

**T.C.**  
**FIRAT ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**DENEYSEL METOTREKSAT UYGULANAN SIÇANLARIN  
KARACİĞER DOKULARINDA ASPROSİN  
İMMÜNREAKTİVİTESİ ÜZERİNE NAS  
(N-ASETİLSİSTEİN)'İN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Osman VURAL**

**ELAZIĞ-2019**

## ONAY SAYFASI



Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

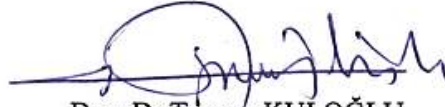
Prof. Dr. Enver OZAN



Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak

Kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. İbrahim Enver Ozan  
Prof. Dr. Mehmet Gökçe  
Doç. Dr. Tuncay Kuloğlu





## ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Osman VURAL

Tarih 19/07/2019  
İmza 

Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ELAĞIĞ

## İTHAF SAYFASI

*Sevgili Eşim ve Canım Oğluma...*



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince tecrübelerinden faydalandığım, değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU'na,

Eğitimim süresince beni yönlendiren, iyi niyetleriyle her zaman destek olan ve her an bilgi birikimlerinden faydalandığım Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri sayın Prof. Dr. İ. Enver OZAN'a, Prof. Dr. Leyla CANPOLAT KOYUTÜRK'e, Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU'na, Prof. Dr. D. Özlem DABAK'a, Dr. Öğr. Üyesi Nevin KOCAMAN'a, ayrıca tez çalışmamda yardımcı olarak katkıda bulunan değerli arkadaşım Arş. Gör. Ahmet TÜRK'e vetezime sağladığı finansmandan ötürü Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP) 'ne, son olarak yaşamım boyunca desteğini hiç esirgemeyen anneme, babama ve eşime çok teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                           |            |
|-------------------------------------------|------------|
| <b>KAPAK SAYFASI</b>                      | <b>i</b>   |
| <b>ONAY SAYFASI</b>                       | <b>ii</b>  |
| <b>ETİK BEYAN</b>                         | <b>iii</b> |
| <b>İTHAF SAYFASI</b>                      | <b>iv</b>  |
| <b>TEŞEKKÜR</b>                           | <b>v</b>   |
| <b>İÇİNDEKİLER</b>                        | <b>vi</b>  |
| <b>TABLolar LİSTESİ</b>                   | <b>ix</b>  |
| <b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b>                   | <b>x</b>   |
| <b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>                | <b>xi</b>  |
| <b>1. ÖZET</b>                            | <b>1</b>   |
| <b>2. ABSTRACT</b>                        | <b>3</b>   |
| <b>3. GİRİŞ</b>                           | <b>5</b>   |
| 3.1. Karaciğer                            | 5          |
| 3.1.1. Karaciğer Anatomisi                | 5          |
| 3.1.1.1. Karaciğer Damarları ve sinirleri | 5          |
| 3.1.2. Karaciğerin Embriyolojisi          | 6          |
| 3.1.3. Karaciğer Histolojisi              | 7          |
| 3.1.3.1. Klasik karaciğer lobçuğu         | 8          |
| 3.1.3.2. Hepatosit                        | 8          |
| 3.1.3.3. Golgi aygıtı                     | 10         |

|                                                        |           |
|--------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.3.4. Lizozom                                       | 10        |
| 3.1.3.5. Peroksizomlar                                 | 10        |
| 3.1.3.6. Bağ Dokusu Stroma                             | 10        |
| 3.1.3.7. Sinüzoidal Kapillerler (Sinüzoidler)          | 11        |
| 3.1.3.8. Perisinüzoidal Aralıklar (Disse aralıkları)   | 12        |
| 3.1.3.9. Safra Yolları                                 | 13        |
| 3.1.4. Karaciğer Fizyolojisi                           | 14        |
| 3.1.4.1. Karaciğerin Depo İşlevi                       | 14        |
| 3.1.4.2. Karaciğer enerji metabolizması                | 14        |
| 3.2. Metotreksat                                       | 15        |
| 3.2.1. Metotreksatın karaciğer üzerine etkileri        | 16        |
| 3.3. Serbest Radikaller                                | 17        |
| 3.3.1. Serbest oksijen radikalleri ve oksidatif stres  | 18        |
| 3.4. Antioksidanlar                                    | 18        |
| 3.4.1. Antioksidanların mekanizmaları                  | 18        |
| 3.4.2. N-asetilsistein                                 | 18        |
| 3.5. Asprosin                                          | 19        |
| 3.6 Araştırmanın amacı                                 | 20        |
| <b>4. GEREÇ ve YÖNTEM</b>                              | <b>21</b> |
| 4.1. Deney Hayvanlarının Beslenmeleri Barındırılmaları | 21        |
| 4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması                   | 22        |

|                                                                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3. Doku Örneklerinin Alınması                                                                                                   | 23        |
| 4.4. Histolojik Çalışma                                                                                                           | 23        |
| 4.5. Terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end-labeling (TUNEL) Metodu | 24        |
| 4.6. İmmünohistokimyasal Çalışma                                                                                                  | 26        |
| 4.7. Biyokimyasal Çalışma                                                                                                         | 27        |
| 4.8 İstatiksel analizler                                                                                                          | 27        |
| <b>5. BULGULAR</b>                                                                                                                | <b>28</b> |
| 5.1. Biyokimyasal Bulgular                                                                                                        | 28        |
| 5.1.1. Serum TAS ve TOS Düzeyleri                                                                                                 | 28        |
| 5.2. İmmünohistokimyasal Bulgular                                                                                                 | 29        |
| 5.3. TUNEL Bulgular                                                                                                               | 32        |
| <b>6. TARTIŞMA</b>                                                                                                                | <b>35</b> |
| <b>7. KAYNAKLAR</b>                                                                                                               | <b>40</b> |
| <b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                                                                | <b>47</b> |



## TABLÖLAR LİSTESİ

|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkibi | 22 |
| <b>Tablo 2.</b> Histolojik takip serileri                        | 24 |
| <b>Tablo 3.</b> TUNEL Boyama Prosedürü                           | 25 |
| <b>Tablo 4.</b> Serum TAS Ve TOS Düzeyleri                       | 28 |
| <b>Tablo 5.</b> Asprosin immünreaktivitesihistoskoru             | 29 |
| <b>Tablo 6.</b> Apoptotik İndeks                                 | 32 |



## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.</b> Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda asprosin immünreaktivitesi<br>(siyah ok) | 30 |
| <b>Şekil 2.</b> NAS grubuna ait karaciğer dokusunda asprosin immünreaktivitesi<br>(siyah ok)     | 30 |
| <b>Şekil 3.</b> MTX grubuna ait karaciğer dokusunda asprosin immünreaktivitesi<br>(siyah ok)     | 31 |
| <b>Şekil 4.</b> MTX+NAS grubuna ait karaciğer dokusunda asprosin immünreaktivitesi<br>(siyah ok) | 31 |
| <b>Şekil 5.</b> Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler<br>(siyah ok)     | 33 |
| <b>Şekil 6.</b> NAS grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler<br>(siyah ok)         | 33 |
| <b>Şekil 7.</b> MTX grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler<br>(siyah ok)         | 34 |
| <b>Şekil 8.</b> MTX+ NAS grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler<br>(siyah ok)    | 34 |

## KISALTMALAR LİSTESİ

|                                   |                                                                     |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>DAB</b>                        | : Diamino benzidin                                                  |
| <b>DNA</b>                        | : Serbest Oksijen Radikalleri                                       |
| <b>GSH</b>                        | : Redükte Glutasyon                                                 |
| <b>GSSG-R</b>                     | : Glutasyon Reduktaz                                                |
| <b>H&amp;E</b>                    | : Hematoksilen- Eozin                                               |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | : Hidrojen peroksit                                                 |
| <b>İ.P</b>                        | : İntraperitoneal                                                   |
| <b>MDA</b>                        | : Malondialdehid                                                    |
| <b>MTX</b>                        | : Metotrakset                                                       |
| <b>NADP</b>                       | : Nikotinamid Adenin Fosfat                                         |
| <b>NADPH</b>                      | : Nikotinamid Adenin Fosfatdehidrojenaz                             |
| <b>NAS</b>                        | : N-asetilsistein                                                   |
| <b>PBS</b>                        | : Phosphate buffered saline                                         |
| <b>SOR</b>                        | : Serbest Oksijen Radikalleri                                       |
| <b>TAS</b>                        | : Total Antioksidan Seviyesi                                        |
| <b>TOS</b>                        | : Total Oksidan Seviyesi                                            |
| <b>TUNEL</b>                      | : Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine |

## 1. ÖZET

Bir folik asit antagonisti olan Metotreksat (MTX), çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan sitotoksik kemoterapötik bir ajandır. Geniş kullanım alanına sahip olmasına rağmen doku ve organlarda ciddi yan etkileri olduğundan dolayı kullanımı sınırlanmaktadır. Bu çalışmada hem MTX kaynaklı karaciğer hasarına karşı güçlü bir antioksidan bir bileşik olan N-asetilsisteinin (NAS) etkilerine hemde yeni keşfedilmiş bir adipokin olan asprosinin serum ve dokuda MTX kaynaklı hasara bağlı değişiminin olup olmadığının belirlenmesi ve etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada 8-10 haftalık 24 adet, erkek Wistar Albino sıçanlar kullanıldı. Kullanılan deney hayvanları her grupta 6 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 14 günlük deney süresince herhangi bir işlem uygulanmadı. NAS grubundaki sıçanlara 100mg/kg/gün NAS intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. MTX grubundaki sıçanlara tek doz 20mg/kg metotreksat i.p. olarak uygulandı. MTX+ NAS grubundaki sıçanlara tek doz 20mg/kg metotreksat i.p. uygulanması ile beraber 100mg/kg/gün NAS i.p olarak uygulandı. Tüm gruplardaki sıçanlar 14 günlük deney süresi sonunda anestezi altında dekapite edilerek doku ve kan örnekleri alındı. Dokular rutin histolojik takip serilerinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan alınan kesitlere apoptozis için TUNEL yöntemi ve asprosin immünreaktivitesi için avidin-biotin-peroksidaz metodu uygulandı.

Çalışmamızda kontrol grubu ile NAS grubu arasında bakılan parametrelerde anlamlı bir farklılık yoktu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MTX grubunda Total Oksidan Seviye(TOS) anlamlı olarak artmış, Total Antioksidan Seviye(TAS) ve

asprosin seviyesi azalmıştı. MTX ile karşılaştırıldığında MTX + NAS grubunda ise TOS anlamı olarak azalmış ikenasprosin seviyesi artmıştı.

Sonuç olarak, MTX'in TOS düzeyini arttırdığı, asprosin seviyelerini azalttığı,tedavi olarak verilen NAS'ın TAS ve asprosin'ni arttırdığı görüldü. Asprosinin, karaciğer doku hasarının patofizyolojisi üzerindeki etkilerinin aydınlatılabilmesi için MTX'in farklı doz ve süreleri ile yeni deneysel çalışmaların gerekli olduğu kanaatine varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Rat, Metotreksat, Asprosin, N-asetilsistein

## **2. ABSTRACT**

### **Investigation of NAS (N-acetylcysteine) Effects on Asprosin Immunoreactivity in Liver Tissues of Experimental Methotrexate-Treated Rats**

A folic acid antagonist, Methotrexate (MTX), is a cytotoxic chemotherapeutic agent used in the treatment of various diseases. Although widely used, its use is limited as it has serious side effects on tissues and organs. This study aimed to investigate both the effects of N-acetylcysteine (NAS), a potent antioxidant compound against MTX - induced liver injury, and to determine whether or not a newly discovered adipokine, Asprosin, changes in serum and tissue due to MTX-induced damage.

In this study 8-10 weeks aged, twenty-four male Wistar Albino rats were used. The experimental animals used were divided into 4 groups of 6 animals in each group. No treatment was applied to the control group during the 14 days of experimental period. 100 mg / kg / day N-NAS was administered intraperitoneally (i.p.) to the NAS group. MTX group received a single dose of ( i.p) 20mg / kg methotrexate. MTX+NAS group received a single dose of ( i.p) 20mg / kg methotrexate with 100 mg / kg / day NAS . Rats in all groups were decapitated under anesthesia at the end of 14 days of experimental period and tissue and blood samples were taken. Tissues were embedded in paraffin blocks through routine histological follow-up series. TUNEL method for apoptosis and avidin-biotin-peroxidase method for asprosin immunoreactivity were applied to the sections taken from paraffin blocks.

In this study, no significant differences were observed between NAC and Control group in terms of analysed parameters. Compared with the control group,

both TAS and asprosin levels decreased significantly while TOS levels increased in MTX group. In Comparison with the MTX group, a significantly decreased TOS levels and increased asprosin levels were observed in MTX+NAC group.

As a result of MTX-induced toxicity, We observed that the liver TOS level increased while the asporsin level decreased. On the other hand NAC administration improved liver injury by decreasing the TOS level and increasing the asporsin level. We concluded that further experimental studies involving the treatment of MTX at different doses and durations are needed to clarify the effects of asprosin on the pathophysiology of liver tissue injury.

