medical Journal (Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi)*, 2015, 40(1):98-106.
114. Armagan I, et al. Effects of pentoxifylline and alpha lipoic acid on methotrexate-induced damage in liver and kidney of rats, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2015, 39(3):1122-1131.
115. Wang B, et al. Method development for determining methotrexate in urine by micellar electrokinetic capillary chromatography, *In Medicine and Biopharmaceutical: Proceedings of the 2015 International Conference World Scientific*, 2016.
116. Kılıç S, et al. Effect of the systemic use of methotrexate on the oxidative stress and paraoxonase enzyme in psoriasis patients, *Archives of dermatological research*, 2013, 305(6):495-500.
117. Bordbar M, et al. Effect of ursodeoxycholic acid and vitamin E in the prevention of liver injury from methotrexate in pediatric leukemia, *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 2018, 29(2):203.

118. Kayaalp SO. *Tıbbi Farmakoloji*, 12. baskı, Ankara: Pelikan Yayıncılık Ltd. Şti., 2009:350.
119. Cetinkaya A, et al. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats, *Medical Science Monitor*, 2006, 12(8):BR274 BR278.
120. Jahovic N, et al. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats, *Journal of pineal research*, 2003, 34(4):282-287.
121. Madhyastha S, et al. Hippocampal brain amines in methotrexate-induced learning and memory deficit, *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 2002, 80(11):1076-1084.
122. Quéméneur L, et al. Differential control of cell cycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides, *The Journal of Immunology*, 2003, 170(10):4986-4995.
123. Babiak RMV, et al. Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 1998, 16(4):283-293.
124. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2004, 15(1):91-96.
125. Güneş E, Büyükgüzel E. Oxidative effects of boric acid on different developmental stages of *Drosophila melanogaster* Meigen, *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 2017, 41(1):3-15.
126. Erel O, Neselioglu S. A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis, *Clin Biochem*, 2014, 47(18):326-32.
127. Elango T, et al. Impact of methotrexate on oxidative stress and apoptosis markers in psoriatic patients, *Clinical and Experimental Medicine*, 2014, 14(4):431-437.

128. Moghadam AR, et al. Pre-administration of turmeric prevents methotrexate induced liver toxicity and oxidative stress, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 15(1):1-13.
129. Şentürk H. Renal İskemi-Reperfüzyon ile İndüklenmiş Oksidatif Stres Hasarının Pankreas Üzerine Etkisi: Doza Bağımlı Borik Asitin Rolü, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 2018, 21(6):944-949.
130. Şener G, et al. L-Carnitine ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury and inhibits leukocyte death, *Cell Biology and Toxicology*, 2006, 22(1):47-60.
131. Ha H. Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis, *World journal of gastroenterology: WJG*, 2010, 16(48):6035.
132. Abraham P, Kolli VK, Rabi S. Melatonin attenuates methotrexate-induced oxidative stress and renal damage in rats, *Cell Biochemistry and Function*, 2010, 28(5):426-433.
133. Aydoğdu N, Kaymak K, Yalçın Ö. Sıçanlarda böbrek iskemi/reperfüzyon hasarında N-Asetilsisteinin etkileri, *Fırat Tıp Dergisi*, 2005, 10(4):151-155.
134. Aslankoç R, et al. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü süperoksit dismutaz (sod), katalaz (cat) ve glutatyon peroksidaz (GPx), *Medical Journal of Suleyman Demirel University*, 2019, 26(3).