**Key Words:** Rat, Methotrexate, Asprosin, N-acetylcysteine

### **3. GİRİŞ**

#### **3.1. Karaciğer**

##### **3.1.1. Karaciğer Anatomisi**

Karaciğer; Sağ hipokondrium ile, epigastriumun bir kısmını ve sol hipokondriumu işgal eden ağırlığı yaklaşık 1.5 kg civarındadır. Karaciğer karın boşluğunun apikal kısmında lokalize olmuştur(1).Diyafragmatik yüz ve visseral yüz, ile önve arka kenarlara sahiptir (2). Ksifosternal eklem hizasında olan ön kenarı ile , linea medioklavikularis'te sağda 5'nci kıkırdak kaburga, solda 5'nci interkostal boşluğu birleştiren çizgi üzerindedir.Organ area nuda bölgesi hariç visseral periton ile örtülüdür. İki akciğer ve plevra'ları kalbin ventriküler bölgeleriyle ve aynı zamanda fibröz perikardiyumu diyafragma vasıtasıyla ayırmaktadır.Recessus subphrenicus olarak tanımlanan aralık ön yüz ile diyafragma arasındadır.Kıkırdak kaburgaların sağ 10'ncusu ile linea medioklavikularis'in sol 5'nci kıkırdak kaburganın olduğu kısım ile karaciğerin alt kenarı uzanmaktadır(1).Karaciğer; lobus sinister, lobus dexter, quadrat lob, kaudat lob olmak üzere 4 lobtan oluşmaktadır.Kaudat lobun'un sağ tarafında vena kava, sol tarafında ise venöz ligament bulunmaktadır (1-3).Karaciğerdeki ligamentlerin tümü ligamentum teres hariç periton tarafından oluşturulmuştur (1).Frontal plan boyunca uzanan koroner ligament diyafragma ve karaciğer arasındabulunmaktadır(3).

##### **3.1.1.1. Karaciğer Damarları ve sinirleri**

###### **Arter ve Venler**

Karaciğerde bulunan hepatik porttan kan akışını sağlayan damarlar, karaciğeri inerve eden sinirler ve lenf kanalları karaciğere giriş ve çıkış yaparlar. (3). Aorttan köken alan hepatik arter karaciğere oksijen düzeyi yüksek olan kanın önemli bir



kısmını taşıır (1). Portal venise mide ve barsak bölgesinden gelen venöz kanın karaciğere iletilmesini sağlar (3).

### **Sinirleri**

Sinirler çöliyak pleksustan dallara ayrılarak hepatis porta da hepatik pleksusu meydana getiriler. Hepatik pleksus içerisinde bulunan parasempatik ve sempatik sinirler ise n.vagus ve T7-T9'dan ayrılarak gelmektedirler. Karaciğerin en dışında bulunan peritonun zarının sinirsel invazyonu ise n.phrenicus ile olmaktadır (1).

### **3.1.2. Karaciğerin Embriyolojisi**

Embriyolojik dönemin 4.haftasında, ön bağırsağın kaudal tarafından ventral bir çıkıntı oluşmasıyla karaciğer gelişmeye başlar(4).Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucu, embriyonik endodermden köken alan hepatik divertikül ve pankreasın ventral kısmı farklı iki hücre topluluğundan geliştiği düşünülmektedir. Gelişimi devam eden kalp belirli bir miktarda Fibroblast Growt Faktör salgılar Growt Faktör ise bipotent hücreleri tetikleyerek hepatik divertikül oluşumunu aktive eder(5).Hepatik divertikül, gelişmekte olan kalp ve bağırsağın arasında bulunan splanknik mezoderme, septum transversum yönünde ilerler. Septum transversum, diyaframın belli kısmını ve bu kısımda bulunan ventral mezenter oluşturur. Karaciğer divertikulumu, mezenterin alt yapraklarının arasında gelişme gerçekleştirirken, iki kısıma ayrılmaktadır. Divertikulumda oluşan büyük kısım, karaciğerin ilk halidir. Sayıları artan hücreler karaciğerde hücre kordonlar topluluğunu ayrıca safra sisteminin intrahepatik bölümün epitel yüzeyini oluştururlar. Karaciğer 5.Hafta ve 10. Haftalar arasında hızlı bir gelişme gösterir ve karın boşluğunun büyük bir bölümünü doldurur (6). V.Umblikalisten gelen kandaki oksijen düzeyi, karaciğerin gelişmesini ve fonksiyonel segmentasyonunu

etkiler.6.haftada gerçekleşen hematopoez karaciğerinkırmızı renkte görünmesini sağlar. 9. haftayla birlikte karaciğer fetustaki toplam ağırlığın yaklaşık %10'unu oluşturur. 12. haftada karaciğer hücreleri safra üretimine başlar (5). Başlangıçta, dış hepatik safra yolları epitel hücreleriyle kapalı iken sonraları epitel hücrelerin dejenerasyonu ile vakuoller oluşur ve safra yolları gelişir. Hepatik divertikülün küçük kaudal parçası safra kesesini, divertikülün sapıda sistik kanalı oluşturur. Hepatik ve sistik kanalları duodenuma bağlayan kordondan safra kanalı (koledok) gelişir. Bu kanal başlangıçta duodenum halkasının ön yüzüne bağlıdır ancak duodenumun büyümesi ve rotasyonu ile arka yüze taşınmaktadır. 13. haftadan sonraki süreçte kanaldan geçiş yaparak duodenumun içine giren safra, mekonyumun koyu yeşil renk almasını sağlar.

Bu iki yapraklı ve ince olan membrandan aşağıdaki yapılar gelişir

1. Küçük omentum, karaciğerden midenin küçük kurvaturuna (hepatogastrik lig.) ve karaciğerden duodenuma (hepatoduodenal lig.) uzanır.
2. Falsiform ligament, karaciğerden karın ön duvarına uzanır.

Umblikal ven, umblikal kordon (göbek kordonu) çıkıp karaciğere ulaşırken falsiform ligamentin serbest kenarı boyunca uzanır. Mezogastriumdan kaynaklanan ventral mezenter aynı anda karaciğer dokusunun visseral peritonunu meydana getirir. Karaciğerin, diyafram ile doğrudan temas eden çıplak bölgesi (area nuda) hariç peritonla örtülüdür (5).

### **3.1.3. Karaciğer Histolojisi**

Dört adet zayıfça sınırlanmış lobdan oluşan karaciğer, insan vücudundaki en büyük bezdir. Karaciğer içerisinde kollejen lif ve elastik lifler bulunan kapsül ile örtülmüş olup, periton ile sarılmıştır (7). Karaciğer lobçuğunun mimarisinin üç adet

kavramsal yaklaşımı bulunmaktadır yapısal parametrelere dayalı olan karaciğer lobçuğunun klasik kavramı, birbirine komşu lobüllerden aynı safra kanalına safra boşalımı yaklaşımına dayalı portal lobül kavramı ve birbirine komşu lobüllerin venöz sinüzoidleri boyunca oksijenin dağılım derecelendirilmesine dayalı karaciğer asinusu kavramı;

#### **3.1.3.1. Klasik karaciğer lobçuğu**

Hekzagon bir yapı olarak tarif edilen kan sinüzoidlerinin birleştiği merkezi bir venül içeren polihedral bir yapıdır. Portal venin ve hepatik arterin birer dalları ve bir safra kanalı şeklinde portal triadı oluşturan yapılar, genellikle altıgenin açılı oluşturan bölgelerinde yer almaktadırlar.

Portal lobülde, Portal triad merkezi ekseninde yer almakta olup, etrafı saran hepatosit parenkimasından safrayı toplamaktadır (7). Bunlar; Klasik lobül, portal lobül ve karaciğer asinüsüdür. Karaciğer asinusu, Kan akışı, metabolizma aktivitesi ve karaciğer hastalıkları arasında iyi bir bağlantı sağlayan yapısal kısımdır. Karaciğerin asinusu, hepatik parankimin en küçük fonksiyonel üniti gösterir. Asinusun kısa eksenini, iki portal alan arasında, uzun eksenini iki santral ven arasında bulanan baklava şeklinde alanıdır. Kısa eksene en yakın bölüm zon 1, en uzak bölüm zon 3 olarak bilinir. 2. zon karaciğer asinüsünün santral bölgesidir (8).

#### **3.1.3.2. Hepatosit**

Hepatosit, bir hepatik lobülün fonksiyonel olan ekzokrin ve endokrin hücresidir. Hepatosit, sinüzoideal boşluklar ile çevrili olup, birbirlerine yaklaşarak hücre büyüklüğünde plaklar meydana getirirler. Perisinüzoidal aralık hepatositleri sinüzoidde bulunan kandan ayrılmasını sağlar. Bir hepatositin iki adet hücresel bölgesi bulunmaktadır. Bazolateral bölge ve apikal bölge, bazolateral bölgede fazla

miktarda mikrovillus bulunmaktadır ve yüzü disse aralığına bakmaktadır. Bazolateral bölge bir kısım kan kaynaklı maddelerin emilmesine ayrıca plazmada bulunan proteinlerin sentezine katkıda bulunur. Apikal bölge ise, mikrovillusların çevrelediği bir girinti şeklinde görülür, hepatositlerin bir dış salgı ürünü olan safranın dışarıya çıkmasını engellemek üzere kenar kısımlarının kapatmasını sağlayan safra kanaliküllerinin kenar kısımlarını örtmektedir. Hepatosit, plazmada bulunan proteinlerin üretiminde görev alan iri endoplazmik retikulumunun yanısıra glikoz sentezi, yağ sentezi ve toksinlerin atılım mekanizmaları ile ilişkili olan çok iyi gelişmiş bir yapı şeklinde düzgün yüzeyli endoplazma retikulumunu içerir. Düzgün yüzeyli endoplazma retikulumunun membranlarda yerleşik olan enzimlerin şu fonksiyonlardan sorumludurlar:

- 1) Kolesterol ve safra tuzlarının sentezi
- 2) Bilirubin, steroidler ve ilaçların glükuronid ile konjugasyonu
- 3) Glikojenin glikoza yıkılımı
- 4) Serbest yağ asitlerinin trigliseritlere esterleşmesi
- 5) Tiroid hormonları olan triiyodotironinden ve tiroksinden iyodun uzaklaştırılması
- 6) Düzgün yüzeyli endoplazma retikulumunun önemli ölçüde geliştiği fenobarbital gibi lipidde eriyebilir ilaçların detoksifikasyon işlemi (7).

#### **3.1.3.3. Golgi aygıtı**

Salgılanan proteinlerin glikolizasyonuna ve lizozimal enzimlerin çeşitlenmeleri işlemine katkıda bulunur (7).

#### **3.1.3.4. Lizozom**

Yaşam süresini doldurmuş olan ve plazmada bulunan glikoproteinleri, bazolateral kısımda hepatik lizozomun membran reseptörü ile içine alarak parçalar (7).

#### **3.1.3.5. Peroksizomlar**

Peroksizomlar, hücre zarı ile çevrelenmiş olup, hidrojen peroksit oluşturan çok sayıda oksidaz içermektedir. Hidrojen peroksitin zararlı bir ürün olması sebebi ile, hidrojen peroksit katalaz sayesinde yıkıma uğratılır. Bu gerçekleşen yıkım, karaciğer hepatosit hücreleri ve böbrek hücrelerinde gerçekleşmektedir. Peroksizomların oluşumu vucutta var olan peroksizomlardan tomurcuklanmayla meydana gelmektedir. Bu şekilde, peroksizomlarda bulunan proteinleri taşımaktadır. Peroksizomun içerisinde birbirinden farklı metabolik olaylarda görev alacak çok sayıda enzim çeşidi bulunmaktadır (7).

#### **3.1.3.6. Bağ Dokusu Stroma**

Karaciğer, dıştan visseral periton ile sarılıdır. Visseral periton yassı tek kattan oluşan mezotelyumdan ve onun hemen altın ince bağ dokudan meydana gelir. Hilum kısmında Glisson kapsülünün içerigirmesi ve hepatik portaldan itibaren organın içerisine dallanma gösteren ve karaciğere giriş yapan hepatik arter ile portal venin damar yolu ile ve safra kanalları ile beraber bağ dokusu biçiminde devam etmektedir (9). Bu şekilde karaciğer lob ve lobüller olarak kısımlara ayrılır. Sonuç olarak karaciğer bu sayede 1 milyon civarında genişliği 1 mm ve uzunluğun 1-2 mm olan

karaciğer lobülleri oluşur. Stroma içerisinde ise sinir, damar ve safra kanalları yer alır (10).

### **3.1.3.7. Sinüzoidal Kapillerler (Sinüzoidler)**

Hepatosit tabakaları arasındaki vasküler kanallardır (10). Portal aralığın etrafında hücreler periportal bağ dokuya yaslanmış bir şekilde bulunmaktadır. Portal aralık içerisinde yer alan portal ven ve hepatik arterdeki kan farklı yerlerde bulunan kapillerlerden büyük olan sinüzoidlere aktarılır (7). Hepatik sinüzoidler ince, devamlı olmayan bir endotelle sınırlıdır. Bu devamlı olmayan sinüzoidal endotel, devamlı olmayan bir bazal laminaya sahiptir. Komşu endotelyal hücreler arasında büyük pencereler bulunur. Hepatik sinüzoidler, diğer sinüzoidlerden farklı bir hücre tipi içerir. Bunlar sinüzoidal makrofajlar (Kupffer hücreleri)'dir. Kupffer hücreleri, mononükleer fagositik sisteme aittir (10). Bu hücrelerin gelişimi kemik iliğinde sırası ile promonosit, monoblast ve monosit farklılaşması ile başlar. Monositler kanda kupffer hücrelerine dönüşerek karaciğerde yerleşirler. Uzantılı yıldız şekilli bu hücrelerin gövdelerinin büyük bölümü lümende izlenir. Stoplazmik uzantıları ile sinüzoid duvarına tutunurlar. Bu hücreler kan yolu ile gelen antijenleri ve hasarlanmış eritrositlerden kaynaklanan stoplazmik parçaları ve demiri fagosit ederler. Ferritin hemosiderin granülleri şeklinde depolanabilir. Bu hücreler dışında karaciğerde pit hücreleri olarak isimlendirilen bir lenfosit subpopülasyonu bulunur. Parankimal olmayan hücrelerin yaklaşık %1'ini oluşturan bu büyük granüler lenfositler diğer organlarda yerleşen Natural Killer hücrelerin karşılığıdır. Bu hücrelerde kupffer hücreleri gibi kemik iliği kökenlidirler. Karaciğerde kalma süreleri yaklaşık iki hafta kadardır. Hayatta kalmaları kupffer hücrelerine bağımlıdır (8).

### 3.1.3.8. Perisinüzoidal Aralıklar (Disse aralıkları)

Sinüzoid endoteli ile hepatositler arasında bulunur. Perisinüzoidal aralık, kan ve karaciğer hücreleri arasında materyallerin değişim alanıdır. Perisinüzoidal aralık (Disse aralığı), hepatositlerin bazal yüzeyi ile sinüzoidleri çevreleyen endotelial hücrelerin ve Kupffer hücrelerinin bazal yüzeyi arasında bulunur. Bu aralığa, hepatositlerin bazal yüzeyinden, küçük, düzensiz mikrovilluslar uzanır. Endotelial tabakadaki büyük yarıklardan ve devamlı bir bazal laminanın yokluğundan dolayı, sinüzoidlerdeki kan plazması ve hepatosit plazma membranı arasında önemli bir engel oluşmaz. Hepatosit tarafından sentezlenen protein ve lipoproteinler, perisinüzoidal aralıkta kana transfer edilir. Bu yol, safradan ziyade karaciğer salgıları içindir. Fetal karaciğerde, kan damarları ve hepatositler arasındaki aralık, kan oluşturan hücre adalarını içerir. Erişkinlerde kronik anemi durumlarında, perisinüzoidal aralıkta kan oluşturan hücreler tekrar görülebilir. Sinüzoidal alanda yerleşen liposit veya ito hücresi olarak (yağ depolayan hücre, stellat hücre) bilinen hücrelerde bulunur. Mezenkimal orjinli olan bu hücreler stoplazmik lipid damlalarında retinil esterleri şeklinde A vitamini depolarlar. Altın kloridle de belirlenebilen bu hücreler rutin yöntemlerle stoplazmalarında yer alan lipid damlaları nedeniyle kolay tanınırlar. Bu hücrelerden retinol olarak salınan A vitamini proteinlere bağlanarak retinaya taşınırlar. Burada içerdiği 11-cis retinal opsin proteini ile bağlanarak rodopsini oluşturur. Rodopsin görmeyi sağlayan bir retina pigmentidir (10).

İto hücrelerinin ekstrasellüler matriks proteinlerini ve proteoglikanları, büyüme faktörleri ve sitokinleri salgılayabildikleri ve prostoglandin ve tromboksanA2 gibi regülatuar maddelere cevap olarak sinüzoid lümeninin çapını

ayarlayabildikleri bilinmektedir. Normal şartlarda karaciğer hücrelerinin %5-8'ini oluşturan İto hücrelerinin lipid depolamaları yanı sıra lipid yapısındaki antijenleri Natural Killer hücrelerine sunarak onların proliferasyonunu stimüle eden antijen sunan hücreler olabilecekleri öne sürülmüştür. Karaciğer hasarını takiben İto hücreleri aktive olur. Hücrelerde proliferasyon, kontraktilite ve kemotaksis görülür. İçerdikleri desmin ve  $\alpha$  aktin sayesinde kasılarak sinüzoidin vasküler rezistansını artırır (10).

Kronik inflamasyon, siroz gibi belirli patolojik şartlarda, İto hücreleri lipid ve A vitamin depolama yeteneklerini kaybederler ve miyofibroblast karakteristikleri olan hücrelere dönüşürler. Bu hücrelerin hepatik fibrojeneziste önemli rol oynadıkları gözlenmiştir. Bunlar, Tip I ve tip III kollajeni sentezler ve perisinüzoidal aralıklarda depolarlar ve karaciğer fibrozisine yol açarlar. Bu kollajen, portal aralığın bağ dokusu ile ve santral veni çevreleyen bağ dokusu ile devam eder. Perisinüzoidal fibröz stromadaki artış, karaciğerin toksik maddelere karşı erken bir sinyaldir. İlaveten, İto hücreleri karaciğer hasarından sonra ekstrasellüler matriksin yeniden yapılanmasında da rol oynarlar (10).

#### **3.1.3.9. Safra Yolları**

Safra kanalikülleri, hepatositlerin yüzeyinde bitişik oluklardan oluşan küçük kanallardır. Safra kanalikülleri, 6 yüzlü hepatositlerin 4 yüzünde tam bir halka oluştururlar. İki bitişik hepatositin mikrovillusları, kanaliküler lümene yayılır. Kanaliküllerin plazma membranında ATPaz ve diğer alkalin fosfatazlar lokalize edilebilir, safra sekresyonu, aktif bir işlemdir. Safra akımı, santral ven bölgesinden portal alana doğrudur (kan akışının tersi yönde). Portal alan yakınında fakat hala lobülün içindeyken safra kanalikülleri birleşerek kısa intrahepatik kanalları oluşturur.



Bunlar Hering kanallarıdır ve kübik non-hepatik hücrelerle döşelidir. Bu kanal epiteli, safra yollarının distal bölümü gibi devamlı bir bazal lamina ile sınırlıdır. İntrahepatik safra kanalları safrayı, hepatik kanallara taşırlar. Ekstrahepatik safra kanalları ise safrayı safra kesesi ve duodenuma taşırlar (10).

### **3.1.4. Karaciğer Fizyolojisi**

#### **3.1.4.1. Karaciğerin Depo İşlevi**

Barsak kapillerlerinden akan kan barsaklarda bulunan bakterilerle karışarak karaciğere götürür. Portal venden, karaciğere girmeden önce alınan kan numunesi sonucu kültür yapıldığında kolon basili üremesi görülür. Fakat sistemik dolaşımdan alınan kan numunesinde kültür yapıldığında kolon basili üremesi görülmez. Hepatik venöz sinüslerde bulunan, Kupffer hücrelerinin fagositik özelliklerinde dolayı, kan sinüsler içerisinden geçişi sırasında temizledikleri görülmüştür. Bakteri Kupffer hücresiyle karşılaştığı zaman, Kupffer hücresinin içine giren bakteri sindirilinceye kadar burada tutulur (11).

#### **3.1.4.2. Karaciğer enerji metabolizması**

Karaciğer bol; miktarda glikojen depo etme, galaktoz ve fruktozu glikoza dönüştürme, Glikoneogenez, karbonhidrat metabolizmasının ara ürünlerinden birçok önemli maddelerin oluşturulması gibi işlemleri karbonhidrat metabolizmasında gerçekleştirir (11). Karaciğer karbonhidrat ve yağ metabolizmasındaki faaliyetlerinin çoğunluğunda aksama meydana gelse dahi vücut canlılığını korur. Vücut, için karaciğerdeki protein metabolizması vazgeçilmezdir. Protein metabolizmasındaki karaciğerin görevleri; Vücutta amino asitlerin üretimi, metabolizma sonucu ürenin meydana gelişi ve amonyakın vücuttan atılması vücutta gerçekleşen reaksiyonlar için gerekliliğin ve diğer meteryallerin birbirleriyle etkileşimi esansiyel olmayan

aminoasitlerin sentezi şeklinde özetlenebilir (11).Karaciğerin lipit metabolizması ile ilgili ise yağ asitlerinin oksidasyonu lipoprotein sentezi karbonhidrat ve proteinlerin lipitlere dönüştürülmesi fonksiyonları şeklinde özetlenebilir. (11). Metotreksat sadece kanserli hücrele karşı değil, enerji metabolizmasında görev alan karaciğer hücrelerinde olumsuz etkilerler. (12). Klinik sahada geniş kullanım alanları olması ve karaciğer hücreleri üzerinde hasar oluşturmamasından dolayı daha fazla önem kazanmıştır (13).

### **3.2. Metotreksat**

Bir folat asit antagonisti olan metotreksat (MTX), ilk olarak 1948 de akut lösemili çocuklarda kullanılmıştır(14).Metotreksat antineoplastik özelliği olan lösemi, karsinoma, osteosarkoma hastalıklarında tercih edilen bir ilaçtır. Metotreksat; Bu hastalıklardan başka; romatoid artrit, psoriasis, lösemi, sarkoidoz, vaskulit ve bazı otoimmün hastalıklarda da tercih edilen bir etkindir (15,16). Hücreyi öldüren yada hücrenin fonksiyonunu durduran bu tür ilaçlar kanser ve sağlıklı hücrelere karşı etki ettikleri için bu hücrelere toksik etkileri vardır(12).Klinik kullanım alanlarının geniş olması ve karaciğerde toksik etki oluşturmamasından dolayı daha fazla önem kazanmıştır (13). MTX sadece karaciğere değil bunun yanında böbrek, ince barsak, kemik iliği, akciğer gibi organlara da önemli hasarlar oluşturmaktadır (17). MTX'in oral absorpsiyonu vücuda alınan MTX miktarına bağlıdır. Geçmiş zamanlarda yapılan çalışmalar MTX'in düşük dozda alımının absorpsiyonunun %70 civarında olduğunu göstermiştir(18).MTX'in dokulara iyi dağılım gösteren bir ajandır ve özellikle böbrek, safra kesesi, dalak, karaciğer ve deride yüksek konsantrasyonlara ulaşır. MTX böbreklerde haftalar, karaciğerde ise aylar boyunca kalmaktadır(19).

### 3.2.1. Metotreksatın karaciğer üzerine etkileri

MTX'in karaciğer hasarı üzerine olan olumsuz etkileri henüz tam açıklanmamış olsada hücre hasarı üzerine bazı mekanizmalar düşünülmektedir. MTX karaciğerde 7-hidroksimetotreksat metabolitine dönüşmekte ve poliglutamat şeklinde depo edilmektedir. Bu sebeple uzun zamanlı MTX tedavisi alınması karaciğerde poliglutamatın artmasına ve folat seviyesinde düşmeye neden olmaktadır.

Poliglutamatların karaciğer hücrelerinde birikmesi, hepatotoksitenin önemli nedeni olarak düşünülmektedir. MTX sitozolik NADPDH (nikotinamid adenin fosfatdehidrojenaz) ve NADP bağlı olan malik enzimin inhibesini gerçekleştirerek hücrenin içindeki NADPH azalmasını sağlamaktadır. NADPH, GSH (glutatyonun)'nın devam etmesini gerçekleştiren GSSG-R (glutatyon reduktaz) enzimi için gereklidir. Organizmaya MTX uygulanması sonucu GSH seviyesindeki azalma, antioksidan savunma sisteminin zayıflamasına neden olmaktadır (20). Bir çalışmada sıçanlara MTX verilmesinin kan, karaciğer, böbrek ve ince barsakta bulunan glutatyon (GSH) miktarının düşmesine, myeloperoksidaz etkinliğinin artışı ile malondialdehid (MDA) miktarının yükselmesine sebep olmuştur (21). Bu seviyelerdeki değişiklikler sonucu olarak steatozis, kolestazis ve karaciğerde siroz gibi böbreklerde hasar, kemik iliğinin baskılanması, mukozit, pulmoner fibrozis gibi ciddi yan etkiler oluşturmaktadır (20). Kronik MTX kullanımlarında karaciğerde histolojik açıdan, yağ infiltrasyonu, inflamasyon, hücrelerde nekroz ve sonuç olarak fibrozis şekillenmektedir. Bunların dışında MTX kullanımında uzun yıllar belirtiler gizlilik gösterebilmektedir (22). MTX tedavisi sırasında oluşabilen hepatotoksite, non- spesifik yağlı değişiklikler, nükleer polimorfizm, hepatosit nekrozu, kronik portal inflamasyon, fibrozis ya da siroz şeklinde ortaya çıkabilmektedir

(23)Karaciğer toksisitesinin gösterilmesinin en iyi yolu biyopsisi olup bulgular, genellikle MTX'ın 10 yıl gibi uzun süre kullanımı ya da MTX dozunun 1,5- 2,5 gramı geçmesi halinde kendini gösterebilmektedir (24). Bu nedenlerden dolayı MTX toksisitesinden korunmak veya azaltmak için antioksidan birlikte kullanması gerekliliği düşünülmektedir

### **3.3. Serbest Radikaller**

Serbest radikaller biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşan reaktif atom veya moleküllerdir. Çeşitli metabolik reaksiyonlar esnasında süperoksit anyonu, nitrik oksit, peroksil radikali ve hidroksil radikali gibi çok sayıda serbest radikaller oluşmaktadır (25). Moleküler oksijen, vücutta hücrelere giren ve fazla miktarda kullanılan moleküldür. Serbest radikal denildiğinde akla SOR (Serbest Oksijen Radikalleri) gelmektedir (26). Normal şartlar altında vücutta oluşan SOR ile antioksidanlar karşılıklı bir denge içerisindeyler. Antioksidanlarla serbest radikal içerisindeki dengenin bozulması halinde oksidatif stres ortaya çıkar. Oksidanların yükseldiği veya antioksidanların azaldığı olaylarda organizmanın maruz kaldığı “oksidatif stres” e bağlı olarak hücre mekanizmalarında aksamalar ortaya çıkar (27). Kendi aralarında bir bağ oluşturmamış elektronlar; yanındaki lipidler, proteinler ve karbonhidratlar gibi moleküllere karşı reaksiyona girmeye hazırdırlar. Böylece moleküler yıkım sonucu doku hasarı oluşur (28). Bazı hücrelerde serbest radikallerin çıkışı hücrelerin koruyucu mekanizmasından kaynaklı olabilir. Karaciğerde detoksifikasyon işlemi için serbest radikaller kullanır, nötrofiller ise patojenleri ortadan kaldırmak için serbest radikalleri oluşturabilir. Dokularda sayıca artış gösteren radikaller hücre membranında geçirgenlik artışı sonucu hücresel ölüme sebep olurlar(26).

### **3.3.1. Serbest oksijen radikalleri ve oksidatif Stres**

Serbest oksijen radikalleri (SOR), hidroksil, süper oksit, nitrik oksit ve lipid peroksid radikalleri gibi kimyasal yapı olarak farklılık gösterir. Canlı organizmadaki serbest radikaller içerisindeki önemli radikaller oksijen kaynaklı olanlardır (27).

### **3.4. Antioksidanlar**

#### **3.4.1. Antioksidanların mekanizmaları**

Serbest radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla organizmanın geliştirmiş olduğu savunma sistemine antioksidanlar denilmektedir (29).Etkilerini oksijen konsantrasyonunu azaltmak ve lipid peroksidasyon'unun başlamasına engel olarak gösterirler. Bu etkilerden farklı olarak antioksidanlar geçiş metal iyonlarına bağlanarak etkinliğini kaybettirirler ve peroksitlerin alkol gibi nonradikal ürünlere dönüşümünde görev alabilmektedirler. En belirgin özellikleri okside olmuş substratlara kıyasla çok az konsantrasyonlarda dahi, substratın okside olmasını geciktirmesi ve inhibe etmeleridir (30). Farklı yapılardaki serbest radikaller için hidrofilik ve lipofilik antioksidanlara ihtiyaç vardır. Hidrofilik antioksidanlar sitozol ve ekstraselüler sıvılarda, lipofilik özellikteki antioksidanlar ise membranlarda ve lipoproteinlerde bulunurlar (31).Antioksidanları birçok faktöre göre yapısal özelliklerine göre, çözünürlük özelliklerine göre, insan vücudundaki yerleşimlerine göre sınıflandırmak mümkündür. (32).

#### **3.4.2. N-asetilsistein**

Asetilsisteinin, solunum yollarında mukolitik ve ekspektoran etkisinden faydalanılmaktadır. Mukusun viskozitesi azaltarak solunum yollarında bulunan balgam yoğunluğunu ve yapışkanlığını azaltıcı hale getirir(24). Asetilsistein akciğer ve karaciğer dokusunda glutatyon sentezi içerisinde yer alarak glutatyon sentezinin

artışına neden olur. Asetilsistein serbest oksijen radikallerini bağlayarak hücre hasarını önler. NAS karaciğerdeki toksik etkisini, glutatyon sentezinde artışa neden olarak serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırarak etkinliğini göstermektedir(33). Metotreksat karaciğerde metabolize edilme sırasında bir kısmı ise sitokrom P 450 enzim sistem sayesinde daha farklı olan bir ürüne dönüştürülür(34, 35). Bu ürün ise glutatyon ile birleşerek idrar yoluyla vücut dışarı atılır. Yüksek seviyelerde metotreksatın vücuda verilmesi, oluşan metabolitinde artmasına neden olur; glutatyonun azalmasına bağlı olarak metabolitin inaktivasyonu da azalma meydana gelir (36). Böyle durumlarda asetilsisteinin vücuda verilmesi, karaciğerde glutatyonun normal seviyelere ulaşmasını sağlamış olur. Glutatyon ise metabolitle birleşerek muhtemel hücre hasarlarının önüne geçmiş olur(37). NAS' karaciğer hastalıklarında serbest oksijen radikallerin zararlarını azaltmak ve toksinleri uzaklaştırma özelliğinden dolayı yararlı olduğu bilinmektedir. NAS; karaciğerde kan akışındaki artış, GSH miktarının yükseltilmesi gibi yararlı etkileri bulunmaktadır(38). NAC'ın kullanım alanlarında, kalp damar hastalıkları, kanser, toksisite ve karaciğerde parasetamol toksisite tedavisi için kullanılmaktadır (39). Yapılan bir çalışmada etanol ile beslenen sıçanlara NAS ilave edilmesinin karaciğerde inflamasyonu azalttığı, steatozu artırdığı, proinflamatuvar sitokin gen ekspresyonunu azalttığı ve IGF-1 ve IGF-2 düzeyini artırdığı görülmüştür (40). Yapılan çalışmalarında rifampisin, metotreksat ve siklosporin A gibi hepatotoksitesi yüksek olan ilaçlarla oluşan hepatitin NAS uygulaması ile önlenileceği görülmüştür(41-43).

### **3.5. Asprosin**

Asprosin, pro-fibrilinin C-terminal bölümünden sentezlenen plazma glikoz düzeylerini artırmak için karaciğer hücrelerine etki eden glikogenik bir protein olup

enerji ve lipit metabolizmasına etkilidir. Esas salınım yeri beyaz yağ dokusu olup plazmada nanomolar seviyelerde dolaşır. Daha önceki çalışmalarda Asprosin uygulanmış farelerde kandaki glikoz seviyesinde artış asprosinin glikoz üretiminde rolünün olabileceğini düşündürmektedir; farelerde ve insanlarda Yapılan bir çalışmada açlık sırasında karaciğerde asprosinin glikoz üretimiyle ve insülinle ilişkisi olduğu belirlenmiştir (44-46). Bununla birlikte glukoz salınımındaki değişimlerinde karaciğer hasarına neden olabileceği bilinmektedir. (47, 48).

Daha önceki çalışmalarda ifade edildiği gibi adipokinlerin miktarındaki değişiklikler tip II diyabet, metabolik sendrom hipertansiyon ve astım gibi bir çok hastalıkların oluşmasında ve çeşitli inflamatuvar ajanların etkinliklerinin değişiminde etkili olduğu ve bu değişimlerin birçok dokuda olduğu gibi karaciğerde de bir çok fizyolojik ve patolojik durumu tetikleyebileceği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda adipokinlerin plazmadaki miktarlarının değişimlerine bağlı olarak karaciğerde hasar apoptozis, nötrofilik kemotaksis ve karaciğer kupffer aktivasyonunda değişimler ile insülin direnci gibi bir çok fizyolojik olayda etkili olduğu ifade edilmiştir (49).

### **3.6 Araştırmanın amacı**

Çalışmada deneysel olarak metotreksat uygulanan sıçanların karaciğer dokularında asprosin immünreaktivitesi üzerine NAS (N-asetilsistein)'in etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

#### **4. GEREÇ ve YÖNTEM**

Bu çalışma Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 27.06.2018 tarih ve 121 Sayılı kararı ile etik olarak uygun bulunmuş olup Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) biriminde ile Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji bölümü laboratuvarında yapıldı. Çalışmanın tüm giderleri Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP)' nin TF.19.08 proje no' lu kararı gereğince karşılandı.

##### **4.1. Deney Hayvanlarının Beslenmeleri Barındırılmaları**

Deneylerde kullanılan 24 adet 8-10 haftalık erişkin erkek Wistar Albino sıçanlar FÜDAM biriminden temin edildi. Deney hayvanlarının bulundukları ortamın ısısı 22–25 °C arasında sabit tutulmuş olup, 12 saat ışık ve 12 saat ışısız ortamda takip edildi. Deney hayvanları özel olarak yaptırılmış kafeslerde beslendi. Tüm deney hayvanlarına standart sıçan yemi verilerek yeterli miktarda su ve yiyecek alımları sağlandı. Hayvan yemleri Elazığ Yem Sanayi A.Ş.'nin fabrikası'nda hazırlandı. Yemlerinin içerikleri Tablo 1' de gösterildi.



**Tablo 1.** Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkihi

|                              |             |
|------------------------------|-------------|
| <b>Buğday (%)</b>            | <b>15</b>   |
| <b>Mısır (%)</b>             | <b>10</b>   |
| <b>Arpa (%)</b>              | <b>27</b>   |
| <b>Kepek (%)</b>             | <b>8</b>    |
| <b>Soya (%)</b>              | <b>29,4</b> |
| <b>Balık Unu (%)</b>         | <b>8</b>    |
| <b>Tuz (%)</b>               | <b>0,6</b>  |
| <b>Kavimix VM 23-Z (%) *</b> | <b>0,2</b>  |
| <b>Methionin (%)</b>         | <b>0,2</b>  |
| <b>DCP (%)**</b>             | <b>1,6</b>  |

\* 1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D<sub>3</sub>, 12 mg E, 0,8 mg K<sub>3</sub>, 0,8 mg B<sub>1</sub>, 2,4 mg B<sub>2</sub>, 1,2 mg B<sub>6</sub>, 0,006 mg B<sub>12</sub> vitaminleri, 16 mg Nicotin amid, 3,2 mg Cal. D. Panth. 0,32 mg Folic acid, 0,02 mg D-Biotin, 50 mg Cholin Chloride, 20 mg Zinc Bacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0,8 mg I, 0,2 mg Co, 0,06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca. \*\* % 18 fosfor, % 25 kalsiyum, % 0,2 flor'dan oluşur

#### **4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması**

Ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen 8-10 haftalık 24 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçanlarher grupta altı hayvan olacak şekilde dört farklı çalışma grubu oluşturuldu;

**Grup I (Kontrol grubu)(n=6):** Deney süresi olan 14 gün boyunca herhangi bir işlem yapılmadı.

**Grup II (NAS grubu)(n=6):** 14 günlük deney süresi boyunca 100mg/kg/gün NAS i.p olarak uygulandı.

**Grup III (MTX grubu)(n=6):** Tek doz 20mg/kg metotreksat i.p. olarak uygulandı.

**Grup IV (MTX+NAS grubu)(n=6):** Tek doz 20mg/kg metotreksat i.p. uygulanması ile beraber 14 günlük deney süresi boyunca 100mg/kg/gün NAS i.p olarak uygulandı.

#### **4.3. Doku Örneklerinin Alınması**

Deneyin sonunda tüm gruplara ait deney hayvanları ketamin (75mg/kg) + xylazine (10mg/kg) i.p uygulanarak dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından deney hayvanlarının karaciğer dokuları çıkarılarak rutin histolojik seri takip işlemi uygulandı.

#### **4.4. Histolojik Çalışma**

Tüm gruptaki deney hayvanlarından alınan karaciğer dokusu, % 10'luk formolde tespit edildikten sonra çeşme suyunda yıkamaya alındı. Yıkanan dokular klasik histolojik takip serilerinden geçirilerek (Tablo 5) parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan 4–6 µm kalınlığında kesitler alındı.

**Tablo 2.** Histolojik takip serileri

| Sıra | İşlem                          | Süresi    |
|------|--------------------------------|-----------|
| 1    | %70 Alkol                      | 2 saat    |
| 2    | %80 Alkol                      | 1.5 saat  |
| 3    | %96 Alkol I                    | 30 dakika |
| 4    | %96 Alkol II                   | 30 dakika |
| 5    | %100 Alkol I                   | 30 dakika |
| 6    | %100 Alkol II                  | 30 dakika |
| 7    | Alkol + Xylol                  | 15 dakika |
| 8    | Xylol I                        | 15 dakika |
| 9    | Xylol II                       | 15 dakika |
| 10   | Yumuşak parafin + Xylol        | 45 dakika |
| 11   | Yumuşak parafin                | 1 saat    |
| 12   | Yumuşak parafin + Sert parafin | 1.5 saat  |
| 13   | Sert parafin                   | 3 saat    |
| 14   | Gömme                          |           |

#### **4.5. Terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end-labeling (TUNEL) Metodu**

Parafin bloklardan 4-6 µm kalınlığında kesitler polilizinli lamlara alındıktan sonra üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTagPlus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi. Xylene ile deparafinize edilen kesitler, dereceli alkol serilerinden geçirilip phosphate buffered saline (PBS) ile yıkanmaya alındı. 0.05% 'lık proteinaz K ile 15 dakika inkübe edilen dokulardaha sonra endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için % 3 hidrojen peroksid ile 10 dakika inkübe edildi. Dokular PBS ile yıkandıktan sonra 6 dakika Equilibration Buffer ile inkübe edilip, 37° C'de nemli ortamda çalışma solüsyonu ile 60 dakika inkübasyona

bırakıldı. Ardındandokular Stop/Wash Buffer’da 10 dakika bekletildi.Daha sonra Anti-Digoxigenin-Peroksidaz ile 40 dakika muamele edilen dokulara Diaminobenzidine (DAB) substratı damlatılıp apoptotik hücreler görüntülendi. Harris hematoksisilen ile zıt boyası yapılan dokular, entellan ile kapatılıp ışık mikroskopunda incelenerek değerlendirilip fotoğraflandı.Kesitlerde 10'luk büyütmede normal ve apoptotik ortalama 500-1000 hücre sayıldı.Apoptotik hücrelerin, toplam (normal-apoptotik) hücelere oranlanarak apoptotik indeks (AI)’i hesaplandı.Boyama prosedürü tablo 3’de verilmiştir (Tablo 3).

**Tablo 3.** TUNEL Boyama Prosedürü

| İşlem                                                                   | Süre        |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 1 60°C etüv                                                             | Bir gece    |
| 2 Xylol                                                                 | 3X15 dakika |
| 3 %100, %96, %80, %70 etil alkol                                        | 3'er dakika |
| 4 PBS                                                                   | 5 dakika    |
| 5 Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.                   | .....       |
| 6 1:500 d ilüsyondaki Protinaz K solüsyonu                              | 20 dakika   |
| 7 PBS                                                                   | 3X5 dakika  |
| 8 Endojen peroksit blokajı (% 3 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )         | 3 dakika    |
| 9 PBS                                                                   | 3X5 dakika  |
| 10 Equilibration tampon solüsyonu                                       | 10 dakika   |
| 11 Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme ) 37°C’de | 60 dakika   |
| 12 Stop/Wash Buffer ( 2ml ) +Distile su (68ml) Oda sıcaklığında         | 10 dakika   |
| 13 Anti-Digoxigenin-Peroxidase                                          | 30 dakika   |
| 14 PBS                                                                  | 3X5 dakika  |
| 15 DAB Dilution Buffer + DAB Substrate                                  | 5-10 dakika |
| 16 PBS                                                                  | 3X5 dakika  |
| 17 Distile su                                                           | 5 dakika    |
| 18 Harris hematoksisilen                                                | 1-5 dakika  |
| 19 Distile su                                                           | 5 dakika    |
| 20 %80, %96 ve %100 etil alkol                                          | 1'er dakika |
| 21 Xylol                                                                | 2X5 dakika  |
| 22 Kapatma medyumunu kullanılarak lamel ile kapatma.                    | .....       |

#### 4.6. İmmünohistokimyasal Çalışma

Parafin bloklardan 4–6 µm kalınlığında alınan kesitler lamlara alınıp deparafinize edildi. Ardından alkol serilerinden geçirilen kesitler sitrat tampon solüsyonunda pH: 6'da mikrodalga fırında (750W) 12 dakika kaynatıldı. Kaynatmanın ardından soğutmak için oda ısısında bekletilen dokular PBS (Phosphate Buffered Saline), ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için 6 dakika hidrojen peroksid solusyonu uygulandı. PBS ile 3x5 dakika yıkanana dokulara 5 dakika blok solüsyonu uygulandıktan sonra 1/250 oranında dilue edilen asprosin primer antikor (anti- asprosin antibody, FNab09797, Fine Test, China) ile 60 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra primer antikor ile uyumlu sekonder antikor ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, sekonder antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkayıp Streptavidin ile 40 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra PBS içerisine alındı. Dokulara 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrate + AEC Chromogen solusyonu damlatılıp ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak tüm gruplar PBS ile yıkamaya alındı. Mayer's hematoksilen ile zıt boyaması yapılan dokular PBS ve distile sudan geçirilerek su bazlı kapatma solusyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

Boyamada immünreaktivitenin yaygınlığı ve esas alınarak histoskor oluşturuldu. Histoskor= yaygınlık x şiddet

#### **4.7. Biyokimyasal Çalışma**

Jelli biyokimya tüpleri içine alınankan örnekleri 4000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Serum örnekleri -80°C’de çalışma gününe kadar saklandı. Serum örneklerinde ELISA yöntemi ile Total Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Total Oksidan Seviyesi (TOS) ölçüldü.

TAS (Rat TAS Katalog no: YLA3389Ra YL Biotechnology Co., Ltd, Shanghai, CHINA) ve TOS (Rat TOS Katalog no: YLA1392Ra YL Biotechnology Co., Ltd, Shanghai, CHINA) düzeyleri, kitlerin kataloğunda belirtilen prosedürlere uygun olarak ölçüldü. Rat TAS elisa kitinin ölçüm aralığı: 1-300 pg/ml, Intra-Assay: CV değeri <%10, Inter-Assay: CV değeri <%12, Sensitivitesi 0,54 pg/ml idi. Rat TOS elisa kitinin ölçüm aralığı ise: 0,02-60 U/ml, Intra-Assay: CV değeri <%10, Inter-Assay: CV değeri <%12, Sensitivitesi 0,013 U/ml idi. Plate yıkamalarında otomatik yıkayıcı Bio-Tek ELX50 (BioTek Instruments, USA), absorbans okumalarında ChroMate, Microplate Reader P4300 cihazları (AwarenessTechnology Instruments, USA) kullanıldı. Test sonuçlarının birimi serum örnekleri için U/ml, doku örnekleri için ise dilüsyon faktörü ile çarpılarak U/mg cinsinden belirtildi.

#### **4.8. İstatiksel analizler**

İstatistiksel analiz için SPSS version 22 programı kullanıldı. Sayısal ölçümler medyan ve minimum - maksimum olarak özetlendi. İki grup arasında genel karşılaştırmada Kruskal Wallis testi kullanıldı. İki grup arasında karşılaştırmada Mann Whitney U testi kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.050 olarak alındı.

## 5. BULGULAR

### 5.1. Biyokimyasal Bulgular

#### 5.1.1. Serum TAS ve TOS Düzeyleri

Tüm gruplara ait serum TAS ve TOS düzeylerinin değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada; TAS düzeyleri; Kontrol ve NAS gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında MTX grubunda TAS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak izlendi. MTX grubu ile kıyaslandığında ise MTX+NAS grubunda TAS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış gözlemlendi. TOS düzeyleri; Kontrol ve NAS gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında; MTX grubunda TOS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış izlendi. MTX grubu ile kıyaslandığında ise MTX+NAS grubunda TOS düzeyleri anlamlı olarak azalmış gözlemlendi. Tablo 4.

**Tablo 4.** Serum TAS Ve TOS Düzeyleri

|                | <b>TAS (U/ml)</b><br>Mean (min-maks) | <b>TOS (U/ml)</b><br>Mean (min-maks)    |
|----------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>KONTROL</b> | <b>1,64 (1,46-1,82)</b>              | <b>17,32 (16,78-17,83)</b>              |
| <b>NAS</b>     | <b>1,87 (1,51-2,23)</b>              | <b>17,38 (15,88-18,62)</b>              |
| <b>MTX</b>     | <b>1,26 (1,02-1,37)<sup>a</sup></b>  | <b>22,97 (21,19-24,80)<sup>a</sup></b>  |
| <b>MTX+NAS</b> | <b>1,56 (1,44-1,68)<sup>b</sup></b>  | <b>18,99 (18,38-19,63)<sup>ab</sup></b> |

Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

<sup>b</sup> MTX grubu ile karşılaştırıldığında, ( $p < 0.05$ ).

## 5.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

Asprosinimmünreaktivitesi için yapılan boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; asprosin immünreaktivitesi karaciğer dokusunda hepatositlerde (siyah ok) gözlendi. Karaciğer dokusunda asprosin immünreaktivitesi; Kontrol (Şekil 1) ve NAS (Şekil 2) gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında MTX (Şekil 3) grubunda asprosin immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak izlendi. MTX grubu ile kıyaslandığında ise MTX+NAS (Şekil 4) grubunda asprosin immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış gözlendi. Tablo 5.

**Tablo 5.** Asprosin immünreaktivitesi histoskoru

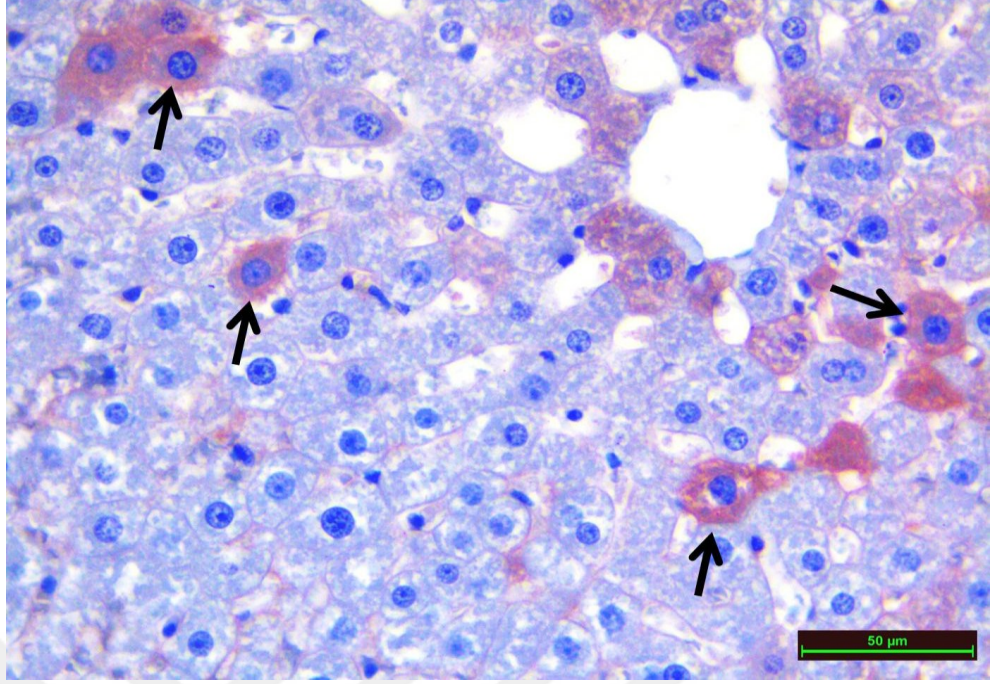
|                | <b>HİSTOSKOR</b>                    |
|----------------|-------------------------------------|
|                | Mean (min-maks)                     |
| <b>KONTROL</b> | <b>1,06 (0,80-1,80)</b>             |
| <b>NAS</b>     | <b>1,23 (0,80-1,80)</b>             |
| <b>MTX</b>     | <b>0,26 (0,20-0,40)<sup>a</sup></b> |
| <b>MTX+NAS</b> | <b>1,80 (1,20-2,70)<sup>b</sup></b> |

Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

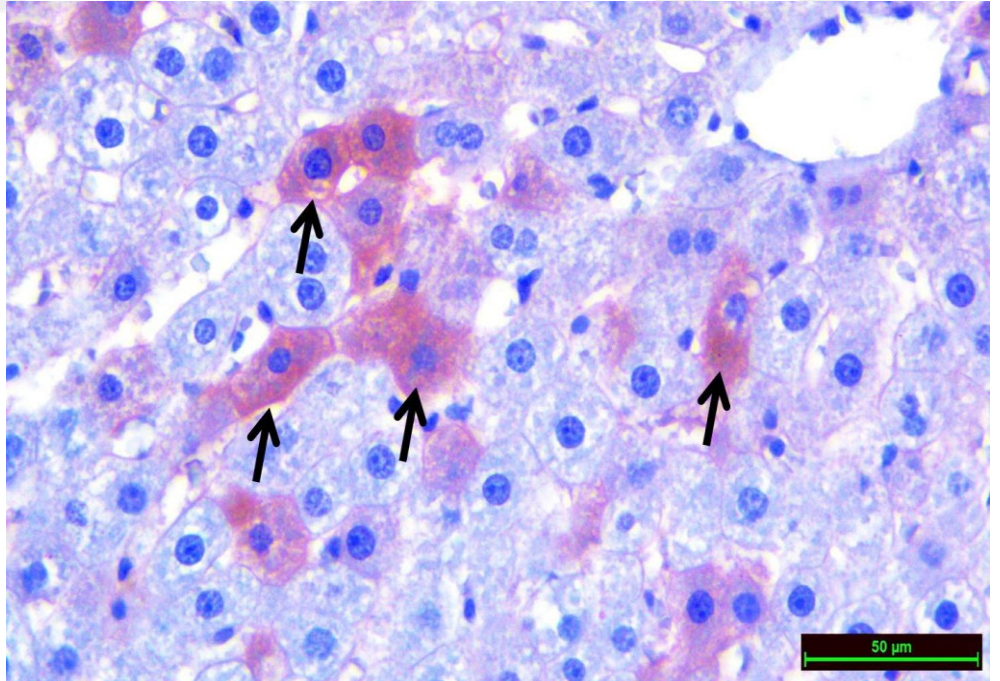
<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

<sup>b</sup> MTX grubu ile karşılaştırıldığında, ( $p < 0.05$ ).



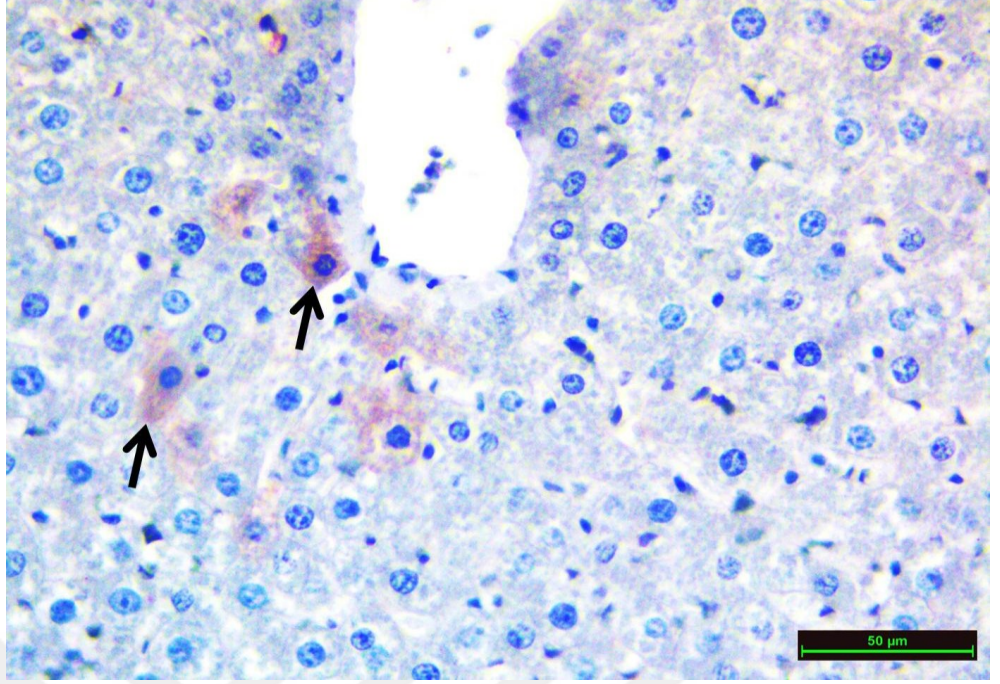


**Şekil 1.** Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda asprosin immünreaktivitesi (siyah ok)

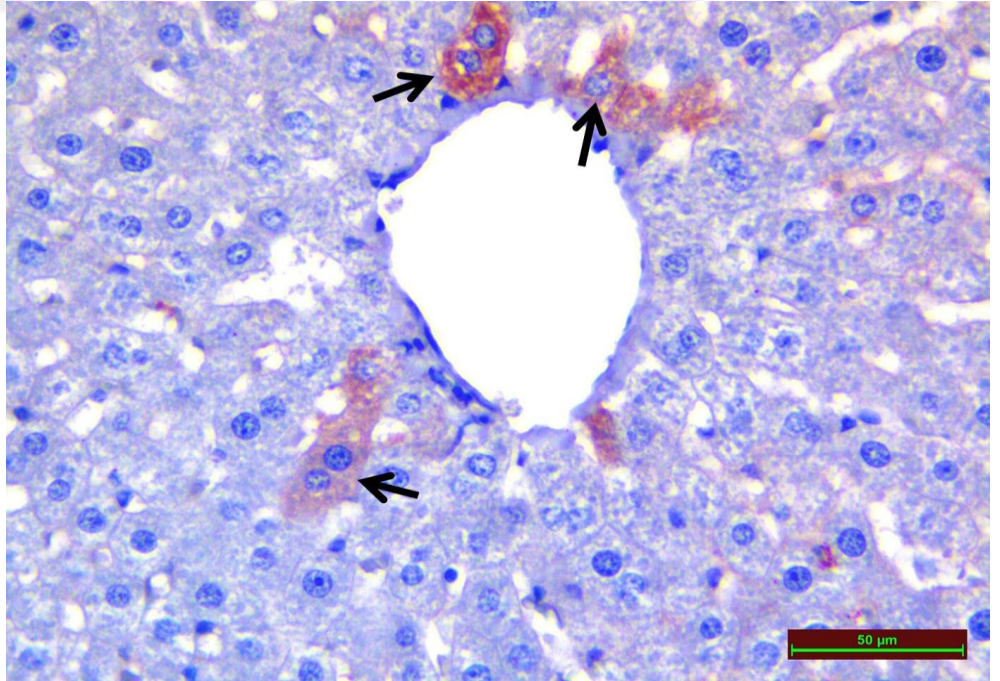


**Şekil 2.**NAS grubuna ait karaciğer dokusunda asprosin immünreaktivitesi (siyah ok)





**Şekil 3.**MTX grubuna ait karaciğer dokusunda asprosin immünreaktivitesi (siyah ok)



**Şekil 4.**MTX+NAS grubuna ait karaciğer dokusunda asprosin immünreaktivitesi (siyah ok)

### 5.3. TUNEL Bulgular

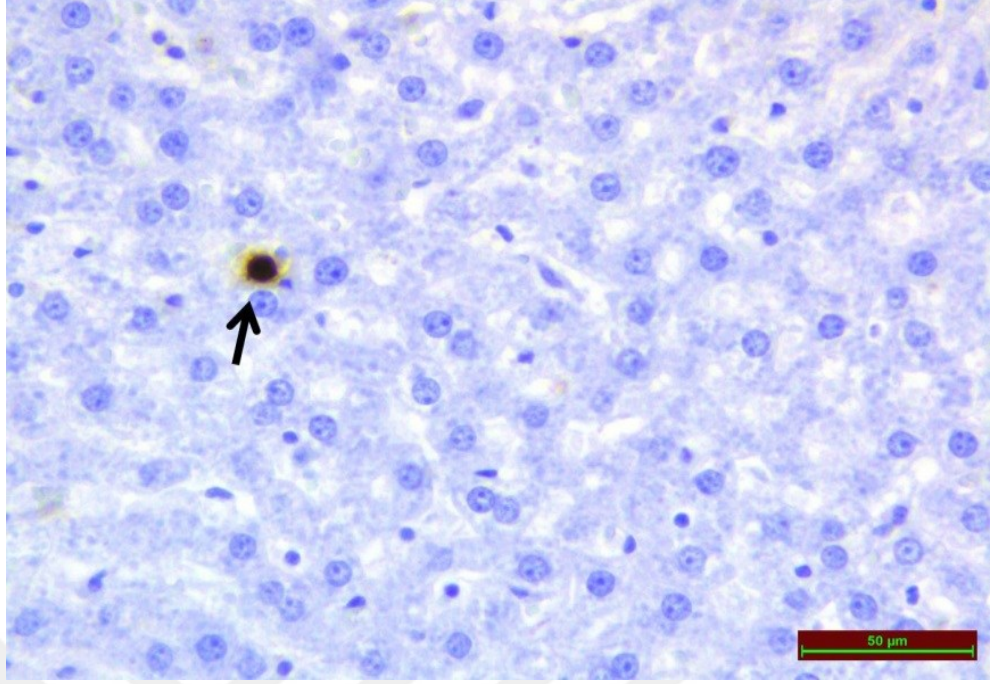
Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği karaciğer dokusunda hepatositlerde gözlemlendi (siyah ok).

TUNEL pozitifliği; Kontrol (Şekil 5), NAS (Şekil 6), MTX (Şekil 7) ve MTX+NAS (Şekil 8) gruplarında benzerdi. Tablo 6.

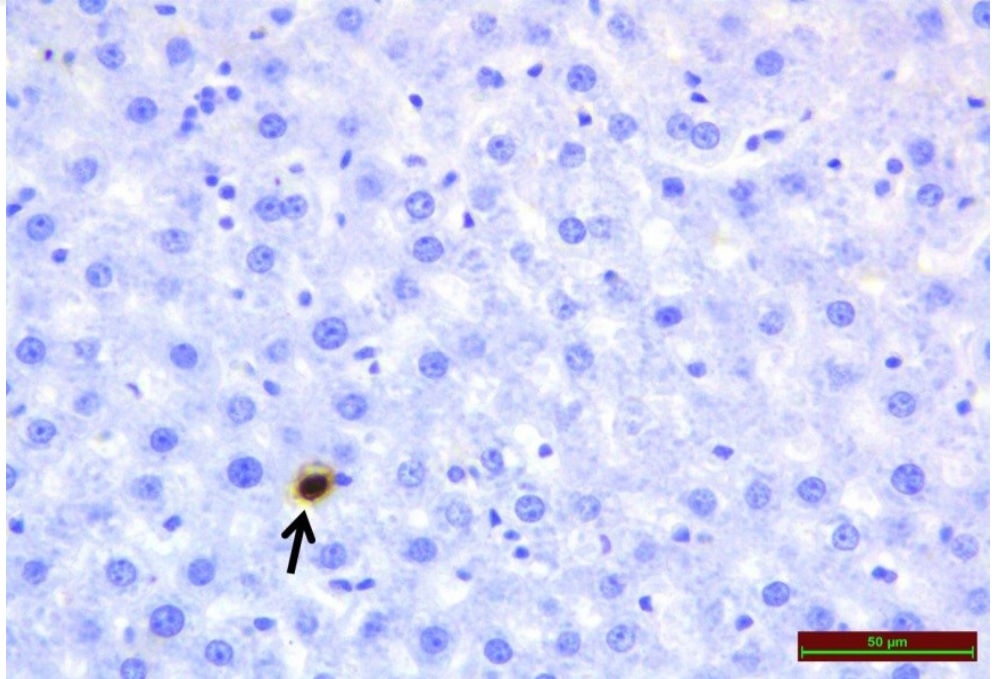
**Tablo 6.** Apoptotik İndeks (%)

|                | Apoptotik İndeks (%)    |
|----------------|-------------------------|
|                | Mean (min-maks)         |
| <b>KONTROL</b> | <b>2,50 (1,00-4,00)</b> |
| <b>NAS</b>     | <b>2,16 (1,00-4,00)</b> |
| <b>MTX</b>     | <b>2,83 (1,00-4,00)</b> |
| <b>MTX+NAS</b> | <b>2,50 (2,00-3,00)</b> |

Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

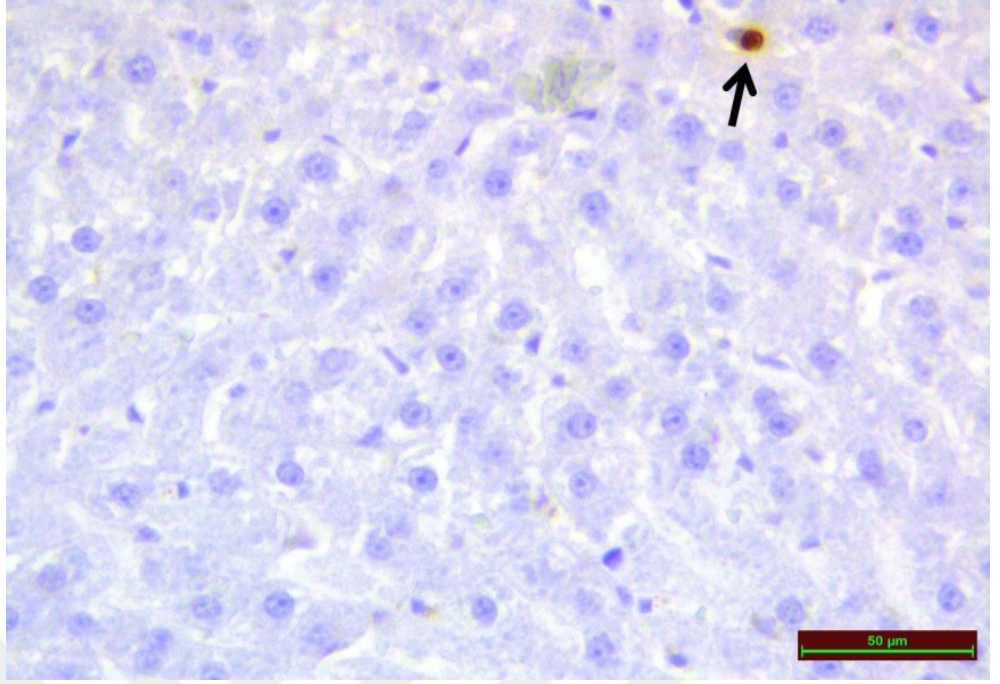


**Şekil 5.**Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler (siyah ok)

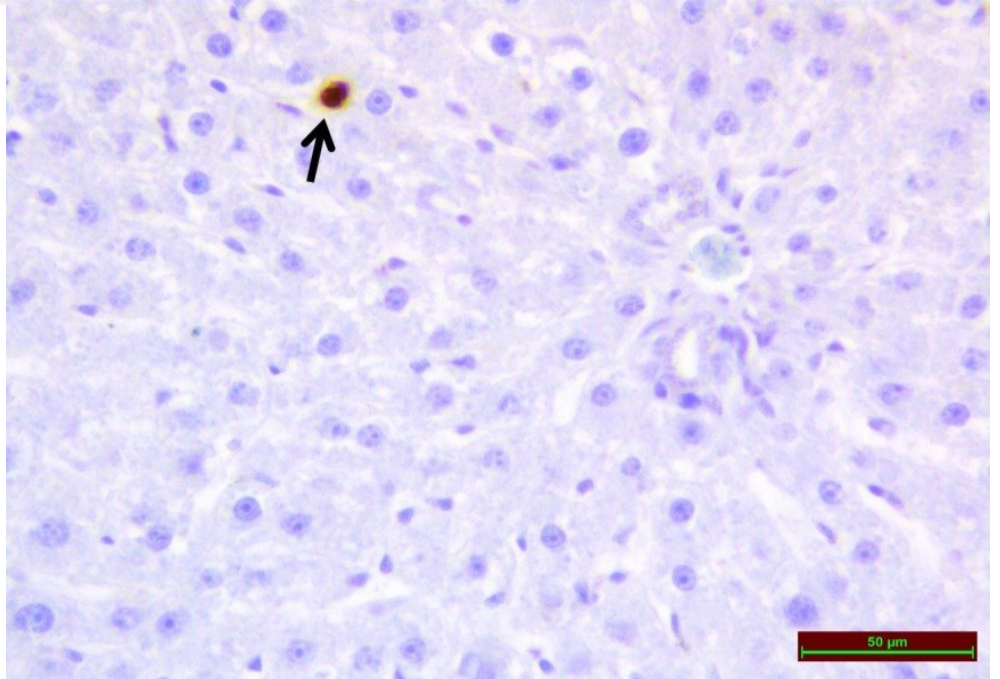


**Şekil 6.**NAS grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler (siyah ok)





**Şekil 7.**MTX grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler (siyah ok)



**Şekil 8.** MTX+ NAS grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler (siyah ok)

## 6. TARTIŞMA

Bir folik asit antagonisti olan MTX otoimmün hastalıklar, habis tümörler ve enflamatuvar hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli rahatsızlıkların tedavisi ve profilaksisi için yaygın olarak kullanılmaktadır (50,51). MTX karaciğer ve böbreklerde hasara neden olduğu gibi diğer bir çok doku ve organda ciddi toksik etkilerinin olması nedeniyle kullanımı sınırlanmaktadır(52).

MTX kaynaklı hepatotoksisitenin moleküler mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda MTX'a bağlı artan oksidatif stres ve folat antagonisti olmasına bağlı olarak pürin metabolizması dahil bir çok biyokimyasal yolu değiştirmesi iki farklı yoldan karaciğerde ciddi hasara neden olabileceğini göstermiştir (53). MTX ROS üretimini artırarak anti oksidan savunma aktivitelerinde değişim meydana getirmekte, hücre sel büyüme yi engellemekte ve metabolizmayı bozarak hepatotoksisiteye neden olmaktadır (52-54). Yapılan çalışmalarda, total antioksidan ve oksidan dengenin bozulması MTX kaynaklı hepatotoksisitenin gelişmesini ve ilerlemesini arttırdığı gösterilmiştir (54).

Bozkurt ve ark.yaptığı bir çalışmada sıçanlarda MTX uygulamasından sonra TAS seviyesinin düştüğü TOS seviyesinin arttığı ve karaciğerde hasar meydana geldiğini ifade etmişlerdir (55).Yine Moghadam ve ark.'nın yaptığı bir başka çalışmada ise MTX kaynaklı hepatotoksisitede TAS düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir (56).

Çalışmamızda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MTX grubunda TAS düzeyi düşmüş, TOS artmış iken apoptotik hücre sayısı istatistiksel olarak artmamıştır. Tedavi olarak NAS verilen grupta ise TAS yükselmiş, TOS düşmüştür. Çalışmadaki serum TAS/TOS değerleri birçok çalışma ile paralellik gösterecektir.

apoptotik hücre sayısının artmaması oldukça dikkat çekmiştir. Bu durum apoptozda farklı sinyal yollarının devreye girebilecek olması ve karaciğerin rejenerasyon yeteneği gibi organ üzerinde meydana gelen akut hasara karşı ani cevap oluşturmaya bağlı olarak apoptoza giden hücre sayısında anlamlı bir artışın meydana gelmemiş olabileceğini düşündürmekle birlikte yapılan güncel çalışmalarda; uzun dönemde ortamdaki ROS'un apoptozu indükleyebileceği ve hepatositlerde hücre içi ROS oluşumu ve apoptosisi uzun dönemde tetikleyebileceği belirtilmiştir(57,58). Ayrıca kısa dönemde ve aralıklı dozlarda MTX 'ın adenosin salınımına aracılık etmesi ve adenosinanti-enflamatuar ve anti-apoptotik yolların aktivasyonunda etkili olması, MTX in dolaylı olarak anti-enflamatuar ve anti-apoptotik karakter gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada MTX kaynaklı hepatotoksitede NAS'ın artmış oksidatif strese karşı TAS / TOS dengesinde iyileştirici etkilerinin olduğu görülmüştür.(59,60). NAS güçlü bir antioksidan, antienflamatuar ve hepatoprotektiftir. Aynı zamanda sülfhidril grubu ve GSH sentezi için bir rol oynamaktadır (61). NAS hücrelerde hayati bir rol oynamakta, apoptozun düzenlenmesi ve ROS süpürücüsü olması nedeniyle klinikte kanser tedavisinin yanı sıra kalp hastalıkları, kolit ve pankreatit gibi hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır(62, 63). Yaygın kullanılmasına rağmen NAS'nin antioksidan fonksiyonları ve mekanizmaları iyi bilinmemektedir. Fakat  $H_2O_2$  oluşumunun hedeflenmiş inhibisyonu ve hücre içi sisteini, GSH sentez yoluna yönlendirerek GSH'nin hücre içi içeriğini artırıp hücreleri oksidatif strese karşı koruduğu bilinmektedir(64). AL-Ali ve ark. Yaptıkları bir çalışmada yüksek doz parasetamola bağlı oluşan karaciğer hasarında NAS, hücrelerde GSH seviyesini artırarak toksititeye karşı koruyucu ve etkin bir bileşik

olduğunu ifade etmişlerdir(65).Çıralık ve ark.Yaptıkları bir çalışmada 5 gün 150 mg/kg NAS verilen sıçanlarda mtx kaynaklı ince barsak hasarına karşı NAS' ın antioksidan enzim seviyeleri artırarak dokuda hasarı giderici yönde etkilerinin olduğunu ifade etmişlerdir(66).Bugüne kadar birçok çalışmada karaciğer, böbrek ve testis gibi birçok organda toksisiteye neden olmaktadır (67- 69).

Karaciğerin çok fonksiyonel görevler yerine getirmesi enerji ve lipid metabolizmasında etkin görev alması ve hasarlanmasında birçok mekanizmanın etkili olması karaciğer üzerinde multidisipliner alanlarda çalışmalara devam edilmektedir. Adipokinlerin miktarındaki değişiklikler tip II diyabet, metabolik sendrom, hipertansiyon ve astım gibi pek çok hastalığın ortaya çıkmasında ve çeşitli inflamatuvar ajanların etkinliklerinin değişiminde etkili olduğu ve bu değişimlerin birçok dokuda olduğu gibi karaciğerde de bir çok fizyolojik ve patolojik durumu tetikleyebileceği bilinmektedir (49).

Yapılan çalışmalarda adipokinlerin plazmadaki miktarlarının değişimlerine bağlı olarak olarak karaciğerde lipid meatbolizmasında değişimler, hasar, apoptozis, nötrofilik kemotaksis ve karaciğer kupffer aktivasyonunda değişimler ile insülin direnci gibi birçok fizyolojik olayda etkili olduğu ifade edilmiştir(70).Bu çalışmada MTX uygulamasından sonra tedavi olarak verilen NAS'ın asprosin üzerindeki etkileri incelenmiştir. MTX ile induklenen sıçanlarda, inflamasyon ve apoptoz üzerinde etkili olabileceği ileri sürülen ve bu konu hakkında çok az literatür bilgisi olan asprosin'nın bu çalışmada; hepatositlerde immünreaktivitesinin anlamlı şekilde azaldığı, tedavi olarak verilen NAS'ın ise asprosin immün reaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana getirdiği görülmüştür. Asprosin, pro-fibrilinin C-terminal bölümünden sentezlenen plazma glikoz düzeylerini artırmak



için karaciğer hücrelerine etki eden glikogenik bir protein olup enerji ve lipid metabolizmasında etkili bir adipokindir. Esas salınım yeri beyaz yağ dokusu olup plazmada nanomolar seviyelerde dolaşır. Daha önceki çalışmalarda asprosin uygulanmış farelerde kandaki glikoz seviyesinde artış asprosinin glikoz üretiminde rolününün olabileceğini düşündürmektedir; Bununla birlikte glukoz salınımındaki değişimlerinde karaciğer hasarına neden olabileceği bilinmektedir (44, 45). Farelerde ve insanlarda yapılan bir çalışmada açlık sırasında karaciğerde asprosinin glikoz üretimiyle ve insülin ile ilişkisi olduğu belirlenmiştir (46, 47, 48)Özellikle, asprosin hepatik glukoneogenezi uyarak hücrelerde cAMP seviyesini yükseltilmesi ve kan şekeri düzeylerinde değişim meydana getirmesi nedeniyle diyabetin gelişimine zemin hazırlayabileceği ifade edilmiştir (46).Bunun yanında Wang ve ark. nın iskelet kası üzerinde yaptıkları bir çalışmada asprosinin inflamasyonda ve insülin direncinde etkili olabileceğini ifade etmişlerdir. Ayrıca, bir başka çalışmada ise asprosin'in inflamasyon, hücresel fonksiyon bozukluğu ve apoptoz üzerinde etkilerinin olduğu belirtilmiştir(71). Lee, T. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise enflamasyona ve fonksiyon bozukluklarında  $\beta$  hücre fonksiyonunun korunmasında asprosin'nin yeni tedavi yaklaşımlarının belirlenmesinde etkili olabileceği kanaatine varmışlardır(72). Alan M. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada asprosin düzeyleri, insülin direnci, ile pozitif korelesyonun olduğunu ifade etmişlerdir (73).Bizim çalışmamızda daliteratürlere dayanılarak MTX'ın enerji metabolizması ve dolayısıyla lipid metabolizması üzerinde olumsuz etkilerininin olabileceği ve bundan dolayı hepatositlerde meydana gelen hasara bağlı asprosin immünreaktivitesinin azalmış olabileceği ve tedavi olarak verilen NAS 'ın hepatosit hasarını önleyerek asprosin salınımını artırdığınıdüşünmekteyiz.

Sonuç olarak; MTX'in TOS düzeyini arttırdığı, asprosin ve TAS seviyelerini azalttığı, tedavi olarak verilen NAS'ın TAS ve asprosin düzeyini arttırdığı, asprosin'in karaciğer doku hasarının patofizyolojisi üzerindeki etkilerinin aydınlatılabilmesi için başta MTX olmak üzere farklı oluşturulacak karaciğer hasarı modellerinde yeni deneysel çalışmaların gerekli olduğu kanaatine varılmıştır.



## 7. KAYNAKLAR

1. Ozan H. (2004) Karaciğer, In: Ozan H.(ed) Ozan Anatomi, Ankara, Nobel Tıp Kitabevi.
2. Sarsılmaz M. (2000) Karaciğer, In: Sarsılmaz M. (ed) Anatomi, Ankara, Nobel Yayın Dağıtım.
3. Aktümsek A. (2001) Anatomi ve Fizyoloji (İnsan Biyolojisi) (1. Baskı). Nobel Yayın Dağıtım, Ankara
4. Srivastava S, Srivastava AK, Srivastava S, Patnaik GK, Dhawan BN.. Effect of picroliv and silymarin on liver regeneration in rats. Indian Journal of Pharmacology 1994; 26: 19-22.
5. Sadler TW, ed. Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji. Basaklar C (Çev. Ed.),Ankara, Palme Yayıncılık, 1993; 230-231.
6. Moore KL, ed. Moore KL,Persaud T.V.N. klinik yönleriyle insan embriyolojisi Dalçık H.,Yıldırım M. (Çev. Ed.) Nobel Tıp Kitabevi, 2009; 218-20.
7. Abraham LK, ed. Karaciğer , In: Demir R. (ed) Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş, Ankara, Palme Yayıncılık. 2006. ;459-474
8. William KO, ed.. William K.O., Patrick C.N. Karaciğer, In: Müftüoğlu S., Kaymaz M., Atilla P. (eds) Netter's Essential Histology, Ankara, Güneş Kitabevi 2009; 312-325.
9. Cowley AW, Jr., Mori T, Mattson D, Zou AP. Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2003; 284: 1355-69.
10. Sodeman's\_Pathologic\_Physiology, ed. Sodeman's Pathologic Physiology, (Sodeman's Fizyopatoloji). Mechanism's of disease. 1992 Cilt II.Bölüm 4.
11. Gillman Ga, ed. Tedavinin Farmakolojik Temeli. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2009; 1315-405.
12. Reide P., Taylor M. (2000) Antimetabolitler, In: Ozer H. (ed) Mosby's Crash Course Farmakoloji, 1. Baskı, Ankara, Güneş Tıp Kitabevi.
13. Uraz S., Tahan V., Aygun C., ve ark. (2007) Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver Toxicity. Dig Dis Sci DOI 10.1007/s10620-007-9949-3.

14. Page CP., Curtis MJ., Sutter MJ., Walker MJ., Hoffman BB. (eds), (1997) Pharmacology, (Second Edition), Barcelona, Mosby.
15. Şendur N., Karaman G., Şavk H., ve ark. (2002) Akut Metotreksat Toksisitesinin Erken Belirtisi ; Deri Ülserleri. T Klin Tıp Bilimleri **22**, 593-596.
16. Totan M., Ak AH. R., Albayrak D., (1999) Yüksek Doz Metotreksat Tedavisine Bağlı Karaciğer ve Böbrek Toksisitesi. T Klin J Pediatr **8**, 185- 188.
17. Olson J. (2000) Klinik Farmakoloji, 1.Baskı, Ankara, Hacettepe Taş Yayıncılık.
18. Vezmar S, Becker A, Bode U, Jaehde U.. Biochemical and clinical aspects of methotrexate neurotoxicity. Chemotherapy 2003; 49: 92-104.
19. Uz E, Oktem F, Yılmaz HR, Uzar E, Ozguner F.. The activities of purine-catabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. Mol Cell Biochem 2005; 277: 165-70
20. Evans P, Halliwell B.. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. Br J Nutr 85 2001; 2: S67-74.
21. Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. The pharmacology and clinical use of methotrexate. N Engl J Med 1983; 309: 1094-104.
22. Koppenol WH.. The Haber-Weiss cycle--70 years later. Redox Rep 2001; 6: 229-34.
23. Kevat S, Ahern M, Hall P. Hepatotoxicity of Methotrexate in Rheumatic Diseases. Med Toxicol Adverse Drug Exp. 1998 May- June; 3(3): 197- 208)
24. Kayaalp O. (2002) Kayaalp Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 10.Baskı, Ankara, Hacettepe Taş Yayıncılık.
25. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi 1997; 3-4: 92-5
26. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J 2001; 357: 593-615.
27. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem 1997; 272: 20313-6.

28. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004; 142: 231-55.
29. Halliwell, B. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition* 1996; 16: 33-50.
30. Yanbeyi S, Aspirin ve Antioksidant Buthylated Hydroxyanisole'ün Tavşanlarda Eritrosit Total Katalaz, Süperoksit Dismutaz ve Glutasyon Peroksidaz Aktiviteleri Üzerine Etkileri. Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun 1999
31. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann Botany* 2003; 91: 179-194.
32. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84
33. Thong – Ngam D., Samuhasaneeto S., Kulaputana O., (2007) N- Acetylcysteine Attenuates Oxidative Stres and Liver Pathology in Rats With Non- Alcoholic Steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 28; 13(36), 0000-0000.
34. Süzer Ö., (2002) Karaciğer Hastalıklarında İlaç Kullanımı ve Hepatotoksik Etkileri. Hepato- Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyum Dizisi 28, 37-42.
35. Vural N. (1996) Karaciğer Zehirleri, In: Vural N. (ed) Toksikoloji, Ankara, Ankara Üniversitesi Basımevi
36. Zhang Shui- Jun., Ma Ting- Wu., Ma Xiu- Xian., et al. (2006) Protective Effects of N- Acetylcysteine on Brain- Dead Rat Liver. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 5,428-431.
37. Awi W., Valery R., Ron B.A., et al. (2000) N-Acetyl-L-Cysteine for preventing lung reperfusion injury after liver ischemia-reperfusion. *Transplantation* 69(5), 853-859.
38. Angulo P, Lindor KD. Treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Best Practise & Research Clinical Gastroenterology* 2002; 5: 797-810.

39. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2003; 60: 6-20.
40. Setshedi M, Longato L, Petersen DR, et al. Limited therapeutic effect of N-acetylcysteine on hepatic insulin resistance in an experimental model of alcohol-induced steatohepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2011;35:2139-51
41. Kaya H, Koc A, Sogut S, et al. The protective effect of N-acetylcysteine against cyclosporine A-induced hepatotoxicity in rats. *J Appl Toxicol* 2008;28:15-20
42. Rana SV, Attri S, Vaiphei K, et al. Role of N-acetylcysteine in rifampicin-induced hepatic injury of young rats. *World J Gastroenterol* 2006;12:287-91
43. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken B. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit* 2006; 12:BR274-8.
44. Romere, C., Duerrschmid, C., Bournat, J., Constable, P., Jain, M., Xia, F., Saha, P.K., Del Solar, M., Zhu, B., York, B., Sarkar, P., Rendon, D.A., Gaber, M.W., LeMaire, S.A., Coselli, J.S., Milewicz, D.M., Sutton, V.R., Butte, N.F., Moore, D.D., Chopra, A.R., 2016. Asprosin, a fasting-induced glucogenic protein hormone. *Cell* 165, 566–579.
45. Zhang, L.; Chen, C.; Zhou, N.; Fu, Y.; Cheng, X. Circulating asprosin concentrations are increased in type 2 diabetes mellitus and independently associated with fasting glucose and triglyceride. *Clin. Chim. Acta* 2019, 489, 183–188
46. Duerrschmid, C.; He, Y.; Wang, C.; Li, C.; Bournat, J.C.; Romere, C.; Saha, P.K.; Lee, M.E.; Phillips, K.J.; Jain, M.; et al. Asprosin is a centrally acting orexigenic hormone. *Nat. Med.* 2017, 23, 1444–1453
47. Gerich, J.E. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: Therapeutic implications. *Diabet. Med.* 2010, 27, 136–142.
48. Dey, A. Chandrasekaran, K. Hyperglycemia induced changes in liver: In vivo and in vitro studies. *Curr. Diabetes Rev.* 2009, 5, 67–78

49. Gehrke, N.Biedenbach, J. Huber, Y. Straub, B.K. Galle, P.R. Simon, P.; Schattenberg, J.M. Voluntary exercise in mice fed an obesogenic diet alters the hepatic immune phenotype and improves metabolic parameters: an animal model of life style intervention in NAFLD. *Sci. Rep.* 2019, 9, 4007.
50. E. Kose, H.I. Sapmaz, E. Sarihan, N. Vardi, Y. Turkoz, N. Ekinici, Beneficial effects of montelukast against methotrexate-induced liver toxicity: a biochemical and histological study, *Sci. World J.* 2012 (2012) 1–6.
51. S. Dalaklioglu, G.E. Genc, N.H. Aksoy, F. Akcit, S. Gumuslu, Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation, *Hum. Exp. Toxicol.* 32 (6) (2013) 662–671.
52. Şahan C, Öztürk M. Kanser kemoterapisi ve karaciğer. *OMÜ Tıp Dergisi* 2003; 20: 47-60.
53. Akbulut, S., Elbe, H., Eris, C., Dogan, Z., Toprak G., Otan, E., & Turkoz, Y. (2014). Cytoprotective effects of amifostine, ascorbic acid and N-acetylcysteine against methotrexate-induced hepatotoxicity in rats. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(29), 10158.
54. Hadi NR, Al-Amran FG, Swadi A. Metformin ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity. *J Pharmacol Pharmacother.* 2012;3:248–253.
55. Bozkurt M, Bodakcı M, Turkeu G, et al. Carvacrol'ün sıçanlarda metotreksatın neden olduğu karaciğer toksisitesine karşı koruyucu etkileri. *Acta Chir Belgeli* 2014; 114: 404-9.
56. Moghadam, A. R., Tutunchi, S., Namvaran-Abbas-Abad, A., Yazdi, M., Bonyadi, F., Mohajeri, D., ... & Ghavami, S. (2015). Pre-administration of turmeric prevents methotrexate-induced liver toxicity and oxidative stress. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 246.
57. Chen, T., Wang, Q., Cui, J., Yang, W., Shi, Q., Hua, Z., Ji, J., Shen, P., 2005. Induction of apoptosis in mouse liver by microcystin-LR: a combined transcriptomic, proteomic, and simulation strategy. *Mol. Cell. Proteom.* 4, 958–974.
58. McClain, D.E., Kalinich, J.F., Ramakrishnan, N., 1995. Trolox inhibits apoptosis in irradiated MOLT-4 lymphocyte. *FASEB J.* 9, 1345–1354.
59. Jiang QL, Zhang S, Tian M, Zhang SY, Xie T, Chen DY (2015) Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anticancer drugs in apoptosis and autophagy. *Cell Prolif* 48:17–28

60. Abo-Haded, H. M., Elkablawy, M. A., Al-Johani, Z., Al-ahmadi, O., & El-Agamy, D. S. (2017). Hepatoprotective effect of sitagliptin against methotrexate induced liver toxicity. *PloS one*, 12(3), e0174295.
61. N.L. Kobrinsky, D.E. Sjolander, J.A. Goldenberg, T.C. Ortmeier, Successful treatment of doxorubicin and cisplatin resistant hepatoblastoma in a child with Beckwith–Wiedemann syndrome with high dose acetaminophen and N-acetylcysteine rescue, *Pediatric Blood Cancer* 45 (2) (2005) 222–225.
62. A.J. Rodrigues, P.R.B. Evora, H.V. Schaff, Protective effect of N-acetylcysteine against oxygen radical-mediated coronary artery injury, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37 (8) (2004) 1215–1224.
63. E. Akgun, C. Caliskan, H.A. Celik, A.O. Ozutemiz, M. Tuncyurek, H.H. Aydin, Effects of N-acetylcysteine treatment on oxidative stress in acetic acid-induced experimental colitis in rats, *J. Int. Med. Res.* 33 (2) (2005) 196–206
64. Kahraman H, Kurutas E, Tokur M, Bozkurt S, Ciralik H, Kabakci B. Protective effects of erythropoietin and n-acetylcysteine on methotrexate-induced lung injury in rats. *Balkan Med J.* 2013;30:99–104.
65. Al-Ali A.K., Al-Mustafa Z.H., Qaw F.S. et al. (1998) Paracetamol-induced hepatotoxicity: Lack of enhancement of the hepatoprotective effect of n-acetylcysteine by sodium sulphate. *Inflammopharmacology* 6, 235-241.
66. Çiralık H., Bulbuloglu E., Çetinkaya A., ve ark. (2006) Effects of N-Acetylcysteine on Methotrexate-Induced Small Intestinal Damage in Rats. *The Mount Sinai J Med* 73, 1086-92.
67. Arslan Ö. Investigation Of The Effect Of Trans-3- Hydroxycinnamic Acid Against Liver Damage Induced-Methotrexate In Rats. *Ağrı İbrahim Çeçen University: Enstitute of Science*; 2016.
68. Asci H, Ozmen O, Ellidag HY, Aydin B, Bas E, Yilmaz N. The impact of gallic acid on the methotrexate-induced kidney damage in rats. *J food drug anal.* 2017;25:890–897.
69. Vardi N, Parlakpınar H, Ates B, Cetin A, Otlı A. Antiapoptotic and antioxidant effects of beta-carotene against methotrexate-induced testicular injury. *Fertil steril.* 2009;92.2028–2033.
70. Boden, G., & Shulman, G. I. (2002). Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction. *European journal of clinical investigation*, 32, 14-23



71. Wang, Y., Qu, H., Xiong, X., Qiu, Y., Liao, Y., Chen, Y., Zheng, Y., Zheng, H., 2018. Plasma asprosin concentrations are increased in individuals with glucose dysregulation and correlated with
72. Lee, T., Yun, S., Jeong, J. H., & Jung, T. W. (2019). Asprosin impairs insulin secretion in response to glucose and viability through TLR4/JNK-mediated inflammation. *Molecular and cellular endocrinology*.
73. Alan, M., Gurlek, B., Yilmaz, A., Aksit, M., Aslanipour, B., Gulhan, I., ... & Taner, C. E. (2019). Asprosin: a novel peptide hormone related to insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*, 35(3), 220-223.



## **8. ÖZGEÇMİŞ**

01.09.1984 tarihinde Kahramanmaraş'a bağlı Elbistan ilçesinde doğdum. İlköğrenimimi Büyük yapalak ilköğretim ilkokulunda ortaöğretimimi Elbistan imam hatip lisesinde lise öğrenimimi Elbistan gazi Mustafa kemal lisesinde, lisans eğitimimi Fırat üniversitesi Veteriner fakültesinde tamamladıktan sonra 2011-2013 yıllarında Adıyaman Kahta ilçesin de serbest klinisyenlik ve ilaç ecza deposu sorumlu hekimi olarak çalıştım.2013-2014 yılları arasında askerlik hizmetimi yedek subay olarak Kırklareli'nde yaptım. 2014-2016 yılları Adıyaman Kahta ilçesin de serbest klinisyen olarak çalışmama devam ederken Bingöl ili Solhan ilçe Tarım ve Orman Müdürlüğüne atamam gerçekleşti halan aynı kurumda Veteriner Hekimi olarak çalışmaktayım evli ve bir çocuk babasıyım.